



ESTUDIO SOBRE ALGUNOS EVENTOS METABOLICOS
RELACIONADOS CON LA PRODUCCION DE
ENTEROTOXINA Y LA ESPORULACION DE
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TIPO A,
A SU TEMPERATURA OPTIMA DE CRECIMIENTO

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

PRESENTA:

JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 1990

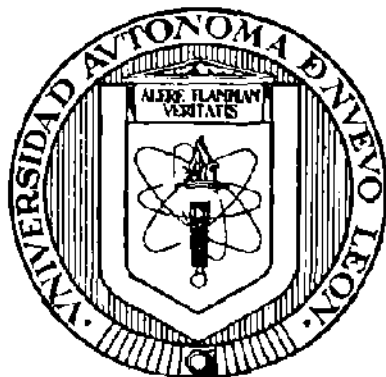
D.C. JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO XII - 90

TD
RC116
.C5
G3
1990
c.1



1080125919

Maestra Alma
M. mas sincero
agradecimiento por ayudarme
en la realizacion de este objetivo
tan importante que me he propuesto
Santos.



ESTUDIO SOBRE ALGUNOS EVENTOS METABOLICOS RELACIONADOS CON
LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA Y LA ESPORULACION DE
Clostridium perfringens TIPO A, A SU TEMPERATURA
OPTIMA DE CRECIMIENTO

POR

JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO

APROBADA:

PRESIDENTE:

SECRETARIO:

1er. VOCAL:

2o. VOCAL:

3er. VOCAL:

TD
RCHG
.C5
G3
19 0



AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla por su gran apoyo e interés constante por mi formación académica. Sus consejos serán siempre apreciados.

Me siento orgulloso y sumamente agradecido por haber contado con la asesoría, un enorme apoyo y sobre todo la amistad del Dr. Ronald G. Labbé. Mi estancia en su laboratorio fué una bella experiencia.

Mi gratitud para los doctores: Per E. Granum del Instituto Noruego para la Investigación de los Alimentos, Stanley Harmon y Gerald Stelma del Departamento de Salud y Servicios Humanos (FDA) de E.U.A. y a Charles L. Hatheway del Centro para el Control de Enfermedades de E.U.A., quienes gentilmente me brindaron asesoría y material indispensable para este trabajo.

A Lucy Yin, del Centro de Microscopía de la Universidad de Massachusetts de E.U.A. por su colaboración en el procesamiento de las muestras para observación al microscopio electrónico.

A la Dra. Alma Yolanda Arce M., la Dra. Herminia G. Martínez R. y al Dr. Rolando Tijerina M. por sus consejos para este trabajo y por su valioso tiempo empleado en la revisión de este manuscrito.

Al Dr. Reyes S. Taméz G y al M.C. Luis J. Galán W., directivos de la Fac. de C. Biológicas de esta Universidad, por las facilidades otorgadas para mi formación académica.

Y a todo el personal del Dpto. de Microbiología de esta Facultad por su constante apoyo y amistad.

A mi esposa

Quien me alentó siempre para realizar mi objetivo
y compartió conmigo días y noches de trabajo

A mis padres

Que con su ejemplo me han mostrado
un buen camino en la vida

T A B L A D E C O N T E N I D O

	Página
Página de título	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Tabla de contenido	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumen	1
Introducción	3
Material y métodos	22
Mantenimiento de las cepas	22
Producción y Purificación de Enterotoxina	22
- Cultivo	22
¹ - Extracto celular	23
- Purificación de la enterotoxina	23
Producción de Suero Anti-enterotoxina	25
Detección de Enterotoxina	26
- Contraelectroforesis	26
Velocidad de Crecimiento de las cepas	27
Análisis de la Esporulación y la Producción de enterotoxina	27

Efecto del Almidón	27
- Cultivo	27
- Hidrólisis de almidón	28
- Adición de Amilasa	28
- Inhibición de la actividad de amilasa	30
Efecto de la rafinosa	31
- Cultivo	31
- Cuantificación de Esporas	32
- Crecimiento del cultivo	32
- Análisis de la producción de enterotoxina	32
Determinación de la Termotolerancia de Esporas ...	33
- Producción de esporas	33
- Medición de la termotolerancia	33
Producción, aislamiento y caracterización parcial del cuerpo brillante intracelular	35
- Cultivo	35
- Aislamiento	35
- Determinación de Glucógeno	37
- Determinación de fósforo inorgánico	38
- Determinación de poli- β -hidroxibutirato	38
- Solubilización del CBI	39
Electroforesis en gel de poliacrilamida	40
- En condiciones desnaturalizantes	40
- En condiciones no desnaturalizantes	41

Determinación de glucoproteínas en gel de poliacri lamida	41
Determinación de Proteínas	43
- Método de Bradford	43
- Método de Lowry	43
Microscopía Electrónica de Transmisión	44
Microscopía Electrónica de Barrido	46
Resultados	47
Producción y purificación de Enterotoxina	47
Cultivo de las cepas en el medio DS con almidón o rafinosa (Estudios preliminares)	48
Cultivo de las cepas en en medio DS con almidón ..	51
Cultivo de las cepas en el medio DS con rafinosa .	59
Análisis del CBI	64
Termotolerancia de Esporas	73
Discusión	77
Conclusiones	87
Perspectivas sobre futuras investigaciones en el tema .	88
Literatura citada	90
Curriculum vitae	111

LISTA DE FIGURAS

Página

1.- Curva estándar para la determinación de almidón soluble.	29
2.- Fraccionamiento de la elución durante la filtración en gel de la enterotoxina.	47
3.- Efecto de la temperatura en el crecimiento de <i>C. perfringens</i> en el medio DS con almidón a 37 y 46°C, a) cepa NCTC 8239, b) cepa NCTC 8238.	49
4.- Efecto de la rafinosa en el crecimiento de <i>C. perfringens</i> cepa NCTC 8239 a 37 y 46°C, en el medio DS.	50
5.- Crecimiento de <i>C. perfringens</i> y concentración del almidón en el medio DS, durante el cultivo de las cepas NCTC 8239 (a) y NCTC 8238 (b).	52
6.- Efecto de la adición de α -amilasa de <i>B. licheniformis</i> , a los cultivos de <i>C. perfringens</i> cepa NCTC 8239, en el medio DS con almidón incubados a 46°C.	53
7.- Efecto de la adición de α -amilasa de <i>B. licheniformis</i> , a los cultivos de <i>C. perfringens</i> cepa NCTC 8238, en el medio DS con almidón incubados a 46°C.	54
8.- Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de células de <i>C. perfringens</i> cepa NCTC 8238, cultivadas a 43°C en el medio DS con almidón (11,400 X).	55
9.- Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de células de <i>C. perfringens</i> cepa NCTC 8238, cultivadas a 43°C en el medio DS con almidón + α -amilasa (19,000 X).	56
10.- Crecimiento e hidrólisis de almidón, de <i>C. perfringens</i> cepa FD-1 (no enterotoxigénica) en el medio DS a 37 y 46°C.	57
11.- Crecimiento e hidrólisis de almidón, de <i>C. perfringens</i> cepa ATCC 3624 (no enterotoxigénica) a 37 y 46°C en el medio DS.	58

12.- Crecimiento y esporulación de <i>C. perfringens</i> -- cepa FD-1041, en el medio DS con rafinosa a 37 y 43°C.	60
13.- Crecimiento, esporulación y producción de enterotoxina de <i>C. perfringens</i> cepa FD-1041 a 43°C.	61
14.- Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células de <i>C. perfringens</i> - cepa FD-1041, cultivadas en el medio DS con rafinosa a 43°C, mostrando la espora en formación y el cuerpo globular intracelular.	62
15.- Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células de <i>C. perfringens</i> - cepa NCTC 10240, cultivadas en el medio DS con rafinosa a 43°C, que muestran la espora en formación.	64
16.- Fotografía al microscopio electrónico de transmisión, de cortes de células vegetativas de --- <i>C. perfringens</i> cepa NCTC 8239 mostrando el CBI (57,500 X).	65
17.- Fotografías al microscopio electrónico de transmisión, de cortes de células vegetativas de --- <i>C. perfringens</i> cepa NCTC 8239 mostrando el CBI (36,000 X).	66
18.- Fotografía al microscopio electrónico de transmisión, de cortes de células vegetativas de --- <i>C. perfringens</i> cepa PS-52, mostrando el CBI --- (52,000 X).	67
19.- Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células de <i>C. perfringens</i> - cepa NCTC 8239, rotas mediante alta presión, -- mostrando el CBI libre, (52,000 X).	67
20.- Fotografía al microscopio electrónico de barrido de CBI aislados mediante centrifugación en -- gradientes de densidad de sacarosa, (5,000 X).	68
21.- Fotografía al microscopio electrónico de barrido que muestra CBI aislados mediante centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa --- (5,000 X).	69

22.- Gel de poliacrilamida al 10%, mostrando en el carril "a": una suspensión del CBI disuelta con SDS al 1% y β -ME al 2%, y en el carril "b": proteínas marcadoras de peso molecular, después de haber sido sometidas a electroforesis en condiciones disociantes.	71
23.- Curvas de muerte térmica de esporas de ----- <i>C. perfringens</i> cepa ATCC 3624, producidas a 32, 37 y 43°C y sometidas a 85°C.	73
24.- Curvas de muerte térmica de esporas de ----- <i>C. perfringens</i> cepa FD-1041, producidas a 32, 37 y 43°C, y sometidas a 95°C.	74
25.- Curvas de muerte térmica de esporas de ----- <i>C. perfringens</i> cepa FD-1, producidas a 32, 37 y 43°C, y sometidas a 85°C.	75

LISTA DE TABLAS

Página

- 1.- Producción de esporas en el cultivo de varias cepas de *C. perfringens*, en presencia o ausencia de α -amilasa de *B. licheniformis*, a 37 y 46°C. La determinación se realizó a las 12 -- hrs de incubación de los cultivos.58
- 2.- Esporulación y producción de enterotoxina por varias cepas de *C. perfringens* cultivadas a - 37 y 43°C en el medio DS con rafinosa.63
- 3.- Producción del CBI por cepas enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas de *C. perfringens*.72
- 4.- Valor "D" de las esporas de diferentes cepas - de *C. perfringens*, producidas a 32, 37 y 43°C.76

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{600}	absorbancia a 600nm
ASB	albúmina Sérica Bovina
°C	grados Centígrados
CBI	cuerpo brillante intracelular
cm	centímetros
CHAPS	(3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato)
DS	medio de cultivo Duncan-Strong
DTT	ditiotreitól
Eh	potencial de óxido-reducción
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GMP	guanosina 5' monofosfato
g	fuerza gravitacional
gr	gramo(s)
hr	hora(s)
Kd	kilodaltones
lt	litro(s)
Log_{10}	logaritmo en base 10
M	molar
β -ME	β -mercaptoetanol
mg	miligramo(s)

min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
mm	milímetro(s)
mV	milivolt(s)
" μ "	velocidad de crecimiento
μ g	microgramo(s)
μ l	microlitro(s)
nm	nanómetro(s)
pH	logaritmo del recíproco de la concen-- tración del ión hidrógeno
PMSF	fenilmetilsulfonyl fluoruro
psi	libras sobre pulgada cuadrada
RNA	ácido ribonucleico
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundo(s)
TOC	temperatura óptima de crecimiento
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidades de actividad

RESUMEN

Existen informes en la literatura que indican que la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens* tienen una temperatura óptima de 37°C, y que a la temperatura óptima de crecimiento (TOC) de la bacteria (43-46°C) esos eventos ocurren en baja proporción o no son detectables.

En este trabajo se estudió la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens* a su temperatura óptima de crecimiento en el medio Duncan y Strong (DS) con almidón o rafinosa.

Se demostró que la incapacidad de varias cepas enterotoxigénicas de esporular y producir enterotoxina a 46°C, se debe a la incapacidad de esas cepas de hidrolizar el almidón del medio de cultivo a esa temperatura, lo que origina un crecimiento muy pobre y que muchas células que inician el proceso de esporulación no sean capaces de completarlo. Además se encontró que un grupo de cepas no enterotoxigénicas sí hidrolizaba el almidón a esa temperatura y podían esporular y crecer satisfactoriamente.

En experimentos similares, pero sustituyendo el almidón del medio DS por rafinosa, se demostró que las cepas enterotoxigénicas estudiadas, son capaces de esporular y

producir enterotoxina a su TCC en proporciones similares a los reportados a 37°C. Otro dato importante fué que esos procesos se llevaban a cabo más rápidamente a la TCC que a 37°C. No se detectó producción de enterotoxina en las células vegetativas no esporuladas cultivadas a su TCC.

Por otro lado, las esporas producidas a su TCC fueron más resistentes al calor que las obtenidas a 37°C, las que a su vez lo fueron más que las producidas a 32°C.

Además, se informa por primera vez, de la presencia de un cuerpo intracelular (CIB) que es producido por las células vegetativas a su TCC. Esta inclusión que se aisló y caracterizó parcialmente, esta compuesta principalmente por una proteína con un peso molecular de 47 Kd. Este polipéptido no mostró identidad inmunológica con la enterotoxina y fué producido tanto por cepas enterotoxigénicas como por no enterotoxigénicas.

INTRODUCCION

La prevalencia de enfermedades originadas por el consumo de alimentos contaminados, son causa de problemas socioeconómicos en todo el mundo. En un país tan desarrollado como Estados Unidos de América, se estima que cada año ocurren entre 69 y 275 millones de casos de diarreas asociadas a la ingesta de estos alimentos, lo que le cuesta a esa nación entre 5 y 17 billones de dólares en tratamientos médicos y pérdida de productividad (Oblinger, J.L., et al. 1988).

Entre los principales contaminantes de alimentos se encuentran bacterias, hongos, parásitos, virus y sustancias químicas, siendo las bacterias las que causan un mayor número de enfermedades.

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

C. perfringens es comúnmente conocido por ser el principal causante de la gangrena gaseosa, sin embargo en las últimas tres décadas se le ha señalado como uno de los

principales causantes de toxi-infecciones alimentarias en muchos países (Sutton, R.G.A. y B.C. Hobbs, 1965; Todd, E.C.D., 1978; Hatheway, C.L., D.N. Whaley, y V. R. Dowel, 1980; Shandera, W.X. 1983; Borriello, S.P. et al, 1985; Sharp, J.C.M., 1988; Centers for Disease Control, 1990). Además es capaz de causar diarrea infecciosa, algunas veces relacionada con la administración de antibióticos (Borriello, S.P. et al. 1984; Larson, H.E. y S.P. Borriello, 1988), y se le ha asociado con el síndrome de muerte fulminante infantil (Murrel, T.G.C. et al., 1987).

Este microorganismo es un bacilo anaerobio, gram positivo, encapsulado, formador de esporas, inmóvil, que produce alrededor de trece toxinas diferentes. Se clasifica en cinco tipos: A, B, C, D y E, de acuerdo con la producción de cuatro toxinas extracelulares (alfa, beta, gama y epsilon).

La toxi-infección alimentaria y la diarrea infecciosa son provocadas por la acción de una enterotoxina en el tracto gastrointestinal. Esta sustancia se produce y acumula intracelularmente durante la esporulación de la bacteria y sale de la célula en el momento en que esta libera la espora (Labbé, R.G. 1989)

La enterotoxina es una proteína termolábil (Duncan C.L., y D.H. Strong, 1969), formada por una cadena

polipeptídica (Duffy, L.K. et al., 1982), con una estructura 80% plegada y 20% enrollada al azar (Granum, P.E., y O. Harbitz, 1985), compuesta por 309 aminoácidos con un peso molecular de 34.262 Kd (Granum, P.E., 1985), y un punto isoeléctrico de 4.5 (Yotis, W.W., y N. Catsimpoilas, 1975).

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

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

***C. perfringens* EN ALIMENTOS**

Ya que este microorganismo se encuentra constantemente en el suelo, de la misma manera se presenta en cualquier superficie expuesta al polvo, de allí la facilidad de

contaminar cualquier alimento.

Al cocinar un alimento contaminado con *C. perfringens* es posible eliminar a las células vegetativas de la bacteria, pero algunas esporas pueden sobrevivir y ser "activadas" para germinar debido al tratamiento con calor (choque térmico), además el calentamiento disminuye el potencial de óxido-reducción, provocando un ambiente más propicio para la germinación y multiplicación del microorganismo.

Se ha demostrado que el choque térmico puede jugar un papel muy importante en la germinación de las esporas que contaminan el alimento. Barnes y otros (1963), reportaron que sin un choque térmico previo, sólo germinaban alrededor de un 3% de las esporas presentes en la carne cruda, pero casi todas germinaban después de que la carne había sido calentada. Sin embargo existen cepas que producen esporas termosensibles las cuales no requieren de activación por calor para germinar (Ando, Y., et al., 1985). El nitrito de sodio, un agente curante de carnes, también induce la germinación de esporas de este microorganismo y de otros anaerobios (Labbé, R.G., y C.L. Duncan, 1970).

Una vez que las esporas germinan, la multiplicación de las células se lleva a cabo de acuerdo con las condiciones prevaletentes en el medio ambiente. Esta bacteria tiene un

rango de crecimiento de 15 a 52 °C, y puede soportar temperaturas de 60°C por varias horas (Labbé, R.G., 1989). Su temperatura óptima de crecimiento (TOC) se sitúa en un rango de 43 a 46 °C (Kim, C.H., R. Cheney, y M. Woodburn, 1967; Labbé, R.G. y C.L. Duncan, 1974); entre este rango, las cepas pueden mostrar un tiempo de generación de 8.8 min; sin embargo se han reportado tiempos de generación tan bajos como 7.1 min (Willardsen, R.R. et al., 1978).

Los tiempos de generación mostrados por *C. perfringens* son de los más bajos reportados para las bacterias, por lo que se le debe dar la debida atención para la buena conservación de los alimentos (Labbé, R.G., 1989).

Se ha reportado que la bacteria puede esporular en muchos alimentos, sobre todo los cárnicos (res, pollo, pavo, atún, etc) donde pueden alcanzar niveles tan altos como los que se obtienen en los medios de cultivo artificiales (Naik, H.S., y C.L. Duncan, 1977; Craven, S.E., 1980). La esporulación además de favorecer la sobrevivencia del microorganismo, puede ser fuente de contaminación para otros alimentos.

Por otra parte durante la esporulación de la bacteria en el alimento, se pueden producir cantidades importantes de enterotoxina que pueden influir en la causalidad y en la sintomatología de la toxi-infección alimentaria (Naik,

H.S., y C.L. Duncan, 1977; Strong, D.H., C.L. Duncan, y G. Perna, 1971; Craven, S.E., 1980).

ENFERMEDADES ALIMENTARIAS POR *C. perfringens*

La toxi-infección alimentaria puede ocurrir al ingerir el alimento contaminado con uno o una combinación de los siguientes factores: a) células vegetativas: de acuerdo a experimentos realizados por Dische y Elek (1957), se requieren entre 4×10^9 y 6×10^9 células para provocar la enfermedad; cuando un número importante de estas logra pasar la barrera gástrica, llegan al ambiente alcalino del intestino donde esporulan y liberan la enterotoxina en el lumen intestinal, b) células en esporulación: éstas pueden producir la enterotoxina durante su estancia en el alimento y después liberar la enterotoxina en el tracto digestivo, y c) enterotoxina: en experimentos con humanos se requirió de 8mg de toxina pura y la neutralización previa del jugo gástrico para inducir la sintomatología (Skjelkvalé, R., y T. Uemura, 1977).

Generalmente la toxi-infección alimentaria aparece después de 7 a 12 hrs de haberse ingerido el alimento. Sin embargo en muchos casos la sintomatología aparece solo dos hrs después de la ingestión del producto contaminado

(Robinson, J.A. y M.O. Messer, 1969; Sanders, S. y R.H. Hutchenson, 1974; Robertson, J.M., et al, 1977). Esto ha sugerido que las células en esporulación o la enterotoxina preformada en el alimento, pueden jugar un papel muy importante en la rápida aparición de los síntomas (Naik, H.S. y C.L. Duncan, 1977; Craven, S.E., 1980).

La sintomatología generalmente involucra diarrea y dolor abdominal agudo, la náusea y vómito son menos comunes. La ingestión de alimento conteniendo enterotoxina preformada podría resultar en la sintomatología más severa que incluiría el vómito y dolor de cabeza (Craven, S.E., L.E. Blankenship, y J.L. McDonel, 1981).

La diarrea infecciosa por su parte, también presenta dolor abdominal agudo, vómito y en muchos casos heces sanguinolentas. La diarrea persiste por un promedio de 11 días. La gran mayoría de los pacientes que sufren de esta enfermedad tienen más de 60 años de edad y presentan grandes cantidades de *C. perfringens* en las heces (Larson, H.E. y S.P. Borriello, 1988)..

Un número importante de esas diarreas se presentan después de que los pacientes han recibido tratamientos con antibióticos como penicilina, co-trimoxazol y cefuroxima (Borriello, S.P., et al., 1984).

Varios autores opinan que la diarrea infecciosa resulta

de una colonización persistente y sobrepoblación de *C. perfringens* en el intestino donde continuamente están liberando enterotoxina (Larson, H.E., y S.P. Borriello, 1988)

Por otro lado, en un estudio retrospectivo, se demostró la presencia de enterotoxina de *C. perfringens* en muestras séricas y gastrointestinales de bebés que habían muerto del síndrome de muerte súbita infantil. Los autores sugirieron que la enterotoxina podía jugar un papel directo o indirecto en la causalidad de esa enfermedad, ya que varios reportes indican que cuando la enterotoxina se administra intravenosamente en animales experimentales, se observan cambios en los tejidos que son similares a los mostrados en ese síndrome (Murrell, T.G.C., et al., 1987).

En las enfermedades gastrointestinales, el blanco de la enterotoxina es la membrana de las células epiteliales del "borde de cepillo" en el intestino. Se cree que la toxina al ser liberada es segmentada por la tripsina, incrementándose su actividad, para luego unirse a los receptores específicos formando un complejo de 160 Kd (Wnek, A.P., y B.A. Mc Clane, 1989). Una vez ligada, la enterotoxina actúa sólo con la membrana celular, provocando alteraciones en la permeabilidad que originan la salida de agua, iones y pequeñas moléculas, esto conduce a otros efectos secundarios

que incluyen desequilibrio osmótico , inhibición de la síntesis macromolecular y del metabolismo de energía, daño morfológico y eventualmente muerte celular (Wnek, A.P. y B.A. Mc Clane, 1989).

A nivel histológico, el íleon muestra descamación de las células epiteliales de las vellosidades intestinales. El "borde de cepillo" en el intestino pierde su configuración plegada, y grandes cantidades de membranas celulares y contenido citoplásmico se pierden en el lumen intestinal (Mc. Donel, J., et al., 1978).

La enterotoxina muestra además actividad biológica en las células intestinales de: conejos (Duncan, C.L., H. Sugiyama y D.H. Strong, 1968), corderos (Hauschild, A., L. Niilo y W. Dorward, 1970), bovinos (Niilo L., 1971), perros (Bartlett, M.L., H.W. Walker, y R. Zippin, 1972), pollos (Niilo, L., 1974), monos (Uemura, T., et al., 1975), ratas (McDonel, J.L., y T.Asano, 1975), ratones (Yamamoto, K., I. Dhishi, y G.Sakaguchi, 1979), cerdos (Jestin,A. y M.R. Popoff, 1987); además en células en cultivo: células Vero (Uemura, T., T. Maekawa, y G. Sakaguchi, 1984; Granum, P.E., 1985; Mc Clane, B.A., 1989), células HeLa (Matsuda, M. et. al., 1986), hepatocitos (Jarmund, T., y W. Telle, 1982); produce eritema en piel de conejos, cobayos (Hauschild, A.H.W., 1970), y puede ser letal cuando se administra por

vía intravenosa a conejos, cobayos, corderos (Niilo, L., 1971) y caballos (Torres-Anjel, M.J., et al., 1978).

LA ESPORULACION DE *C. perfringens*

El estudio de la esporulación bacteriana ha adquirido gran importancia ya que un gran número de toxinas, antibióticos y enzimas se producen durante este proceso en muchas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Schaeffer, P., 1969). Además la capacidad de formar esporas favorece de manera considerable la sobrevivencia del microorganismo en sus diferentes habitats.

Las esporas se forman en la bacteria mediante el proceso de esporulación, el cual involucra todo un conjunto de cambios morfológicos y fisiológicos en el microorganismo.

Este conjunto de cambios se inicia como respuesta a una de las siguientes deficiencias nutricionales: a) disminución en el medio de cultivo de las fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo de rápido metabolismo: las células vegetativas se multiplican en el medio de cultivo, hasta que se reduce la concentración de uno de los nutrientes necesarios para el crecimiento, esto es reconocido por la célula como un signo para iniciar la esporulación, b) falta de un aminoácido esencial: la disminución súbita de uno o más aminoácidos en

el medio de cultivo, pueden provocar una respuesta severa que implica el cese de síntesis de proteínas y de RNA, y se provoca también una inhibición en la producción de (p)ppGpp y en la actividad de la IMP-deshidrogenasa, resultando en una disminución de nucleótidos de guanina que conduce al inicio de la esporulación (Freese, E., 1981), c) Inhibición directa de la síntesis de nucleótidos de guanosina: la decolinina, un inhibidor de la síntesis de GMP es capaz de promover la esporulación de *Bacillus subtilis* (Mitani, T., J.E. Heinze, y E. Freese, 1977; Freese, E.B., N. Vasantha, y F. Freese, 1979) y de *C. perfringens* (Sacks, L.E., 1980). La cafeína que inhibe la vía de las purinas, también mostró la inducción de la esporulación en *C. perfringens* (Labbé, R.G., y L.L. Nolan, 1981, 1987).

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

(1968) también conocido como medio DS.

En el género *Bacillus* la secuencia de cambios morfológicos que ocurren durante la esporulación, se han dividido en siete etapas, éstas son muy similares a las observadas para *C. perfringens*, difiriendo solo en varios aspectos menores (Hoeniger, J.F.M., P.F. Stuart, y S.C. Holt, 1968; Roper, G., A. Short, y P.D. Walker, 1976).

Esas etapas se caracterizan principalmente por los siguientes eventos, primera: la formación de un filamento axial de cromatina; segunda: la invaginación de la membrana celular para formar el septo de la división ; tercera: el englobamiento de la pre-espora por la membrana celular; cuarta: el depósito de peptidoglicano para formar el cortex; quinta: la formación de las capas de la espora; sexta: la maduración de la espora, y séptima: la liberación de la espora de la célula madre (Mandelstam, J., K. McQuillen, y I. Dawes, 1988).

La espora es una forma celular de alta resistencia, difiere de su progenitor, la célula vegetativa, en resistencia al calor por un factor de 10^5 o más, en resistencia a la luz ultravioleta y radiación ionizante por un factor de 10^2 o más, y en resistencia a la desecación, a los desinfectantes y a otros químicos (Khoury, P.H., S.J. Lombardi, y R.A. Slepecky, 1987).

Se ha demostrado que la resistencia al calor es mayor en las esporas de las bacterias termófilas comparada con la de las mesófilas, la que a su vez es mayor que la de los psicrófilos (Williams, D.B, y W.J. Robertson, 1953; Roberts, T.A., y A.D. Hitchins, 1969; Khoury, P.H., S.J. Lombardi, y R.A. Slepecky, 1987).

El grado de termorresistencia depende de la especie y de las condiciones que imperen en el medio ambiente durante la formación de la spora; de igual manera influirán las condiciones en que se mide esa capacidad. Cuando varias cepas de *C. perfringens* esporulan entre un pH de 7.0 y 8.5, se ha demostrado que a mayor pH del cultivo, las esporas formadas presentarán mayor termorresistencia a la inactivación por calor (Craven, S.E.,1990).

En algunas especies del género *Bacillus* se ha observado que entre mayor sea la temperatura de esporulación, mayor será la termorresistencia de las esporas formadas (Williams, D.B., y W.J. Roberston, 1953; Lechowich, R.V., y Z.J. Ordal, 1962; Warth, A.D., 1978; Khoury, P.H., S.J. Lombardi, y R.A. Slepecky, 1987). Debido a que hasta en la actualidad, se desconoce si este comportamiento también ocurre en *C. perfringens*, uno de los objetivos de este trabajo pretendió abordar esta incógnita

La termorresistencia de esporas se atribuye al menos a

tres determinantes fisicoquímicos que afectan al protoplasto vital: contenido de agua, mineralización y adaptación térmica (Gerhardt, P. y R.E. Marquis, 1989).

Las cepas de *C. perfringens* muestran mucha variación en la termorresistencia de sus esporas (Ando, Y., et al. 1985). Aunque años atrás se creía que todas las cepas que provocaban la toxi-infección alimentaria producían esporas con gran termorresistencia, ya se ha demostrado que también las cepas que producen esporas termosensibles son capaces de causar esa enfermedad (Chakrabarty, A.K., y K.G. Narayan, 1979; Sunagawa, H., et al., 1987).

LA ESPORULACION Y LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA

Una de las características más importantes de *C. perfringens*, desde el punto de vista médico, es su capacidad de producir enterotoxina, ya que esta es la causa de las enfermedades gastrointestinales provocadas por este microorganismo.

Esa proteína se sintetiza y acumula intracelularmente durante la esporulación de la bacteria. Duncan y colaboradores (1972) haciendo estudios con cepas mutantes de *C. perfringens* reportaron que la enterotoxina es un producto de uno de los genes específicos de la esporulación, es

decir, que esa sustancia solo se sintetizaba durante ese proceso. Contrario a esas afirmaciones, también existen reportes donde se afirma que esta toxina se produce en las células vegetativas no esporuladas, aunque en cantidades muy pequeñas (Granum, P.E., et al., 1984, Goldner, S.B., et al., 1986). De cualquier manera y como se verá en los párrafos siguientes, la esporulación y la producción de enterotoxina en esta bacteria mantienen una relación fisiológica muy estrecha. Además las cantidades de enterotoxina que pueden causar un problema intestinal solo se producen durante la esporulación de la bacteria (Strong, D.H., C.L. Duncan, y G. Perna, 1971; Labbé, R.G., 1980).

Tanto la síntesis de la enterotoxina, como la de las proteínas de las capas de la cubierta de la spora se inician entre los primeros eventos de la esporulación y son codificadas por un RNA mensajero estable (Labbé, R.G., y C.L. Duncan, 1977). Recientemente Ryu y Labbé (1989), han demostrado la presencia de pequeñas cantidades de enterotoxina en la cubierta de la spora, aunque sugieren que esta proteína no juega allí un papel estructural importante.

Duncan y colaboradores (1973), observaron que durante la esporulación de algunas cepas enterotoxigénicas ocurría la formación de un cuerpo intracelular en forma de barra.

Más tarde se demostró que esa inclusión estaba compuesta de una proteína con características fisicoquímicas y biológicas muy similares a las de la enterotoxina (Löffler, A., y R.G. Labbé, 1985, 1986).

La adición al medio de cultivo de inductores de esporulación, como la cafeína y ciertas metilxantinas, también incrementan la producción de enterotoxina, además de que la inclusión intracelular también aparece en un porcentaje mayor de las células (Labbé, R.G., y L.L.Nolan, 1981; Löffler, A., y R.G. Labbé, 1986)

Recientemente, Dillon y Labbé (1989) demostraron que al agregar enterotoxina a un cultivo de *C. perfringens*, éste acortaba el período de adaptación (lag), además de que el tiempo en el que aparecían las esporas también disminuía considerablemente. Ellos demostraron además que la toxina estimulaba la síntesis macromolecular de las células en fase pre-exponencial.

La presencia de algunos carbohidratos en el medio de cultivo es importante para obtener buenas proporciones de esporulación y producción de enterotoxina (Labbé, R.G., y C.L. Duncan, 1975).

El almidón, como un constituyente de los medios de cultivo ha sido el carbohidrato más extensamente utilizado para hacer estudios tanto de la esporulación como de la

producción de enterotoxina. Se ha demostrado además, que la fuente de obtención y el método de preparación de ese carbohidrato tienen influencia en la producción de esporas y de enterotoxina, y que el almidón soluble es mejor para esos fines que el extraído de papa o maíz (Labbé, R.G., et al., 1976).

El empleo de otros carbohidratos como la rafinosa, mejora la producción de esporas y de enterotoxina de algunas de las cepas que se han estudiado (Labbé, R.G., y D.K. Rey, 1979).

La esporulación en esta bacteria normalmente ocurre en un rango de potencial de óxido-reducción (Eh) de -450 a -400 mV, aunque puede ocurrir hasta un límite de +350 mV (Pearson, C., y H. Walker, 1976). Este proceso y la producción de enterotoxina se pueden llevar a cabo entre un rango de pH de 6.0 a 8.5, con un óptimo cerca de la neutralidad (Labbé, R.G., y C.L. Duncan, 1974).

Para muchas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, la temperatura óptima de esporulación es muy similar a la óptima de crecimiento (Williams, D.B., y W.J. Robertson, 1953; Warth, A.D., 1978). Sin embargo para *C. perfringens*, se ha reportado que la temperatura óptima para la esporulación y la producción de enterotoxina es de 37 °C, la cual está muy por abajo de su óptima de crecimiento que

es de 43 a 46 °C. Además, se ha reportado que a esta última temperatura, la esporulación y la producción de enterotoxina ocurre en muy bajas proporciones o no es detectable (Kim, C., R. Cheney, y M. Woodburn, 1967; Labbé, R.G., y C.L. Duncan, 1974; Rey, C.R., H.W. Walker y P.L. Rohrbaugh, 1975).

Sin embargo, en experimentos preliminares hechos en nuestro laboratorio y que se describirán en los siguientes capítulos, se observó que el medio DS con almidón no producía un crecimiento satisfactorio de las cepas a 46°C comparado con el que se obtenía a 37°C. Además, se mostró que cuando se sustituía el almidón del medio por rafinosa, se obtenía a 46°C un crecimiento mucho mayor y se podían observar esporas maduras a esa temperatura.

Con esas observaciones y con la información antecedente que indicaba que la temperatura óptima de esporulación de muchas especies bacterianas era muy similar a la óptima de crecimiento, se formuló la hipótesis de que *C. perfringens* era capaz de esporular y de producir enterotoxina a su temperatura óptima de crecimiento (TOC), de una manera similar a la mostrada a 37°C.

Para comprobar nuestra hipótesis, fué necesario determinar las proporciones de esporulación y de producción de enterotoxina a la TOC de la bacteria, en un medio de cultivo que favoreciera el crecimiento de las cepas a esa

temperatura. A la vez era muy interesante establecer si la termorresistencia de las esporas producidas en esas condiciones, era mayor que la de las producidas a menor temperatura.

Por otra parte, debido a la amplia utilización del almidón en los medios de cultivo para estudiar la esporulación y la producción de enterotoxina, era importante tener un mejor conocimiento del papel que juega ese carbohidrato en la promoción de esos eventos a la TDC y a 37°C.

MATERIAL Y METODOS

MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Las cepas utilizadas en este trabajo se agruparon como enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas.

El grupo de las enterotoxigénicas estuvo constituida por las cepas: NCTC 8238, NCTC 8239, NCTC 8679 y NCTC 10240 que fueron proporcionadas por el Dr. Ronald G. Labbé de la Universidad de Massachusetts de E.U.A., y la FD-800, la FD-884 y la FD-1041 que se obtuvieron del Dr. Stanley Harmon del Centro para el Control de Enfermedades de E.U.A.

Las cepas no enterotoxigénicas incluyeron a la PS-19, PS-52, FD-1 y ATCC 3624, proporcionadas también por el Dr. R.G. Labbé.

Las bacterias al ser recibidas se inocularon en caldo con tioglicolato y se incubaron a 37°C durante 16 hrs. A partir de este cultivo, se inoculó un medio de carne cocida según Robertson (Willis, A.T., 1960), y se incubó a 37°C durante 72 hrs. Estos cultivos se guardaron a -20°C como reserva y se hicieron resiembras cada 8 a 12 meses.

PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA ENTEROTOXINA

CULTIVO: para este fin se utilizó la cepa NCTC 8239. Esta se

activó inoculando una alícuota del cultivo de reserva en caldo con tioglicolato y se sometió a un choque térmico (75°C durante 15min.). Después de enfriarse con agua a temperatura ambiente, el medio se incubó a 37°C por 14 a 16 horas. Utilizando estos cultivos se inoculó el medio para esporulación DS en una proporción 1:100 y se incubó a 37°C durante 7 hrs.

EXTRACTO CELULAR: las células cultivadas en el medio DS se centrifugaron a 10,000 x g durante 15 min a 5°C. El precipitado se lavó con solución salina helada, y se resuspendió en amortiguador de fosfatos (0.2M pH 6.8). La suspensión de bacterias, se colocó en un baño de agua con hielo y se sometió a ultrasonido a 65 unidades de intensidad, con intervalos de un minuto de actividad y uno de descanso utilizando un sonicador Biosonik (modelo BIO-II). El procedimiento continuó hasta obtener aproximadamente un 95% de las esporas libres. La muestra se centrifugó a 12,000 x g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante (extracto celular) se utilizó para purificar la enterotoxina.

PURIFICACION DE LA ENTEROTOXINA: Esto se llevó a cabo de manera similar al método de Granum y Whitaker (1980) y

consistió en lo siguiente: el extracto celular obtenido en el paso anterior, se sometió a precipitación con un volumen igual de sulfato de amonio al 80% de saturación, estéril, manteniéndose en un baño de agua con hielo. Después de coleccionar el precipitado, éste se disolvió en el amortiguador de fosfatos hasta obtener una concentración de 2 a 4 mg/ml. Esta solución se volvió a precipitar con un volumen igual de sulfato de amonio al 30% de saturación. El precipitado obtenido se disolvió en amortiguador de fosfatos, y se dializó en la misma solución durante 14 horas a 5°C.

La muestra se centrifugó para eliminar el material insoluble, y después se sometió a cromatografía de exclusión utilizando una columna de 2.4 x 40 cm, empaquetada con Sephadex G-100 y equilibrada con el amortiguador de fosfatos.

A las fracciones que contenían proteína (determinada espectrofotométricamente a 280nm) se les determinó actividad biológica e identidad inmunológica con la enterotoxina, mediante producción de eritema en piel de cobayos albinos e inmunodifusión doble respectivamente. Para esta última técnica se utilizó suero anti-enterotoxina proporcionado por el Dr. Per Einar Granum del Instituto Noruego para la Investigación de los Alimentos.

La pureza de la enterotoxina se determinó mediante

electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturalizantes, usando una muestra de enterotoxina estándar, facilitada por el Dr. Gerald Stelma de la Administración de Drogas y Alimentos del Gobierno de E.U.A.

PRODUCCION DE SUERO ANTIENTEROTOXINA

Los anticuerpos contra la enterotoxina se produjeron en conejos, siguiendo un esquema de inmunización muy similar al recomendado por Bartholomew y Stringer (1983) y que se realizó de la siguiente manera:

Dosis Enterotox (µg)	Volumen Dosis (ml)	Adyuvante Completo *	Via Administ	Día Inyecc
3	0.25	+	i.m.	01
12	0.25	+	i.m.	08
30	0.25	+	i.m.	15
30	0.50	+	i.m.	22
30	0.50	+	i.m.	29
30	0.50	+	i.m.	36
100	1.00	-	i.v.	45

*: El volumen de adyuvante fue igual al volumen de la dosis.

El sangrado se realizó el día 58.

La actividad antienterotoxina del suero, se demostró en una inmunodifusión doble, usando la enterotoxina obtenida en

nuestro laboratorio así como la muestra de referencia.

DETECCION DE ENTEROTOXINA

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS: para desarrollar esta técnica, se siguió la metodología descrita por Naik y Duncan (1977), con modificaciones menores

En este caso se utilizó una solución de agarosa tipo III (Sigma Chem. Co.) al 6% disuelta en amortiguador de barbital pH 8.6, 0.06M. Las placas de vidrio que tenían una dimensión de 14 x 14 cm, se cubrieron primero con una capa de agar al 1% disuelto en el mismo amortiguador, y después con 38ml. de la solución de agarosa.

Se formaron 5 hileras de pozos dobles distanciados 5mm entre cada pozo, y 1.3cm entre cada hilera. Los pozos tuvieron un diámetro de 4mm.

Los estándares de enterotoxina utilizados incluyeron las siguientes concentraciones en $\mu\text{g/ml}$: 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4 y 0.2. Estas soluciones al igual que las muestras a analizar se agregaron en la fila de la hilera más próxima al cátodo, en cantidades de 10 μl . El suero anti-enterotoxina se diluyó en proporción 1:1 y se colocó en la fila de pozos más cercana al ánodo, en la misma cantidad que las muestras de enterotoxina.

Inmediatamente después de agregar las soluciones, se realizó la electroforesis, utilizando el mismo amortiguador, y aplicando 130 Volts por 30 min.

Las placas se mantuvieron después en cámara húmeda a temperatura ambiente por 12 a 16 horas, y en seguida se tixeron con ácido tánico al 2% y se determinó la presencia de bandas de precipitación. La concentración del estándar que mostró la última banda de precipitación, se comparó con la dilución de la muestra que dió la última banda. La sensibilidad de la prueba fué de 0.8 μ g de enterotoxina/ml.

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS ("μ")

La activación de las cepas se realizó de la forma ya especificada. De esos cultivos se inocularon tubos con infusión cerebro-corazón y se incubaron a 37, 43, 46 y 49 °C, por 9 a 10 hrs. El crecimiento se determinó mediante mediciones de densidad óptica (en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 35) cada 30 min.

ANALISIS DE LA ESPORULACION Y LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA

EFEECTO DEL ALMIDON:

CULTIVO: Se activaron las cepas de la manera ya descrita, y se inocularon en medio para esporulación DS con almidón al

0.4% y carbonato de sodio 0.66M al 1.25%. Los cultivos se incubaron a 37 o 46 °C.

HIDROLISIS DE ALMIDON: A los cultivos del medio DS, se les determinó la concentración del carbohidrato, cada hora durante el tiempo de incubación.

Con ese objeto, se tomó como base el procedimiento empleado por Labbé y Duncan (1978), modificándolo de la siguiente manera: Se preparó una solución madre de 0.5gr de yodo + 5 gr de yoduro de potasio en 100 ml de agua destilada. Por otro lado se hicieron soluciones estándar con diferentes concentraciones de almidón (4, 3.2, 2.4, 1.6, 0.8 y 0.4 mg/ml).

Se tomaron alícuotas del cultivo de 1ml y se centrifugaron en una microcentrífuga Eppendorf (modelo 5414) a 15,000 r.p.m. durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron 150 µl de los sobrenadantes de los cultivos o de las soluciones estándar y se le añadieron 6ml de la solución de yodo que fué previamente diluida 1:10. Inmediatamente después se le determinó la absorbancia a 620nm, y se realizó una curva de calibración con los estándares (Fig. 1).

ADICION DE AMILASA: En este experimento se utilizó α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (500-1000 U/mg de proteína, Sigma

Chem. Co.). Para determinar la actividad de proteasa existente en esa preparación, se utilizó Azocoll (Sigma Chem. Co.) como sustrato, tomando como base el procedimiento descrito por Löffler y Labbé (1983). Los resultados de ese análisis indicaron que la solución de amilasa sí contenía actividad de proteasas.

Tomando en cuenta la gran termoestabilidad de la amilasa de *B. licheniformis*, la muestra comercial se diluyó

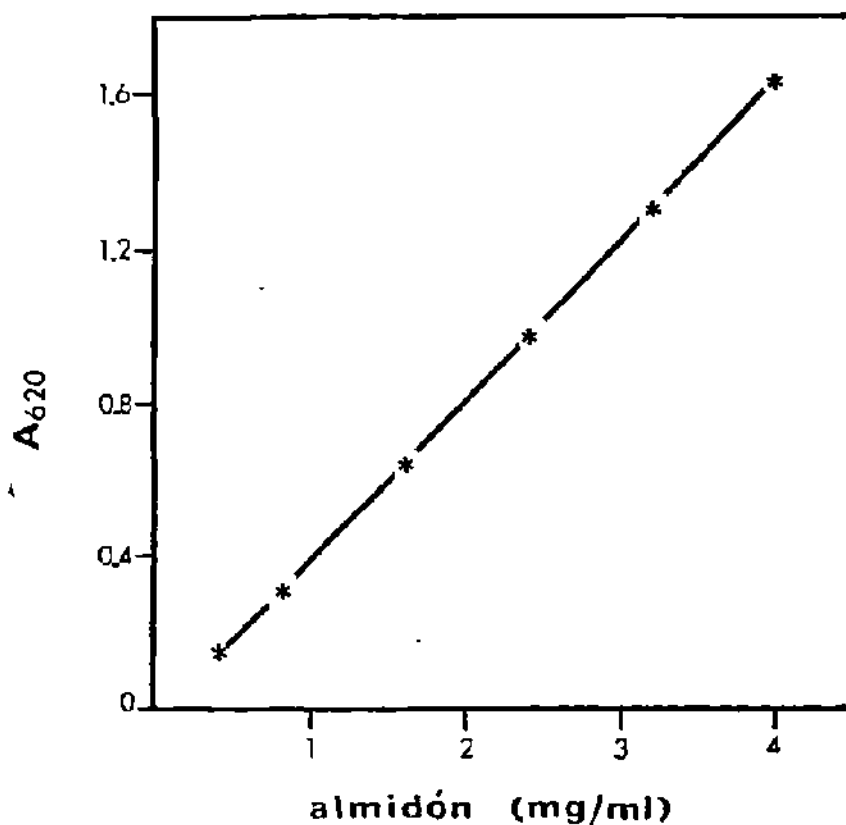


Fig. 1. Curva estándar para la determinación de almidón soluble.

1:1000 en Tris 0.05M, pH 7.0 y se calentó a 75°C durante 15 min, (tratamiento con el cual se eliminó la actividad de proteasa), de esta solución se agregaron a los cultivos 30 µl a las 3, 4 y 5 hrs de incubación.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE AMILASA: Se utilizaron dos polipéptidos que han mostrado actividad inhibitoria contra varias amilasas, uno es extraído de la semilla de trigo (*Triticum aestivum*) (Sigma Chem. Co.) (Silano, V., et al. 1975) y otra llamada "Tendamistat" que es producida por *Streptomyces tendae* (Calbiochem) (Murai, H., et al. 1985).

En estos experimentos, se trató en primer lugar de inhibir la actividad de la amilasa de *C. perfringens* en el cultivo, y en segundo interferir en la actividad de la amilasa de *B. licheniformis*.

El inhibidor extraído de la semilla de trigo, se reconstituyó en amortiguador Tris pH 6.9 (0.05M), a una concentración de 1.0 mg/ml. De esta solución se agregaron 60 µl a tubos con 3 ml de los cultivos de *C. perfringens* a las 3, 4 y 5 horas de incubación.

Por otro lado, se tomaron alícuotas de la solución de ese inhibidor y se mezcló con la solución diluida de amilasa de *B. licheniformis* en proporción 100:30. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 min y en seguida se añadieron 100µl a los cultivos a las 3, 4 y 5 hrs.

El Tendamistat se reconstituyó también en amortiguador Tris a una concentración de 1 mg/ml. De esta solución se agregaron 50µl a los cultivos de *C. perfringens* a las 3,4 y 5 hrs o cada media hr desde las 0 hasta las 8 hrs de incubación.

En otros experimentos, se tomaron 30 µl de la solución de α-amilasa de *B.licheniformis* y se mezclaron con 100 µl de la solución de Tendamistat, esta solución se incubó en un baño de agua a 37°C durante 15 min y se agregó a los cultivos a las 3,4 y 5 hrs.

Para estos experimentos de inhibición de amilasas, se determinó la concentración de almidón en el cultivo y el crecimiento en la forma ya descrita, además se buscó la presencia de esporas maduras mediante el microscopio de contraste de fases.

EFECTO DE LA RAFINOSA

CULTIVO: Tanto la activación de las cepas, como el procedimiento de los cultivos se realizaron de la manera descrita para estudiar el efecto del almidón. Sólo que en este caso se sustituyó el almidón del medio de cultivo por la rafinosa, en la misma concentración.

CUANTIFICACION DE ESPORAS: se tomaron alícuotas de los cultivos y se colocaron en tubos con tapa de rosca. Estos se colocaron en un baño de agua a 75°C durante 20 min para matar las células vegetativas y se enfriaron inmediatamente después en un baño de agua helada. Para determinar las esporas presentes, se utilizó el método de conteo en placa, para el cual se hicieron diluciones decimales de las alícuotas calentadas, de donde se inoculó en un medio nutritivo con agar en cajas Petri. Este medio contenía: 1.5% de Tripticasa Peptona (BBL), 1.0% de Extracto de Levadura (Difco) y 1.5% de Agar-Agar (Labbé, R.G., y D.K. Rey, 1979).

Los cultivos se incubaron en anaerobiosis mediante el sistema Gas-Pak Plus (BBL) a 37°C durante 24 a 28 hrs.

CRECIMIENTO DEL CULTIVO: este se determinó mediante los valores obtenidos en un fotocolorímetro Klett-Sommerson, utilizando un filtro # 66, o bien en un espectrofotómetro Perkin Elmer (modelo 35).

ANALISIS DE LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA: Se tomaron muestras de 100ml del cultivo, los cuales se centrifugaron a 10,000 x g durante 15 min a 4 °C. El paquete celular se reconstituyó en amortiguador de fosfatos pH 7.0 (0.02M), y se procedió a obtener el extracto celular para determinar la

enterotoxina mediante la metodología ya descrita.

DETERMINACION DE LA TERMOTOLERANCIA DE ESPORAS

PRODUCCION DE ESPORAS: Se activaron las cepas FD-1, FD-1041, y ATCC-3624, de la forma ya descrita.

Se inoculó el medio DS sustituido con rafinosa, al cual se le agregó 1.25% de una solución de carbonato de sodio 0.66M. Los cultivos se incubaron a 32, 37 y 46 °C hasta que la mayoría de las células liberaran la espora.

El cultivo se centrifugó a 10,000 x g por 15 min a 5 °C. El precipitado se reconstituyó en agua destilada estéril helada y se centrifugó a baja velocidad (500 x g) a 5 °C durante 15 a 20 min. Se eliminó el sobrenadante junto con la capa superior del precipitado. Este procedimiento se repitió en varias ocasiones (generalmente más de 10), hasta que la suspensión de esporas estuviera casi totalmente libre de células vegetativas. Esta suspensión se mantuvo a 5 °C, y se utilizó en un período no mayor de 6 días.

MEDICION DE LA TERMOTOLERANCIA: Las suspensiones de esporas se ajustaron a una densidad óptica de 0.5 (600nm, en el espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 35). Se tomaron alícuotas de 1.2 ml de las muestras y se colocaron en tubos

Pyrex de 6mm de diámetro, a los cuales se les selló sus extremos con fuego.

Los tubos fueron colocados a 75 °C durante 15 min para la activación de las esporas, y después sometidos a 85 o 95 °C en un baño de agua, por intervalos de tiempo diferentes, e inmediatamente se enfriaron en un baño de agua helada.

Para determinar la cantidad de esporas sobrevivientes en las suspensiones calentadas, se abrió el tubo asépticamente, se tomó 1 ml de la muestra y se vertió en 9 ml de agua peptonada al 0.1%. Esta suspensión se trató con ultrasonido en forma suave (10 seg a 60 unidades de intensidad, en el sonicador ya descrito) para dispersar las esporas aglutinadas.

A partir de esa suspensión se hicieron diluciones decimales (0.2ml en 1.8 ml) en agua peptonada, utilizando una puntilla de micropipeta para cada dilución. A partir de las suspensiones diluidas se sembró en medio nutritivo con agar de la misma manera en que se describió para la determinación de esporas.

Tomando en cuenta que una reducción decimal en el número de esporas sobrevivientes siempre es causada por el mismo número de minutos de calentamiento, se puede usar ese valor como una medida de resistencia al calor. Ese tiempo se le conoce como valor "D" (Ingram, M., 1969).

Eso significa que si el tiempo de calentamiento a una temperatura particular es graficado contra el $\log_{10} n$ (donde n es el número de esporas sobrevivientes en cierto tiempo), resulta una línea recta, que representa una relación descrita como exponencial (Ingram, M., 1969).

Para el trazado de la línea recta, se empleó el método de regresión lineal, y para comparación de pendientes se utilizó el análisis de covarianza (Zar, J.H. 1974).

PRODUCCION, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DEL CUERPO BRILLANTE INTRACELULAR

CULTIVO: Se activó la cepa NCTC 8239, de la manera ya descrita y de ese cultivo se inoculó al 1% un nuevo caldo con tioglicolato sin agar (4 lts) y se incubó a 46°C durante 10 a 12 hrs.

AISLAMIENTO: Las células bacterianas se colectaron mediante centrifugación a 10,000 x g durante 15 min a 4 °C, y se eliminó el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendió en amortiguador de fosfatos pH 7.0 (0.02M) helado que contenía polimetilsulfóxido (PMSF) (Sigma Chem. Co.) 1mM y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1mM. Para romper las células, la suspensión se sometió a 16,000psi en

una prensa francesa (SLM Instruments Inc) con su celda pre-enfriada a 2°C y usando un pistón de una pulgada de diámetro; este procedimiento se repitió en dos ocasiones.

La suspensión obtenida, se centrifugó a 500 x g durante 25 min a 5°C, se eliminó el sobrenadante, y el precipitado se lavó en dos ocasiones en el amortiguador de fosfatos con PMSF y EDTA. La muestra lavada, se reconstituyó en un pequeño volumen del mismo amortiguador y se sometió a ultrasonido (60 unidades de intensidad durante 10 seg), de esa suspensión se tomaron 2 a 3 ml y se centrifugaron en gradientes continuos de densidad de: glucosa (25 - 70%), de diatrizoato de sodio (5 - 40%) o de bromuro de sodio (10 - 40%), a 450 x g y 5°C durante 1.45 hrs para el de glucosa, y 30 min para el resto de los gradientes . Tanto las soluciones de glucosa como las de diatrizoato contenían PMSF y EDTA 1mM. El volumen de los gradientes fué de aproximadamente 34ml y se construyeron mediante un formador de gradientes Pace (Isolab Inc) de 100ml.

El gradiente se fraccionó en alícuotas de 2 ml utilizando una pipeta Pasteur. Las muestras que contenían los cuerpos en estudio se colectaron y lavaron con la misma solución amortiguadora, y se sometieron nuevamente a ultrasonido y después a un nuevo gradiente, repitiéndose el procedimiento.

DETERMINACION DE GLUCOGENO: Para determinar la presencia de este polisacárido en las células vegetativas se tomó como base el procedimiento empleado por Schoemaker, Clark y Saukkonen (1981) para la caracterización de gránulos de glucógeno en una cepa de *Escherichia coli*.

En este caso se activó la cepa NCTC 8239 de la manera descrita, inoculándose 40ml de caldo con tioglicolato sin agar e incubándose a 37°C durante 16 a 18 hrs. Con este cultivo se inocularon 4 litros de caldo tioglicolato sin agar y se incubaron a 46 °C durante 10 a 12 hrs.

Las células se colectaron por centrifugación a 10,000 x g por 15 min a 4°C y se lavaron dos veces con solución salina helada y dos con agua destilada helada. El paquete celular obtenido se liofilizó y se mantuvo en refrigeración.

Del material liofilizado se tomó 1.5 gr y se sometió a hidrólisis con 15 ml de KOH al 30% en un baño de agua hirviendo durante 75 min. Después de enfriarse se le añadió 15 ml de etanol al 95% helado y se mantuvo durante 12 a 14 hrs a 5°C.

La muestra se centrifugó a 18,000 x g por 15 min. El precipitado se disolvió en agua destilada (15ml) y se centrifugó a 4,000 x g durante 15 min para eliminar el material insoluble.

El sobrenadante se volvió a precipitar mediante un

volumen igual de etanol absoluto frío y se mantuvo a 4°C durante 2 hrs. La muestra se volvió a centrifugar a 18,000 x g durante 15 min.

El precipitado se hidrolizó después con H₂SO₄ 2M en un baño de agua hirviendo, se enfrió y se neutralizó con K₂HPO₄ 2M.

La presencia de glucosa en el hidrolizado, se determinó mediante la técnica de la glucosa oxidasa (Sigma Chem. Co.)

DETERMINACION DE FOSFORO INORGANICO : Para este análisis, se empleó una muestra de CBI aislados, en una concentración de 1mg/ml.

A 100 µl de la suspensión de CBI, se agregaron 900 µl de una solución que contenía: 1.2 ml de H₂SO₄ 10M, 4.8 ml de agua, 2 ml de molibdato de amonio al 2.5% y 2 ml de ácido ascórbico al 10%, la cual fue preparada antes de usarse. La suspensión se mezcló en un tubo y se mantuvo en un baño de agua a 37°C durante 2 hrs. Después se determinó la absorbancia a 820 nm. Los estándares utilizados fueron soluciones de NaH₂PO₄ en concentraciones de 10 a 60 µg/ml (Keleti, G., y W.L. Lederer, 1974).

DETERMINACION DE POLI-β-HIDROXIBUTIRATO: Para determinar la presencia de este compuesto en los CBI aislados, se utilizó

el procedimiento de Law y Slepecky (1961).

El experimento se llevó a cabo en tubos de centrifuga de policarbonato, los cuales se lavaron previamente con etanol y cloroformo caliente. Se transfirió 1 ml de la suspensión de CBI (1mg/ml) a un tubo de centrifuga, y se le agregó 1 ml de solución de hipoclorito de sodio al 80%. La mezcla se incubó a 38°C por 1 hr y después se centrifugó y lavó tres veces con 2 ml de agua bidestilada, acetona al 90% y etanol al 95% respectivamente.

El precipitado se disolvió con 6 ml de cloroformo caliente, se filtró en papel y se dejó evaporar. Luego se agregaron 10 ml de H₂SO₄ concentrado, y se calentó a 100°C (en un baño de agua) por 10 min. Después de que la muestra se enfrió, se le determinó la absorbancia a 235nm, utilizando ácido sulfúrico como blanco, y poli-β-hidroxi-butirato aislado de *Alcaligenes sp.* (Sigma Chem. Co.) en varias concentraciones como estándar.

SOLUBILIZACION DEL CBI: Con el fin de solubilizar el CBI, se trató una muestra de esta inclusión (1mg/ml) con las siguientes tratamientos: a) Triton X-100 al 1%, b) CHAPS al 1%, c) Colato de Sodio al 1%, d) Urea 5M, e) SDS al 1%, f) SDS al 10%, g) SDS al 1% y Ditiotreitól (DTT) 0.05M, h) SDS al 1% y β-Mercaptoetanol al 2%, i) NaOH 0.1N, j) 75°C

durante 30 min.

La solubilización se determinó mediante la observación de la muestra al microscopio de contraste de fases y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no disociantes.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES: Para este experimento se siguió la metodología descrita por Hames (1981) con ligeras modificaciones. Esta consistió brevemente de lo siguiente: La muestra de proteína (1mg/ml) se colocó en una solución desnaturalizante (que contenía: 10% de β -mercaptoetanol (Sigma Chem. Co.) o Ditiotritol 0.05M (Research Organics Inc), SDS al 5% (p/v), 0.01% de azul de bromofenol, glicerol al 20 % (p/v) y Tris al 1.5%, con un pH de 6.8) en proporción 1:1. Después la suspensión se mantuvo en un baño de agua hirviendo por 2 a 3 min.

Esa solución se centrifugó a 6,000 x g para eliminar el material insoluble, y una alícuota (20 a 40 μ l) se sometió a electroforesis en un gel separador de poliacrilamida al 10% de 3 mm de grueso con un gel concentrador al 2.5%. Se aplicaron 130 Volts para la concentración de proteínas, y después 150 Volts para la separación. Se utilizó ventilación

para mantener fresco el gel.

Después de la electroforesis, el gel se colocó en ácido tricloroacético al 12.5% durante 30 min, se lavó en agua y después se mantuvo en la solución colorante (que contenía: azul Coomassie R-250 al 0.1% (p/v), metanol al 50% y ácido acético al 10%) durante toda la noche (12 a 14 hrs) con agitación continua. Para eliminar el exceso de colorante en el gel, éste se mantuvo en ácido acético al 10% con agitación constante y con varios cambios de esa solución.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron: anhidrasa carbónica (PM 29,000), albúmina de huevo (PM 45,000), albúmina bovina (PM 66,000), fosforilasa B (PM 97,400), β -galactosidasa (PM 116,000) y miosina (PM 205,000), (Sigma Chem. Co.).

EN CONDICIONES NO DEBNATURALIZANTES: en forma general se siguió un procedimiento similar al anterior, con excepción de que no se utilizó SDS ni β -mercaptoetanol o ditioneitol, tampoco se calentó la muestra antes de colocarse en el gel. Sin embargo la electroforesis se llevó a cabo a 5 °C.

DETERMINACION DE GLUCOPROTEINAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Para determinar la presencia de carbohidratos en las bandas de proteína de nuestro interés, se utilizó el

procedimiento de Tinción de Plata desarrollado por Dubray y Bezard (Andrews, A.T., 1987). Este método es altamente sensible para la detección de glucoproteínas en gel de poliacrilamida, y es una modificación del empleado para detección de proteínas.

Después de realizarse la electroforesis en gel de poliacrilamida, el gel se sometió al siguiente procedimiento:

- 1.- El gel se colocó en una solución de isopropanol al 25% conteniendo ácido acético al 10% durante toda la noche (12 hrs aprox.).
- 2.- Después se transfirió a una solución de ácido acético al 7.5% por 30 min.
- 3.- Enseguida se suspendió en ácido peryódico al 0.2% durante 60 min a 5°C.
- 4.- El gel se lavó 3 veces en agua destilada.
- 5.- Después de eliminar el agua, se le agregó una solución de plata amoniacal (recientemente preparada) agitando continuamente, manteniéndose en esas condiciones por 15 min.
- 6.- Luego el gel se lavó nuevamente en agua.
- 7.- Posteriormente se transfirió a una solución de ácido cítrico al 0.005% con formaldehído al 0.019%. Las bandas de glucoproteína se hicieron aparentes en este paso. El tiempo

de tratamiento en este estadio duró de 15 a 20 min.

B.- El gel se lavó con varios cambios de agua destilada por más de una hr.

DETERMINACION DE PROTEINAS

METODO DE BRADFORD: Se siguió el procedimiento descrito por ese autor (1976), el cual consistió de lo siguiente: se preparó el reactivo de Bradford que estaba constituido por: 100mg de azul brillante Coomassie G-250, 50ml de etanol al 95% y 100ml de ácido fosfórico al 85% (p/v) diluidos a 1 litro de agua bidestilada.

Se tomaron 100 μ l de la solución problema o del estándar y se colocaron en un tubo, luego se le añadieron 5ml del reactivo de Bradford, se mezcló y se dejó reposar durante 15 min. Se determinó la absorbancia a 595 nm.

METODO DE LOWRY: El procedimiento empleado es una modificación del reportado por Lowry y otros (Garvey, J.S., N.E. Cremer, y D.H. Sussdorf, 1977)

Para este procedimiento se prepararon las siguientes soluciones: A-1: 2 gr de tartrato de sodio disuelto y aforado a 100ml de agua, A-2: 1 gr de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disuelto y aforado a 100 ml de agua y A-3: 20 gr de Na_2CO_3 disueltos y

aforados a 1 lt con NaOH 0.1N. Se preparó la solución A con una mezcla de las soluciones anteriores: 0.5ml de A-1 + 0.5ml de A-2 + 50.0ml de A-3. Por otra parte se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Chem. Co.) a una dilución 1.0N.

Se tomaron 0.4 ml de las muestras o estándares y se les agregó 2 ml de la solución A, se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Después se le agregaron 200 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 min. Enseguida se determinó la absorbancia a 500 nm.

Para los dos métodos, se utilizaron soluciones estándar de albúmina sérica bovina (ASB) o una mezcla de ASB y γ -globulina (Sigma Chem. Co.) en proporción 1:1.

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Las células cultivadas en el medio DS con almidón con y sin α -amilasa, tenían 7 hrs de incubación antes de ser procesadas para su observación; en el caso de las cultivadas en el mismo medio pero con rafinosa, se emplearon cepas de 5.5 a 6 hrs de incubación. Para observar las células vegetativas con el CBI, se utilizaron cultivos de 10 hrs. Por otro lado, para el análisis de los CBI aislados, se emplearon muestras obtenidas de la centrifugación en

gradientes de sacarosa.

Las muestras se colocaron en una solución de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos pH 7.2 (0.1M) y se centrifugó a 3,000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después se utilizó una nueva solución fijadora y se mantuvo a 4°C durante 2 hrs. Después de lavarse con amortiguador de cacodilatos, la muestra se embebió con un volumen igual de agar Noble al 2% disuelto en amortiguador de cacodilatos pH 7.2 0.2M. Enseguida la muestra se fijó con tetraóxido de osmio al 1% disuelto en el amortiguador de cacodilatos durante 12 a 15 hrs a 4°C.

Posteriormente la muestra se deshidrató en una serie de soluciones de etanol al 20, 50, 70, y 95% durante 15 min en cada concentración, y finalmente en una solución al 100% durante 30 min. Después, el material se infiltró en resina Epon-Araldita disuelta en etanol en las siguientes proporciones y tiempos: 1:2 por 60 min, después 1:1 durante 2 hrs, luego 2:1 por 12 a 15 hrs, y al final resina pura durante 3 hrs. La temperatura usada para la infiltración fue de 70°C.

Los cortes se tixeron con acetato de uranilo al 5% (p/v) durante 15 min y después con acetato de plomo al 0.4% (p/v) también durante 15 min.

Las muestras se examinaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión marca Joel modelo JS-100.

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Los CBI aislados mediante gradientes de sacarosa, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% disuelto en amortiguador de cacodilatos pH 7.2 (0.1M), a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugó a 3,000 r.p.m. por 5 min, se desechó el sobrenadante, y el precipitado se continuó fijando en una nueva solución de glutaraldehído, manteniéndose a 4°C durante 2 hrs.

La muestra se colocó en un filtro Millipore HAWG-01300 (poro de 0.45 μ m) mediante una jeringa plástica. El filtro se colocó luego en amortiguador de cacodilatos durante 30 min y después se mantuvo en una solución de tetraóxido de osmio al 1% (disuelta en el mismo amortiguador) por 12 a 16 hrs. Después de lavarse en el amortiguador, se deshidrató y secó al punto crítico. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de barrido ISI Super III A.

RESULTADOS

PRODUCCION Y PURIFICACION DE ENTEROTOXINA: Siguiendo el procedimiento descrito, durante la cromatografía se obtuvieron dos grupos de fracciones que mostraron absorbancia a 280nm (Fig. 2), el grupo que apareció primero tenía una absorbancia mayor a 260nm que a 280nm, pero el

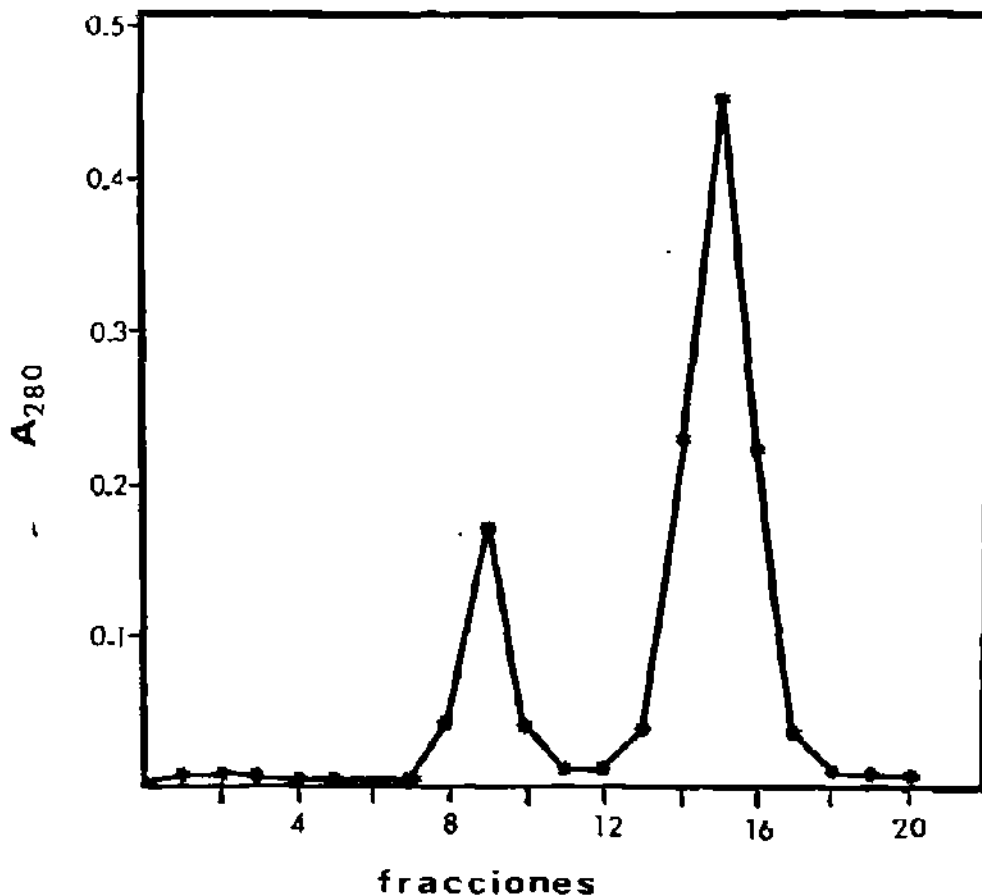


Fig. 2. Fraccionamiento de la elución durante la filtración en gel de la enterotoxina. Se utilizó una columna de 2.5 x 40 cm., empaquetada con Sephadex G-100. El flujo fue de 19 a 21 ml/hr, colectándose fracciones de 5 ml.

segundo grupo mostró mayor absorbancia a 280 que a 260nm.

Al someterse a inmunodifusión de Ouchterlony, el grupo de fracciones con mayor absorbancia a 280nm fué el único que mostró identidad inmunológica con la enterotoxina estándar.

El análisis de pureza de la enterotoxina mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no disociantes, mostró una sola banda que correspondía a la de esa proteína (dato no mostrado).

CULTIVO DE LAS CEPAS EN EL MEDIO DS CON ALMIDON O RAFINOSA ESTUDIOS PRELIMINARES:

En los estudios preliminares, se cultivaron las cepas NCTC 8238 y NCTC 8239 en el medio DS con almidón a 37, 43 y 46°C, con el fin de determinar el crecimiento de la bacteria entre el rango de su temperatura óptima de crecimiento y compararlo con el obtenido a 37°C. Se observó (Fig. 3) que las dos cepas mostraban un crecimiento muy pobre a 46°C a diferencia del obtenido a 37°C, la mayoría de esas células eran vegetativas (Fig. 8), y solo un número reducido de ellas iniciaban el proceso de esporulación pero no eran capaces de finalizarlo. Un comportamiento similar se observó a 43°C. Otras cepas enterotoxigénicas como la FD-1041, la FD-884 y la NCTC 10240, también mostraron un escaso crecimiento a esas temperaturas (dato no mostrado).

Cuando se sustituyó el almidón del medio de cultivo por

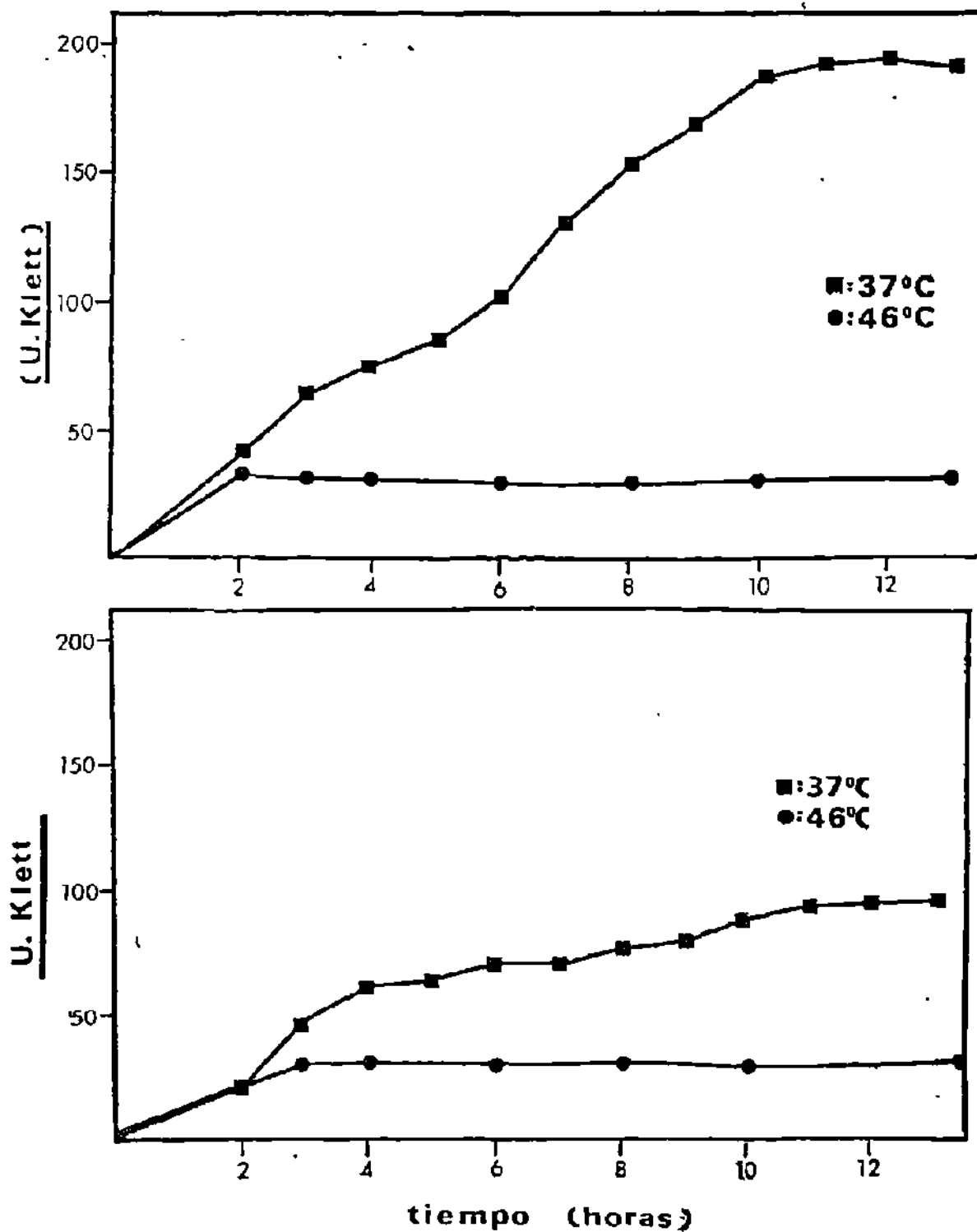


Fig. 3. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *C. perfringens* en el medio DS con almidón a 37 y 46°C, a) cepa NCTC 8239, b) cepa NCTC 8238.

rafinosa, la cepa NCTC 8239 mostró a 46°C un crecimiento similar al obtenido a 37°C. (Fig. 4), además de que también se observó la formación de un gran número de células con esporas maduras. Un comportamiento similar fué mostrado por la cepa NCTC 8238. Estos datos nos permitieron concluir que la rafinosa era un carbohidrato más apropiado para obtener mayores proporciones de crecimiento y de esporas a la temperatura óptima de crecimiento.

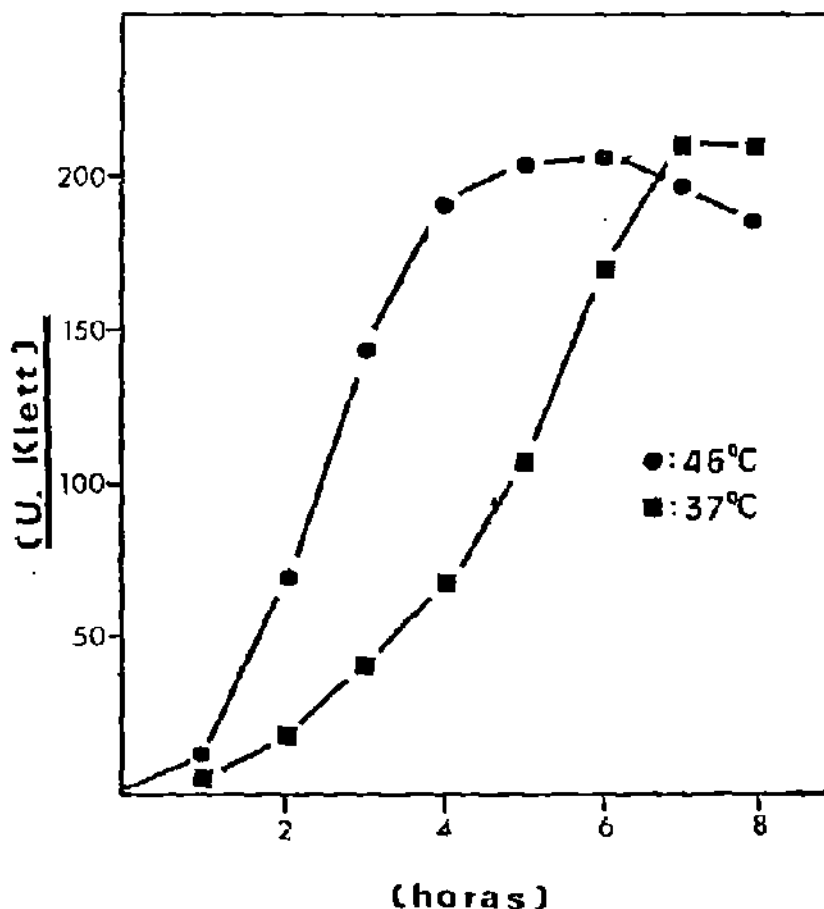


Fig. 4. Efecto de la rafinosa en el crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 a 37 y 46°C, en el medio DS.

CULTIVO DE LAS CEPAS EN EL MEDIO DB CON ALMIDON

Habiéndose observado en los experimentos preliminares que: 1) cuando se utilizaba almidón en el medio de cultivo a 43 y 46°C se obtenía un pobre crecimiento y las células que iniciaban la esporulación eran incapaces de terminarla y 2) que cuando se sustituía el almidón por rafinosa se obtenía un buen crecimiento y se observaban un gran número de esporas maduras, se pensó que el almidón podía ser el factor responsable de la incapacidad de crecer y esporular de las cepas a esa temperatura.

Para determinar si el almidón era utilizado por la bacteria a 46°C, se procedió a analizar la concentración de este carbohidrato durante el cultivo a 37 y 46°C de dos cepas enterotoxigénicas.

En la cepa NCTC 8239 se demostró (Fig 5a) que a 37°C, a medida que el cultivo crecía, la concentración de almidón en el medio disminuía; sin embargo a 46°C la concentración de ese carbohidrato permaneció casi estable mostrándose un crecimiento muy pobre. Un comportamiento similar fue mostrado por la cepa NCTC 8238 (Fig 5b); en esta cepa el crecimiento a 37°C fue más lento que en la cepa NCTC 8239, notándose también una disminución más lenta en la hidrólisis del almidón del medio de cultivo.

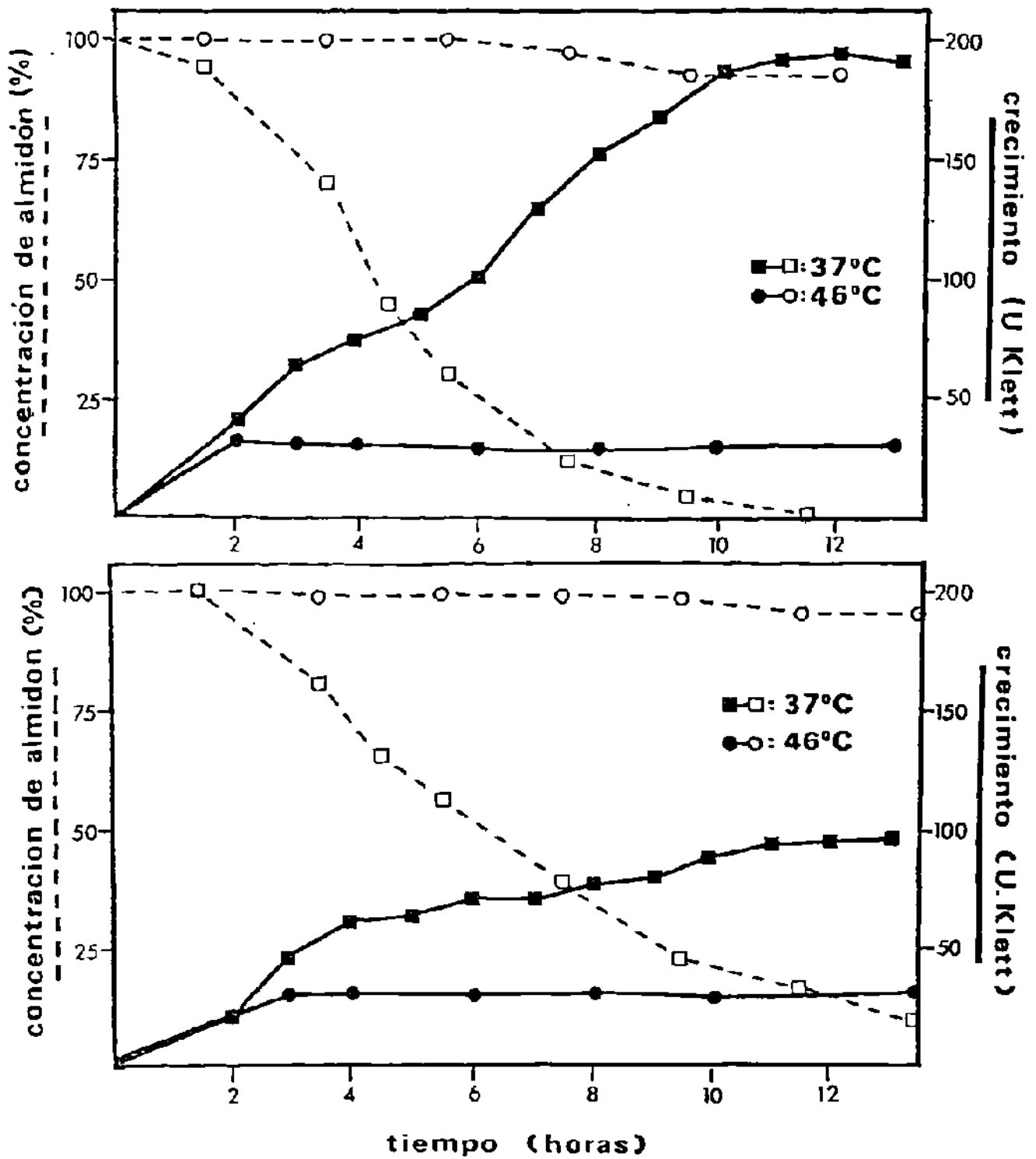


Fig. 5. Crecimiento de *C. perfringens* y concentración del almidón en el medio DS, durante el cultivo de las cepas NCTC 8239 (a) y NCTC 8238 (b).

Los resultados obtenidos en esos experimentos hacían pensar en la posibilidad de que el almidón no era utilizado porque la bacteria era incapaz de hidrolizarlo a esa temperatura. Para comprobar esta idea se añadió α -amilasa de *B. licheniformis* a los cultivos de las dos cepas a las 3, 4 y 5 horas, observándose en la cepa NCTC 8239 un incremento inmediato en el crecimiento (Fig. 6) llegando a formar 3.9×10^7 esporas por ml de cultivo (Tabla 1), además como era de esperarse, la concentración de almidón disminuyó rápidamente

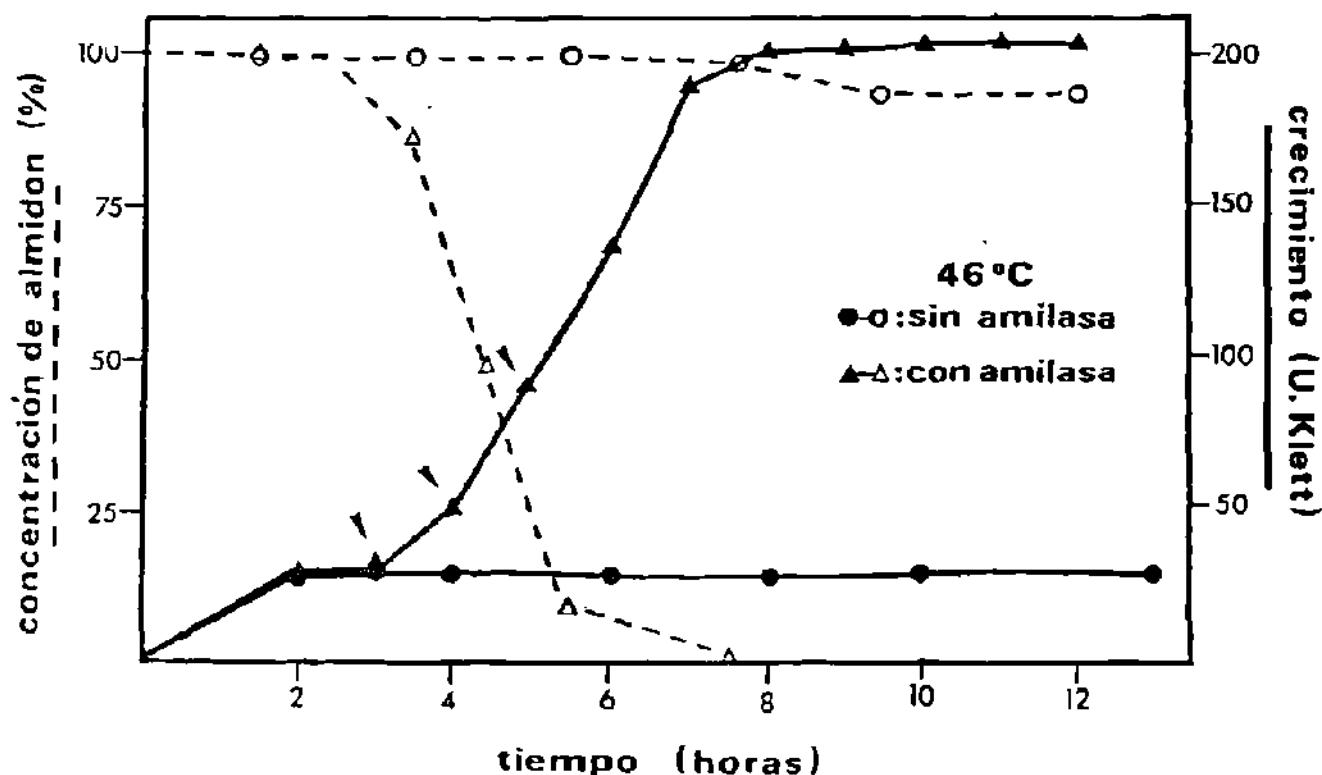


Fig. 6. Efecto de la adición de α -amilasa de *B. licheniformis*, a los cultivos de *C. perfringens* cepa NCTC 8239, en el medio DS con almidón incubados a 46°C. Las flechas indican el tiempo de adición de la enzima

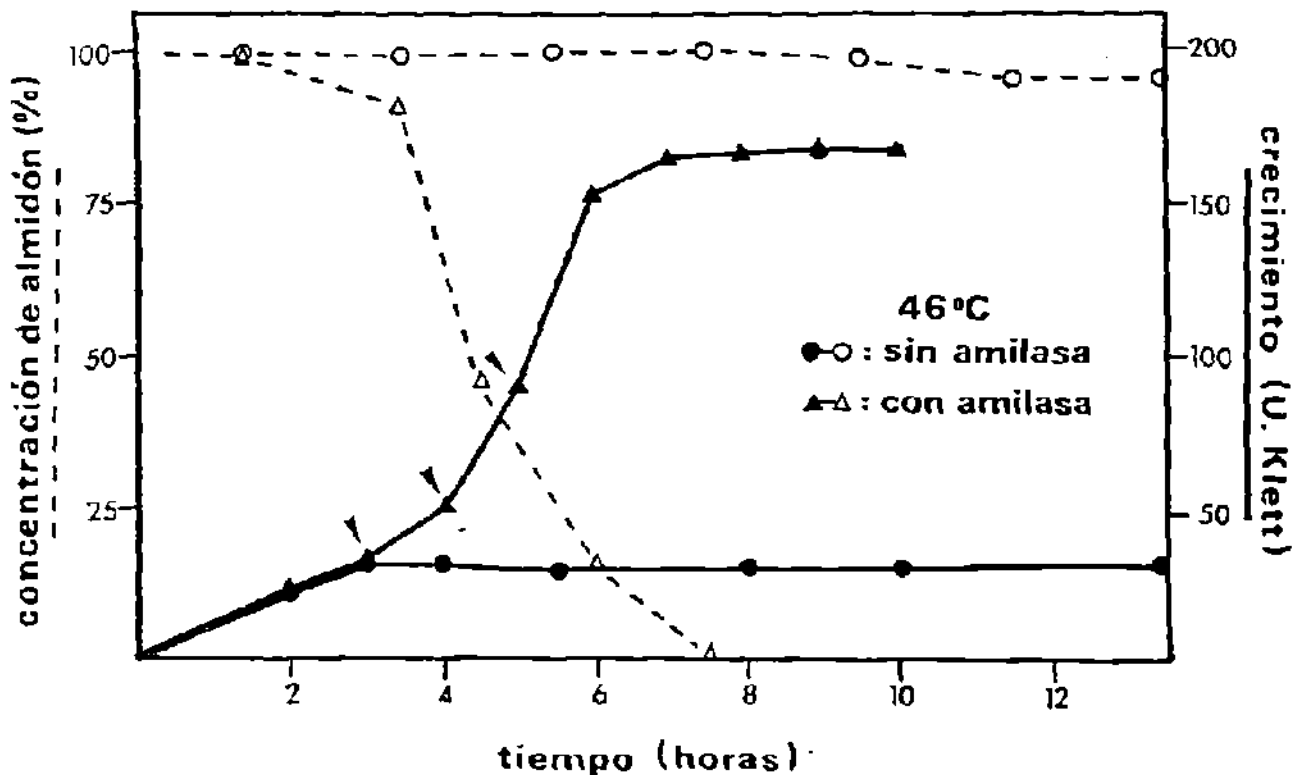


Fig. 7. Efecto de la adición de α -amilasa de *B. licheniformis*, a los cultivos de *C. perfringens* cepa NCTC 8238, en el medio DS con almidón incubados a 46°C. Las flechas indican el tiempo de adición de la enzima.

(Fig. 6). Por su parte la cepa NCTC 8238, también mostró un gran crecimiento (Fig. 7) llegando a producir 5.2×10^6 esporas por ml del cultivo (Tabla 1, Fig. 9). Muchas de las células en esporulación de esos cultivos, al observarse al microscopio de contraste de fases, mostraban la inclusión intracelular en forma de barra, que indicaba la formación de enterotoxina intracelular.

Otros carbohidratos como la maltosa y la glucosa al ser

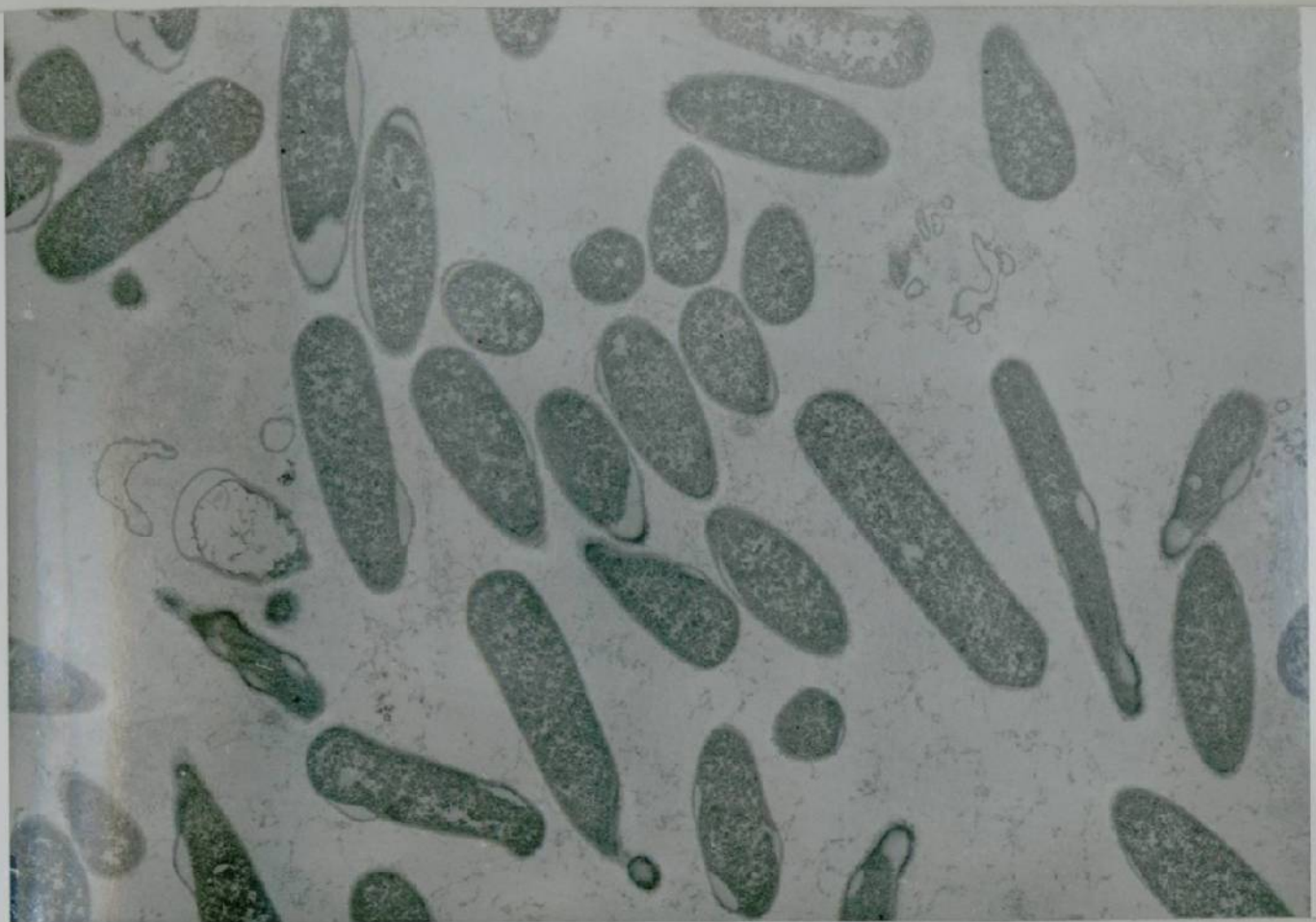


Fig. 8. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de células de *C. perfringens* cepa NCTC 8238, cultivadas a 43°C en el medio DS con almidón (11,400 X)

utilizados como sustitutos del almidón en el medio DS también promovieron el crecimiento de esas cepas a 43 y 46°C, aunque la producción de esporas fué nula o muy escasa.

Por otro lado, se analizaron también dos cepas no productoras de enterotoxina, y estas mostraron un



Fig. 9. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de células de *C. perfringens* cepa NCTC 8238, cultivadas a 43°C en el medio DS con almidón + α -amilasa. Se observa una célula en proceso de esporulación (19,000 X)

comportamiento diferente: la cepa FD-1 cultivada a 46°C en el medio DS con almidón sin agregarle amilasa, produjo un crecimiento similar al observado a 37°C, además de que también fue capaz de producir 4.2×10^7 esporas/ml a esa temperatura (Tabla 1). Por otra parte el crecimiento a

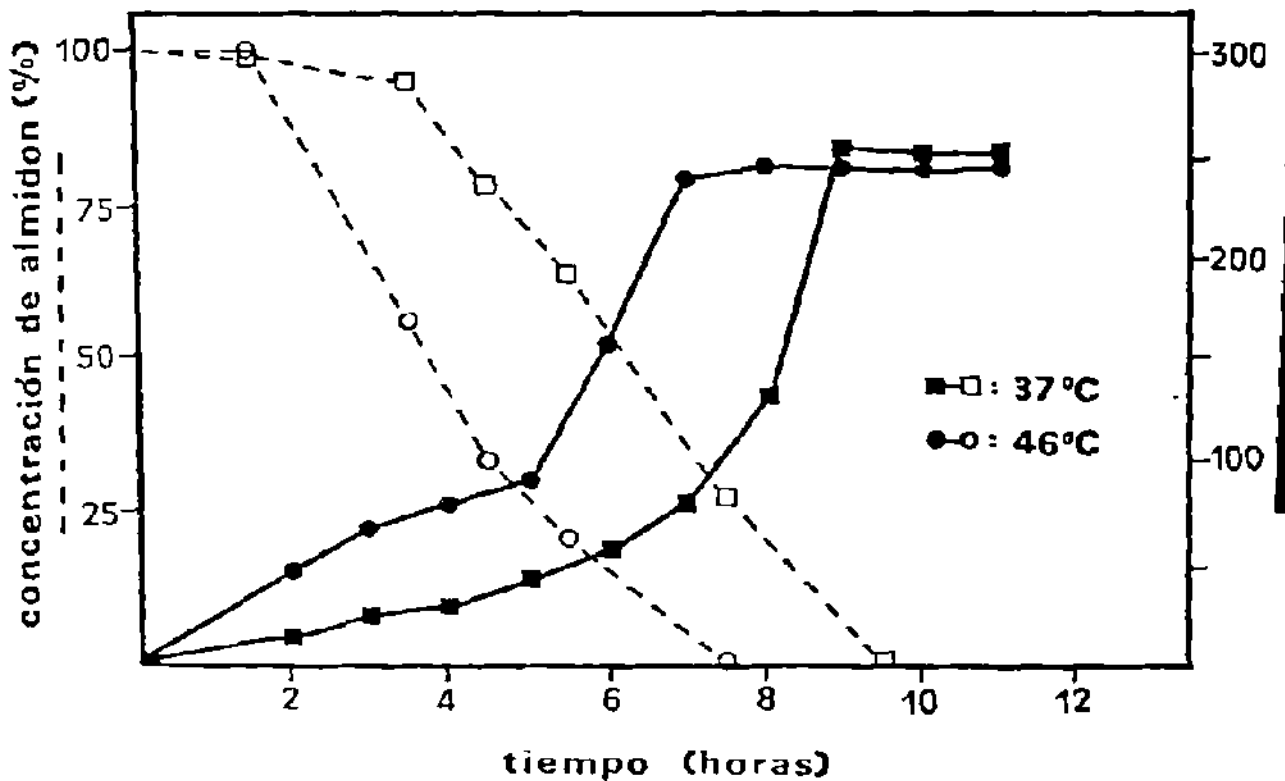


Fig.10. Crecimiento e hidrólisis de almidón de *C.perfringens* cepa FD-1 (no enterotoxigénica) en el medio DS a 37 y 46 °C.

46°C fué más acelerado que el de 37°C, provocándose también una disminución más rápida del almidón en el cultivo. (Fig. 10) . Otra cepa la ATCC 3624, también mostró un crecimiento muy rápido a 46°C sin necesidad de agregar amilasa; de igual manera que en la otra cepa, la concentración del carbohidrato también disminuyó rápidamente (Fig 11). En esta última cepa sin embargo, la producción de esporas a 46°C fué menor (5.3×10^9 /ml) que las obtenidas a 37°C (3.1×10^7 /ml) (Tabla 1).

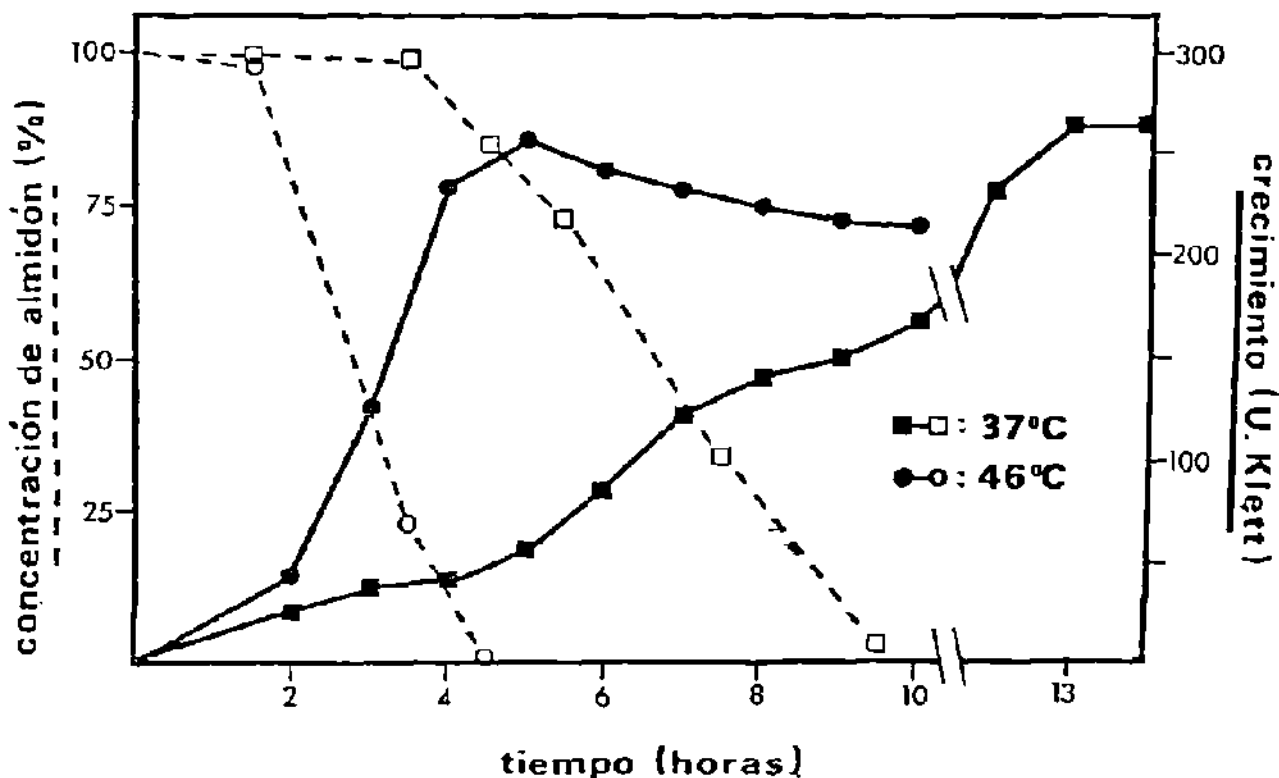


Fig. 11. Crecimiento e hidrólisis de almidón de *C. perfringens* cepa ATCC 3624 (no enterotoxigénica) a 37 y 46°C en el medio DS.

T°C	amilasa añadida*	esporas / ml			
		NCTC 8239	NCTC 8238	FD-1	ATCC 3624
37	0	3.9×10^7	5.2×10^6	3.0×10^7	3.1×10^7
46	0	< 100	< 100	4.2×10^7	5.3×10^5
46	90	3.1×10^6	3.4×10^6	NR ⁺	NR

*1 µg de enzima/10 ml de cultivo. ⁺NR: no realizado

Tabla 1. Producción de esporas en el cultivo de varias cepas de *C. perfringens*, en presencia o ausencia de α-amilasa de *B. licheniformis*, a 37 y 46°C. La determinación se realizó a las 12 hr de incubación de los cultivos.

CULTIVO DE LAS CEPAS EN EL MEDIO DS CON RAFINOSA

Debido a que todas las cepas empleadas en estos experimentos, con excepción de la FD-1041, mostraron una velocidad de crecimiento " μ " más rápida a 43°C que a 37,46 o 49°C, se decidió usar 43°C como la temperatura de incubación de estos cultivos.

Habiéndose demostrado en los estudios preliminares que la rafinosa favorecía el crecimiento y la esporulación de varias cepas en el rango de su TOC, pretendimos entonces utilizar este carbohidrato en el medio DS para demostrar y medir la producción de enterotoxina y de esporas a esa temperatura, sobre todo en aquellas cepas que habían sido aisladas de brotes de toxi-infecciones alimentarias.

Al cultivarse la cepa FD-1041, se observó un crecimiento similar a 37 y 43°C (Fig. 12), sin embargo a 43°C fué más acelerado que a 37°C. La proporción de esporas producidas también fué equiparable a las dos temperaturas, aunque a 43°C se detectaron más rápido (3 hrs.) que a 37°C (5 hrs.).

La enterotoxina también se produjo a 43°C, detectándose a las 3 horas de cultivo y mostrando un máximo de producción intracelular a las 5 horas (Fig. 13).

Cuando se observaron los cultivos al microscopio de

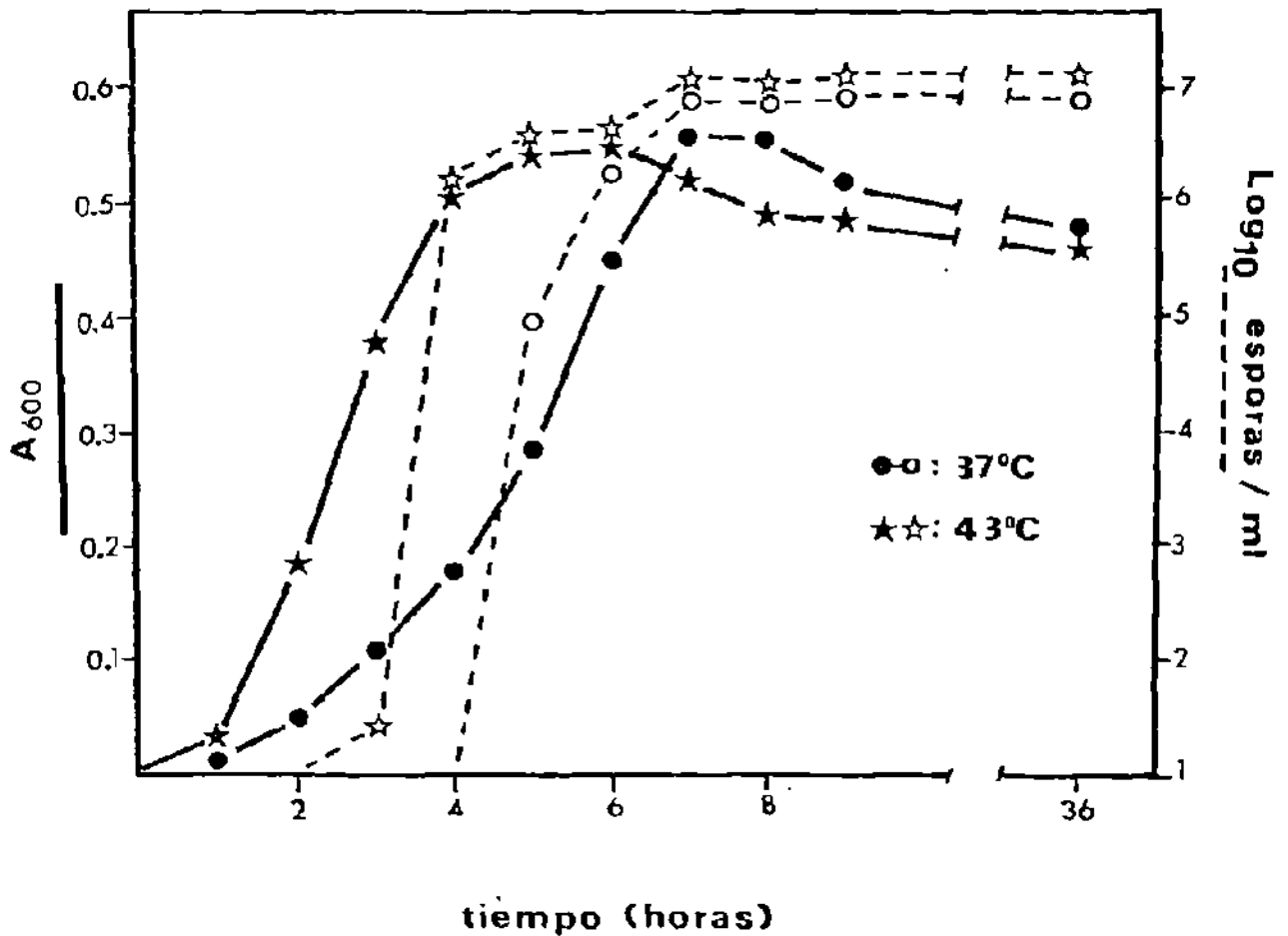


Fig. 12. Crecimiento y esporulación de *C. perfringens* cepa FD-1041, en el medio DS con rafinosa a 37 y 43°C.

Contraste de fases, se notó que las células en esporulación de esa cepa, contenían unos cuerpos intracelulares opacos. Mediante la observación al microscopio electrónico de cortes de esas células, se confirmó la formación de esporas y la presencia de grandes inclusiones citoplásmicas globulares (Fig. 14).

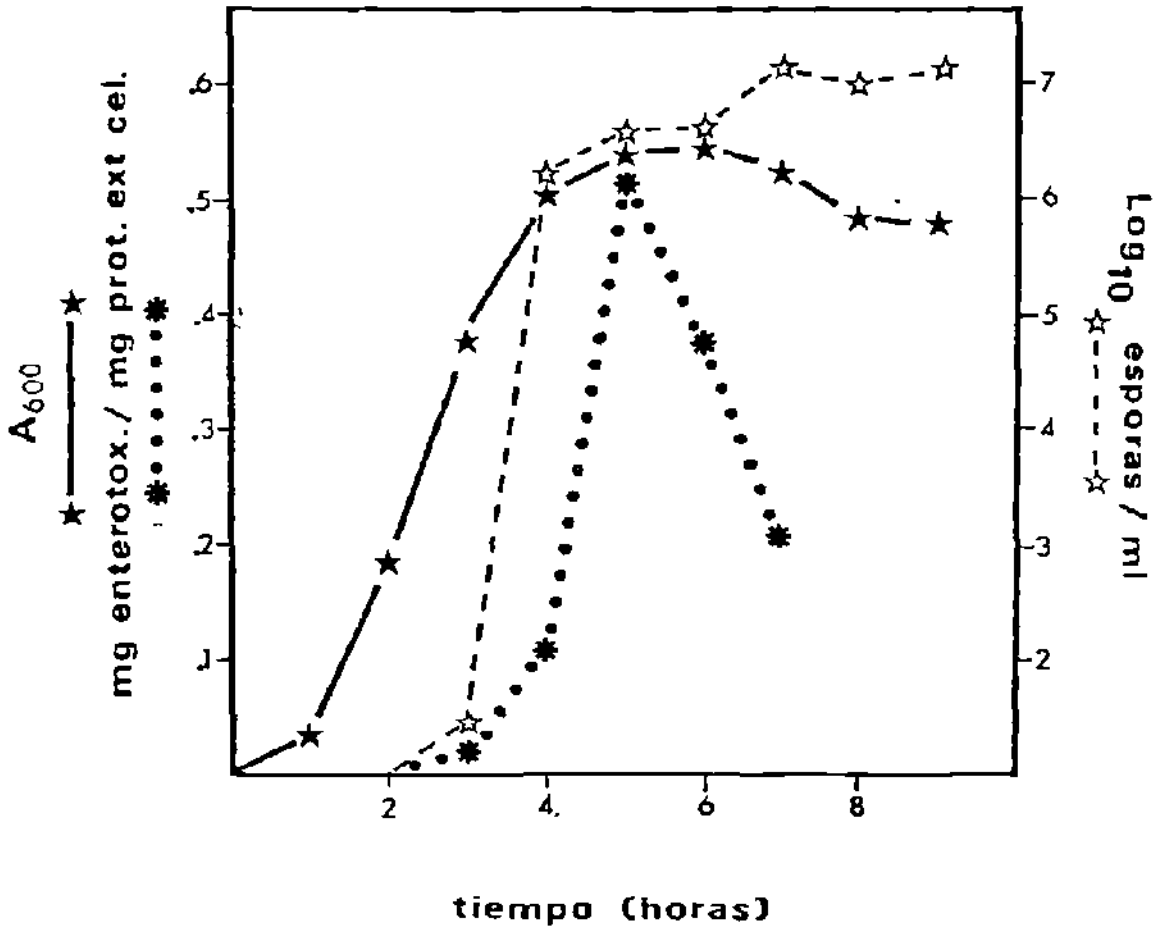


Fig. 13. Crecimiento, esporulación y producción de enterotoxina de *C. perfringens* cepa FD-1041 a 43°C.

Otras cepas como la NCTC 10240 (Fig. 15) y la FD-884 (no mostrada) mostraron también proporciones similares de producción de esporas y de enterotoxina a 37 y 43°C (Tabla 2). Las cepas no enterotoxigénicas FD-1 y ATCC 3624, tampoco produjeron enterotoxina detectable a 43°C, aunque sí un gran número de esporas a esa temperatura.



Fig. 14. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células de *C. perfringens* cepa FD-1041, cultivadas en el medio DS con rafinosa a 43°C, mostrando la espora en formación y el cuerpo globular intracelular (38,000 X).

La enterotoxina producida a 43°C por las cepas, mostró una reacción de identidad completa (inmunodifusión de Duchterlony) con la sintetizada a 37°C.

Habiéndose demostrado que la temperatura óptima de crecimiento era más favorable para la producción de

Cepa	T°C	Esporas/ml	Enterotoxina*
FD-1041	37	6.5×10^6	526
	43	1.3×10^7	513
FD-884	37	2.6×10^6	394
	43	9.1×10^6	392
NCTC 10240	37	2.4×10^7	337
	43	9.8×10^6	301
FD-1	37	2.6×10^7	ND ⁺
	43	1.1×10^7	ND
ATCC-3524	37	3.5×10^7	ND
	43	8.7×10^8	ND

*: µg de enterotoxina/mg de extracto celular

⁺ND: no detectable.

Tabla 2. Esporulación y producción de enterotoxina por varias cepas de *C. perfringens* cultivadas a 37 y 43°C en el medio DS con rafinosa.

enterotoxina que a 37°C, era necesario determinar si las células vegetativas no esporuladas eran capaces de producir enterotoxina a 43°C. Sin embargo en ninguna de las cepas estudiadas (FD-1041 y NCTC 8239) se detectó la presencia de la toxina.

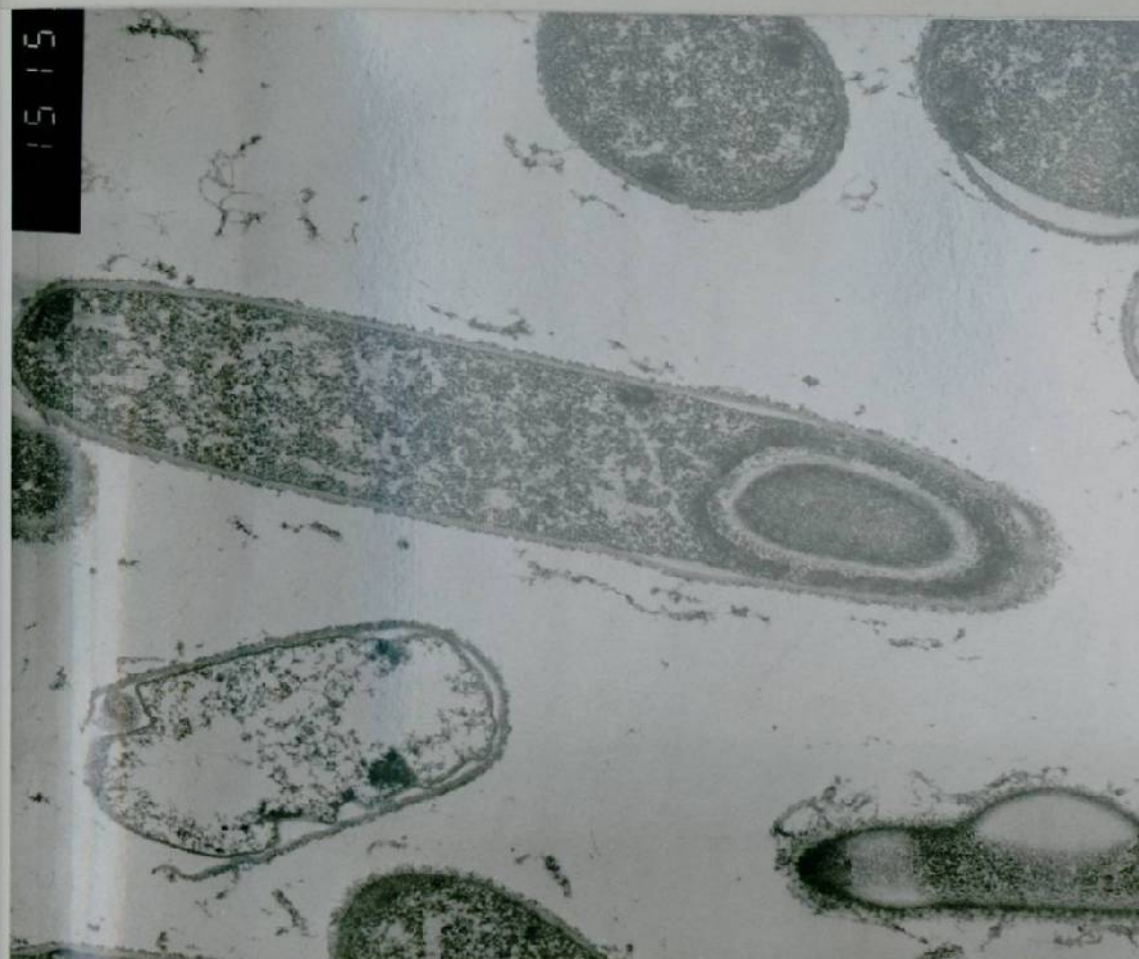


Fig. 15. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células de *C. perfringens* cepa NCTC 10240, cultivadas en el medio DS con rafinosa a 43°C, que muestran la espora en formación (28,500 X)

Durante el cultivo de las células vegetativas no esporuladas a 43°C, se detectó la presencia de un cuerpo esférico intracelular (Fig. 16, 17 y 18). Al observar las células al microscopio de contraste de fases, se notó que estas inclusiones eran muy brillantes y diferían de las

producidas por las células en esporulación en que éstas eran opacas.

Se demostró que este cuerpo brillante intracelular (CBI) se formaba principalmente entre 43 a 46°C. A 37°C no se detectó su presencia en la bacteria, mientras que a 49°C la inclusión aparecía en forma irregular dependiendo de la cepa.



Fig. 16. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión, de cortes de células vegetativas de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 mostrando el CBI (57,500 X).



Fig. 17. Fotografías al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células vegetativas de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 mostrando el CBI (36,000 X).



Fig. 18. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células vegetativas de *C. perfringens* cepa PS-52, mostrando el CBI (52,000 X).

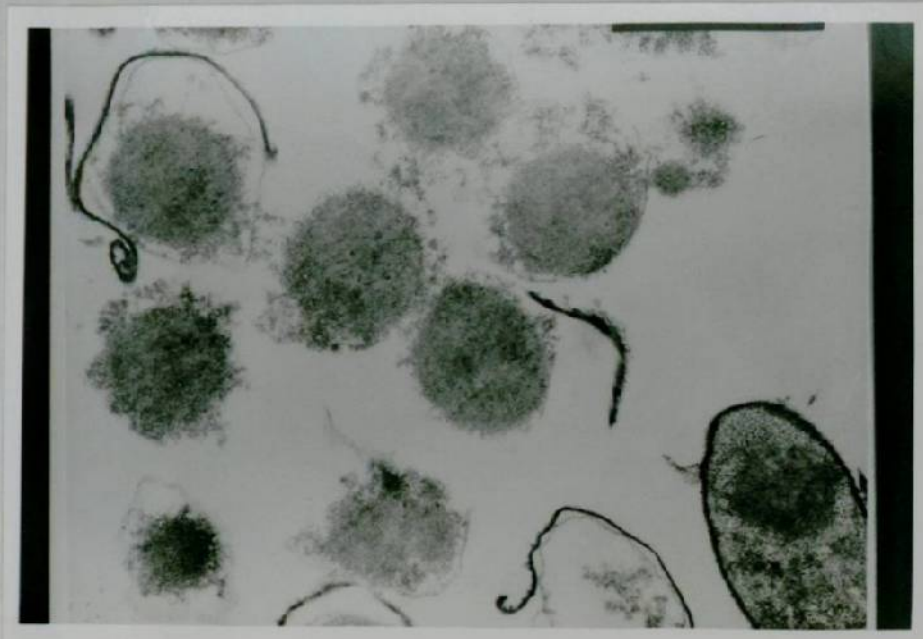


Fig. 19. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células de *C. perfringens* cepa NCTC 8239, rotas mediante alta presión, mostrando el CBI libre (52,000 X)

El aislamiento de la inclusión se logró mediante la centrifugación, de los restos particulados de células rotas, en gradientes de sacarosa o de diatrizoato de sodio, los cuales permitían la formación de una banda definida compuesta principalmente de CBI (fig. 20 y 21).

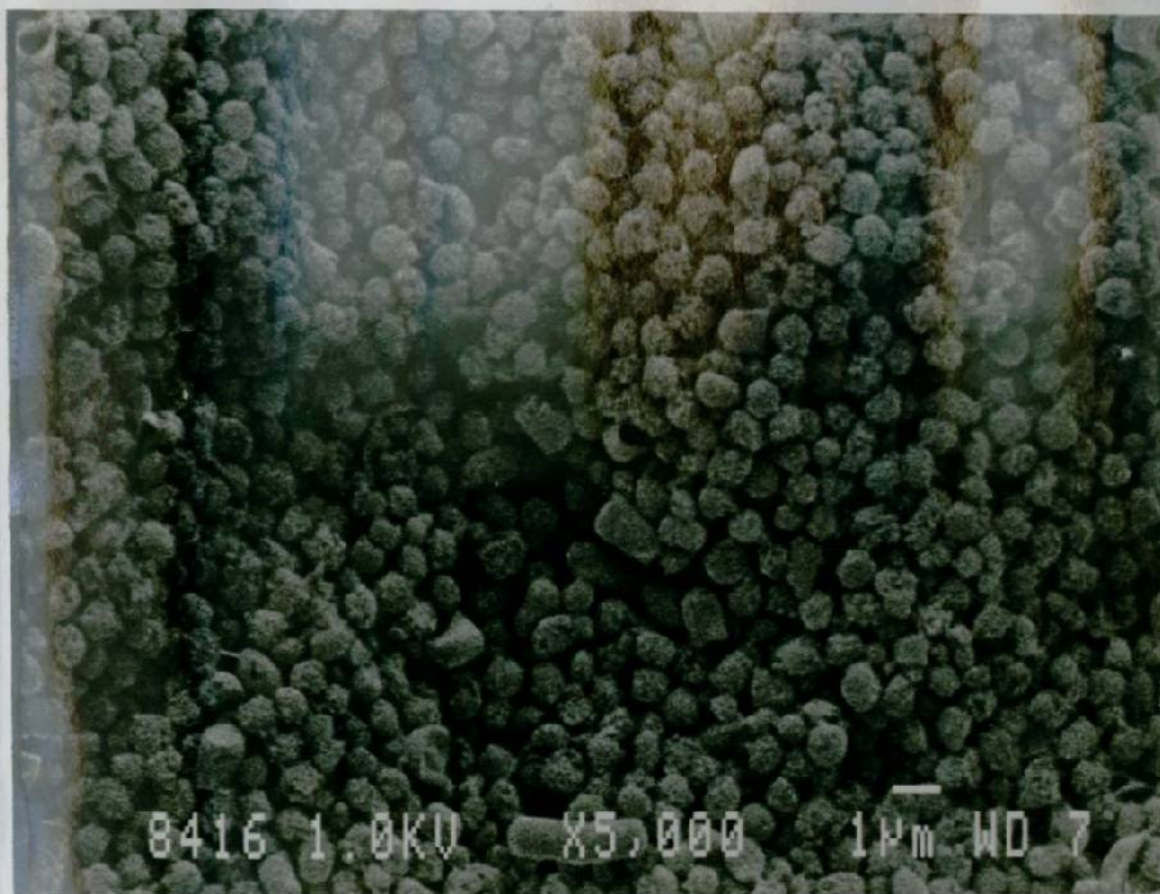


Fig. 20 . Fotografía al microscopio electrónico de barrido de CBI aislados mediante centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa (5,000 X).

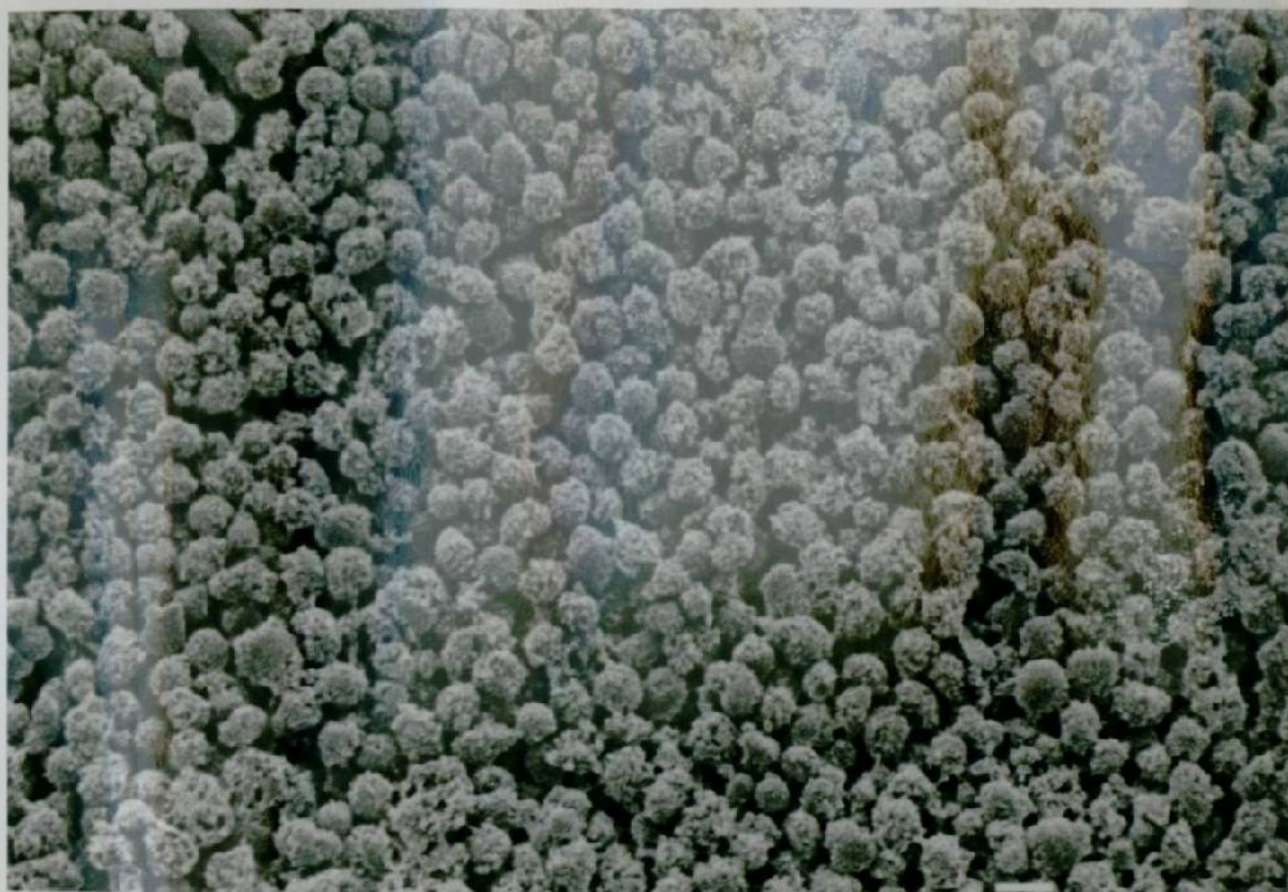


Fig. 21 . Fotografía al microscopio electrónico de barrido que muestra CBI aislados mediante centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa (5,000 X).

Una vez aislado, se procedió a analizar su composición química, determinándose la presencia de aquellos compuestos que pueden formar inclusiones intracelulares.

Los análisis no detectaron la presencia de

poli- β -hidroxibutirato, ni de glucógeno o de fosfato inorgánico en el CBI.

Sin embargo, mediante varios métodos se comprobó que la inclusión estaba compuesta principalmente por proteína. En el método de Bradford cuando se utilizó albúmina sérica bovina como estándar, el análisis indicó que el CBI estaba compuesto de proteína en un 85%, sin embargo, al utilizar una mezcla de la misma albúmina con γ -globulina en proporción 1:1 como estándar, se determinó que el cuerpo estaba constituido por 100% de esa sustancia. Una técnica alternativa, la de Lowry, utilizando sólo la albúmina como estándar, mostró que el 98% del peso del CBI era proteína.

Ya conociendo que el CBI estaba constituido principalmente de proteína, era necesario determinar si ésta era enterotoxina.

De los tratamientos usados para la solubilización del CBI, el SDS al 1 y 10% solamente provocó un aumento de volumen de las inclusiones y las hizo translúcidas, pero no las solubilizó. El Triton X-114, el colato de sodio, el CHAPS y la urea, provocaban un oscurecimiento de los cuerpos intracelulares sin solubilizarlos. El calor (75°C durante 15 min.) al igual que el DTT 0.05M no mostraron ningún efecto aparente en las inclusiones.

La combinación del SDS al 1% con DTT 0.05M o con

β -mercaptoetanol al 2%, al igual que el NaOH 0.1N provocaron una solubilización casi inmediata del CBI.

Las inclusiones disueltas por esos tres tratamientos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes. Los CBI disueltos con SDS + β -mercaptoetanol mostraron una banda principal de proteína bien definida (Fig. 22). Algo similar ocurrió con la muestra

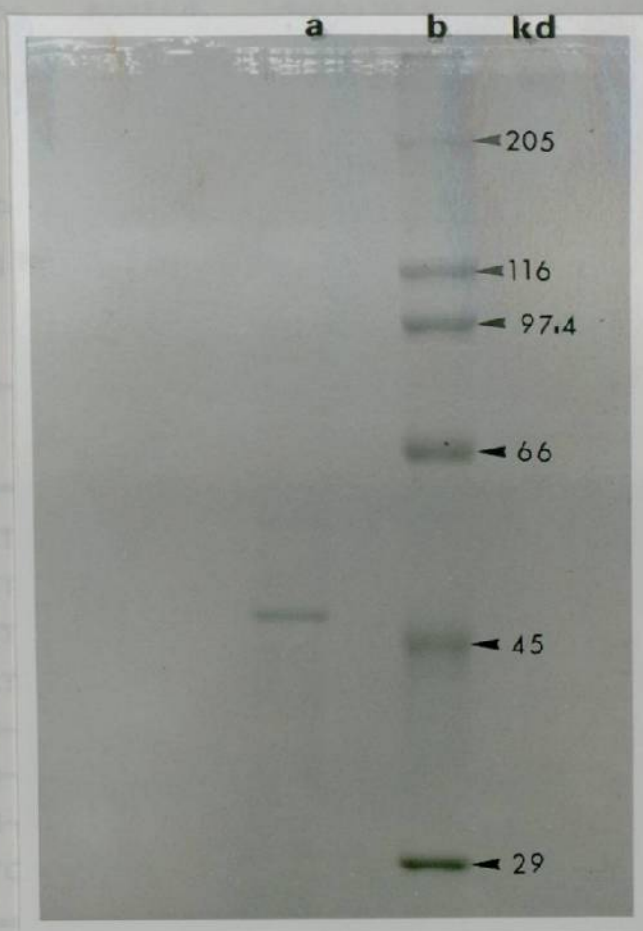


Fig. 22. Gel de poliacrilamida al 10%, mostrando en el carril "a": una suspensión del CBI disuelta con SDS al 1% y β -ME al 2%, y en el carril "b": proteínas marcadoras de peso molecular, después de haber sido sometidas a electroforesis en condiciones disociantes.

disuelta con SDS + DTT. El NaOH también disolvió los CBI, obteniéndose también una banda aunque algo difusa (datos no mostrados).

Mediante el método anterior se determinó el peso molecular de la banda principal de proteína, el cual fue de 47 kd (Fig. 22).

Ninguna de las muestras solubilizadas con los tres tratamientos mostró identidad inmunológica con la enterotoxina mediante la técnica de Duchterlony. Además se demostró que todas las cepas estudiadas, tanto enterotoxigénicas como no enterotoxigénicas eran capaces de producir el CBI (Tabla 3).

Cepa	Enterotoxigenicidad	CBI
NCTC 8238	+	+
NCTC 8239	+	+
NCTC 8679	+	+
NCTC 8798	+	+
FD-800	+	+
FD-1	-	+
PS-19	-	+
ATCC-3624	-	+

Tabla 3. Producción del CBI por cepas enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas de *C. perfringens*.

Los resultados de la resistencia al calor de las esporas producidas a diferentes temperaturas, fueron muy interesantes. En estos experimentos se emplearon esporas de las cepas FD-1041, FD-1 y ATCC 3624 producidas a 32, 37 y 43°C.

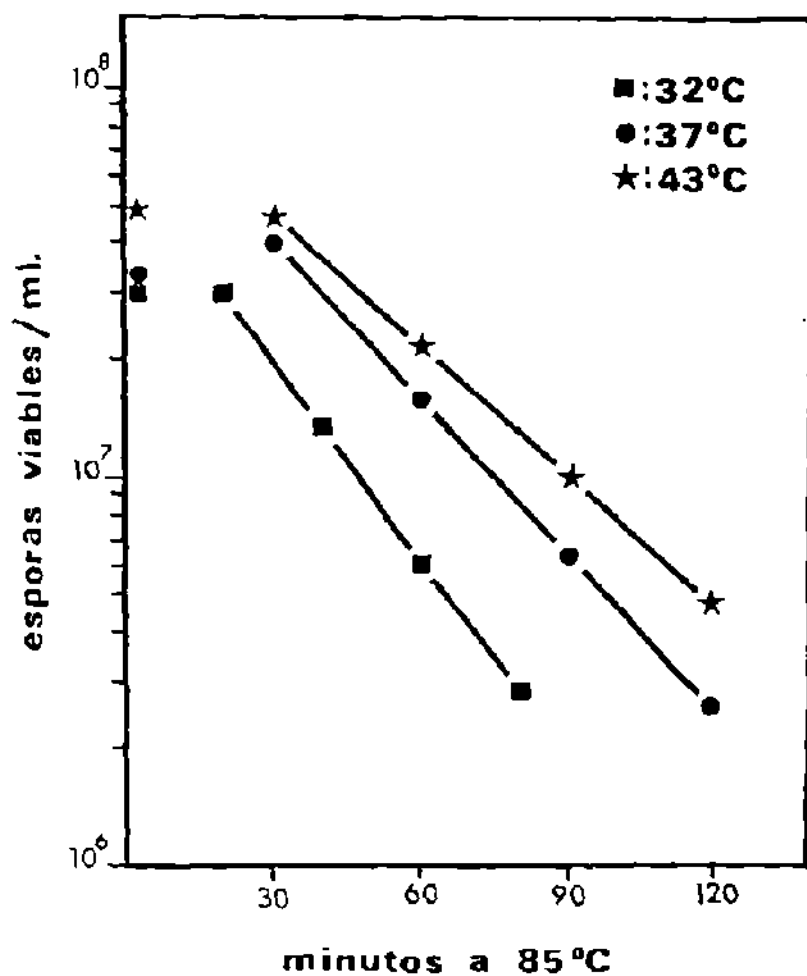


Fig. 23. Curvas de muerte térmica de esporas de *C.perfringens* cepa ATCC 3624, producidas a 32, 37 y 43°C y sometidas a 85°C.

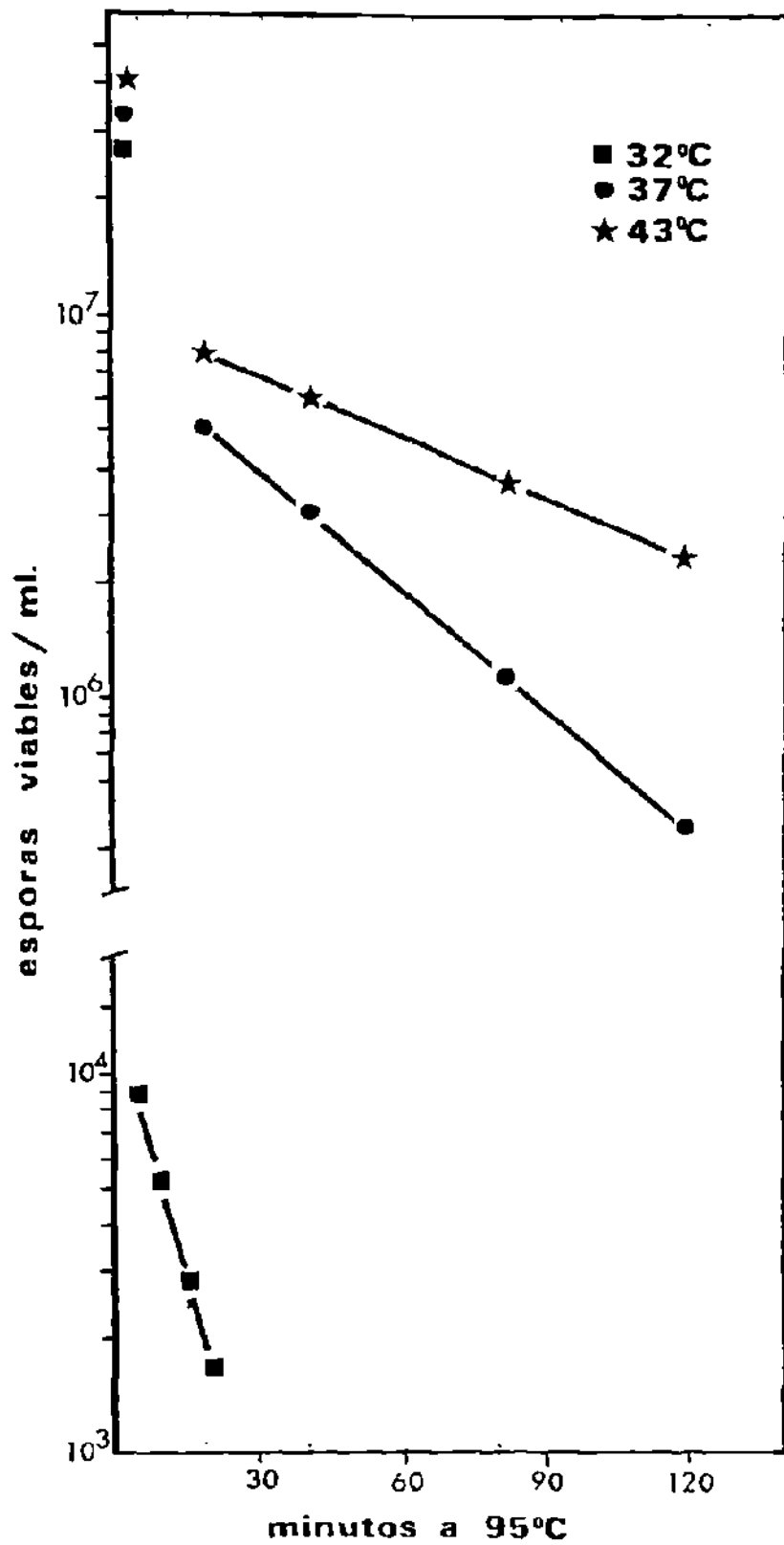


Fig. 24. Curvas de muerte térmica de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1041, producidas a 32, 37 y 43°C, y sometidas a 95°C.

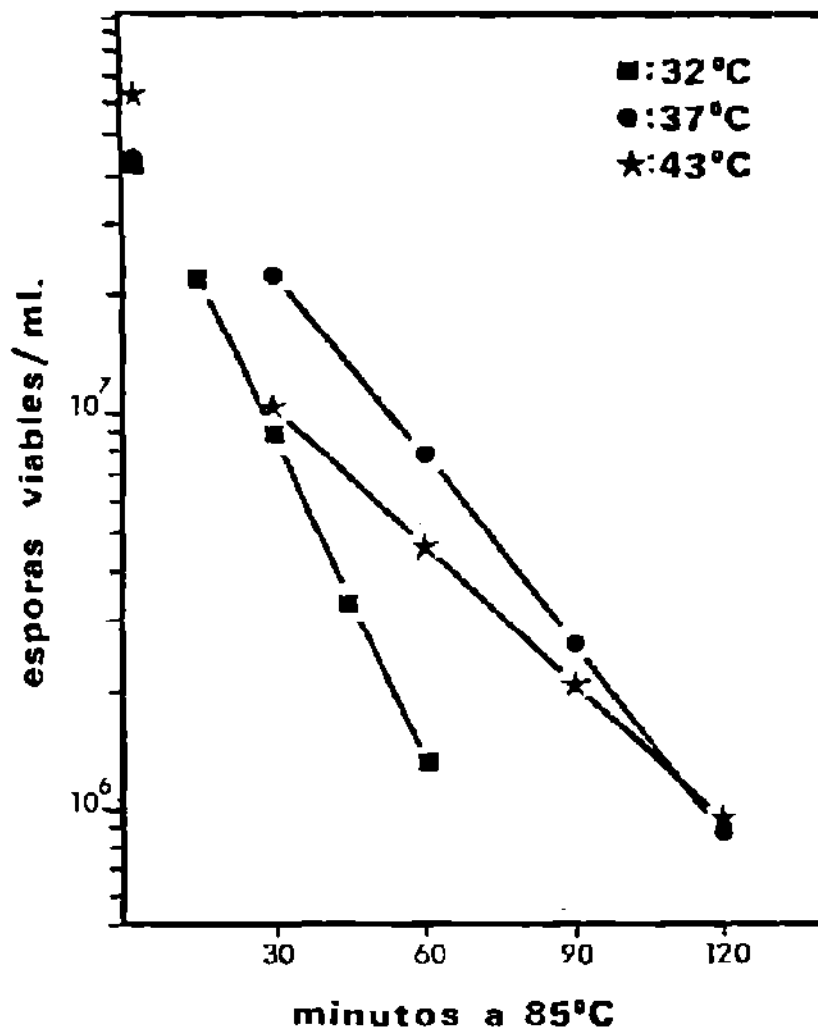


Fig. 25. Curvas de muerte térmica de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1, producidas a 32, 37 y 43°C. y sometidas a 85°C.

Las esporas de las cepas ATCC 3624 y FD-1, se trataron a 85°C, mientras que las de la cepa FD-1041, que mostraron más termoresistencia se trataron a 95°C.

Las curvas de muerte térmica para cada cepa se muestran en las figuras 23, 24 y 25. En estas se observa la sobrevivencia de esporas tratadas con calor a medida que transcurre el tiempo. En las tres cepas y con las diferentes

T°C de Esporulación	D ₉₅ †		D ₉₅ †
	FD-1	ATCC 3624	FD-1041
32	37	48	NDT*
37	64	74	116
43	85	90	200

†: en minutos

*NDT: no determinado.

Tabla 4. Valor "D" de las esporas de diferentes cepas de *C.perfringens*, producidas a 32, 37 y 43°C.

muestras de esporas, las curvas siguieron un patrón lineal (exponencial), con la excepción de las esporas producidas a 32°C de la cepa FD-1041, las cuales siguieron un comportamiento recto pero bifásico.

A partir de esas "curvas", se obtuvo el valor D para cada muestra de esporas, estos se detallan en la tabla 4. Esos datos indicaron que existe una relación entre la temperatura de esporulación y la termorresistencia de las esporas obtenidas en los rangos estudiados.

Esa relación implica que entre mayor sea la temperatura de esporulación, mayor será la termorresistencia de las esporas producidas.

DISCUSION

Durante la purificación de enterotoxina en la cromatografía de elución, se obtuvieron dos grupos de fracciones con absorbancia a 280nm. Sin embargo sólo el segundo grupo mostró identidad inmunológica y actividad biológica similar a la enterotoxina estándar. Esto es explicable ya que el primer grupo de fracciones se ha demostrado que está compuesto principalmente de ácidos nucleicos (Granum, P.E. y J.R. Whitaker, 1980).

La producción de enterotoxina fué de gran utilidad para la realización de este trabajo, ya que cuando éste se inició, la toxina no se obtenía comercialmente, ésta se empleó en la producción de antisuero y como estándar tanto para la contraelectroforesis, como para la caracterización parcial del CBI

Los experimentos preliminares descritos en la introducción de esta tesis, fueron similares a los realizados por Kim, Cheney y Woodburn (1967) y por Labbé y Duncan (1974). Ellos indicaban que la esporulación y la producción de enterotoxina tenían una temperatura óptima de 37°C y que a 46°C la detección de esporas y enterotoxina era nula o apenas detectable. Nuestros resultados también

indicaron que la esporulación era pobre a 46°C, sin embargo cuando se midió el crecimiento de esos cultivos, se observó que el cultivo solo experimentaba un crecimiento durante las tres primeras horas después de la inoculación, además se comprobó que la concentración del almidón del medio permaneció casi estable. Este comportamiento difería mucho de los cultivos incubados a 37°C, los cuales mostraban un crecimiento satisfactorio acompañado por una disminución en la concentración del almidón.

Estos datos sugerían una posible relación directa entre un crecimiento satisfactorio y la hidrólisis del almidón.

Cuando se hidrolizó el almidón de los cultivos a 46°C mediante la adición de α -amilasa de *B.licheniformis*, se originó un crecimiento similar al obtenido a 37°C con una gran formación de esporas refráctiles, además, muchas de las células en esporulación mostraban la presencia del cuerpo intracelular en forma de barra que indicaba la formación intracelular de enterotoxina. Esto apoyaba la sugerencia de que la bacteria no crecía ni esporulaba debido a que no podía hidrolizar el almidón.

La adición de amilasa a un cultivo a 46°C en el medio DS sin almidón, no provocó ningún crecimiento adicional después de las tres horas ni produjo esporas refráctiles. Esto indicaba que la enzima *per* se no era la responsable

directa del crecimiento y la esporulación de esos cultivos, sino el almidón hidrolizado.

Otros carbohidratos como la maltosa y la glucosa (que son el resultado final de la actividad de las amilasas sobre el almidón), al ser utilizados como sustitutos del almidón en el medio D8, también promovieron el crecimiento de esas cepas a 43 y 46°C, aunque la producción de esporas fué muy escasa. Esto puede ser debido a que los carbohidratos de fácil metabolismo como la glucosa y maltosa pueden reprimir la esporulación de las cepas como sugieren Elmerich y Aubert (1975).

En los cultivos a 43 y 46°C de las cepas en estudio, tanto los carbohidratos del extracto de levadura como la utilización de la proteosa peptona, podrían proveer de energía para el crecimiento observado durante las tres primeras horas de cultivo, sin embargo al disminuirse esos nutrientes se podría detener el crecimiento e iniciar la esporulación. Nuestras observaciones de esos cultivos indicaron que algunas células iniciaban la formación de esporas pero no llegaban a terminar el proceso. Cuando por la acción de la amilasa añadida se generaban carbohidratos fácilmente metabolizables, estos podrían haber proveído de la energía suficiente para la continuidad en el crecimiento y la formación de esporas.

De Mendoza y Cronan (1983) y Svobodová y Svoboda (1988) han demostrado que la temperatura puede afectar la estructura y función de la membrana citoplásmica, y Mao y otros (1989) reportaron que la secreción de α -amilasa en *Bacillus subtilis* está regulada por temperatura.

La actividad de amilasa demostrada en los extractos celulares de cultivos de *C.perfringens* a 46°C (Observación personal), sugiere que la amilasa sí puede ser producida a esa temperatura, pero que pueden existir problemas para su secreción.

A diferencia de las cepas enterotoxigénicas estudiadas, las dos cepas no productoras de enterotoxina sí fueron capaces de crecer satisfactoriamente en el mismo medio a 46°C hidrolizando el almidón con su propia amilasa. Como puede observarse en las figuras 10 y 11, la velocidad de crecimiento de los cultivos a 46°C fue mucho más rápida que los incubados a 37°C; esto era de esperarse tomando en cuenta que se encontraban entre el rango de temperatura óptima de crecimiento.

La cepa ATCC 3624 incubada a 46°C produjo un número bajo de esporas comparado con el número obtenido a 37°C, esto puede ser debido a que la bacteria hidrolizó en forma muy rápida el almidón del medio de cultivo proveyendo de subunidades de carbohidratos más fácilmente metabolizables,

que por un lado facilitaron el crecimiento acelerado del cultivo y por otro reprimieron la esporulación.

La sustitución del almidón por rafinosa favoreció no solo el crecimiento sino también la formación de esporas y de enterotoxina en las cepas enterotoxigénicas.

Las cepas empleadas en los cultivos con rafinosa mostraron en su mayoría tener una velocidad de crecimiento ("μ") más rápida a 43 que a 46°C, por lo que se decidió utilizar 43°C como la temperatura de incubación en estos experimentos.

Los estudios en cepas aisladas de brotes de toxi-infecciones alimentarias, demostraron que estas eran capaces de producir esporas y enterotoxina a 43°C en proporciones similares a las obtenidas a 37°C. Dos de esas cepas, la FD-1041 y la FD-884, produjeron altas cantidades de toxina, además se observó que durante la esporulación producían grandes cuerpos globulares intracitoplásmicos.

Se piensa que estas inclusiones pudieran estar compuestas de enterotoxina, ya que de acuerdo a nuestros datos, en estas cepas, alrededor de la mitad de la proteína de sus extractos celulares es enterotoxina. Los cuerpos intracelulares en forma de barra, que están compuestos de enterotoxina, se observaron en las células en esporulación

de otras cepas, pero no en la FD-1041 ni en la FD-884.

Al observarse al microscopio de contraste de fases, los cuerpos globulares intracitoplásmicos se mostraban opacos, por lo que diferían del cuerpo brillante intracelular producido por las células vegetativas.

En varias especies de *Bacillus* y *Clostridium* se ha demostrado que la temperatura óptima para la esporulación es similar a la óptima para el crecimiento (Williams.O.B. y W.J. Robertson, 1953).

En *C. perfringens* se comprobó que tanto la producción de esporas termoresistentes como la formación de enterotoxina ocurrían más rápidamente a 43 que a 37°C, sugiriéndose que la temperatura óptima de crecimiento también era más favorable para esos eventos que la de 37°C

Estos resultados difieren de los reportes de Kim, Cheney y Woodburn (1967), de Labbé y Duncan (1974), y de Rey, Walker y Rohrbaugh (1975) quienes obtenían a 37°C cantidades de esporas mucho más grandes que entre el rango de su temperatura óptima de crecimiento. Sus resultados son explicables ya que ellos utilizaron medios de cultivo con almidón.

Otra información muy importante obtenida en este trabajo es que las esporas producidas a 43°C eran más termoresistentes que las producidas a 37°C, las que a su

vez eran mas resistentes al calor que las formadas a 32°C.

Las curvas de muerte térmica de las esporas de la cepa FD-1041 mostraron una caída importante en el número de esporas vivas durante los primeros minutos de calentamiento. Una posible explicación para este comportamiento puede ser que esta cepa produzca algunas esporas con una morfología defectuosa que pudiera influir en su termorresistencia. Labbé y Rufner (1980) han demostrado, mediante estudios al microscopio electrónico de transmisión, que ciertas cepas cuando se cultivan en el medio DS con rafinosa pueden producir algunas esporas con cubierta defectuosa.

La gran disminución en el número de esporas vivas de la cepas FD-1041 producidas a 32°C puede ser debida además a lo siguiente: muy pocas cepas de *C. perfringens* pueden esporular abajo de 32°C (Rey, C.R., H.W. Walker, and P.L. Rohrbaugh) por lo que esta temperatura puede encontrarse entre el límite inferior permisible para la esporulación de muchas cepas, en estas condiciones que no son muy favorables para el proceso de esporulación, los factores involucrados en la termorresistencia podrían no llegar a establecerse en todas las células en esporulación, lo que ocasionaría un comportamiento bifásico, esto es una disminución rápida en los primeros minutos en el número de esporas viables debida a la muerte de una gran cantidad de esporas con baja o nula

termorresistencia, y después la muerte más lenta de las esporas con más resistencia al calor. Recientemente Lindsay y otros (1990) haciendo estudios de termorresistencia de esporas de *Bacillus subtilis* tipo A producidas a diferentes temperaturas, demostraron que las esporas producidas a temperaturas cercanas a los límites máximo y mínimo para la esporulación mostraban una resistencia al calor muy baja.

La rápida formación de esporas a la temperatura óptima de crecimiento y la gran termoresistencia mostrada por éstas, son factores que pueden favorecer la prevalencia de las enfermedades gastrointestinales.

Por otra parte el CBI, producido por las células vegetativas a 43-46°C al observarse al microscopio de contraste de fases, se presentaba como un cuerpo brillante fácilmente confundible con una espóra.

Nuestra primera impresión fué que esa inclusión podría estar, compuesta de enterotoxina, ya que el único cuerpo intracelular demostrado en *C. perfringens* estaba compuesto de esa proteína, o bien que estuviera constituido de glucógeno debido a que el medio de cultivo era rico en glucosa.

A pesar de que la presencia de carbohidratos no fué detectado por el método de la antrona, sí se demostraron pequeñas cantidades por el procedimiento del fenol-ácido

sulfúrico. Sin embargo, aunque la principal banda de proteína del CBI no contenía azúcares demostrables, sí se detectó la presencia de glucoproteínas en otras bandas menores, se cree que estas proteínas provenían de algunas fracciones de membranas que permanecían unidas a la inclusión aún después de aislarse por medio de la centrifugación en gradientes de densidad.

De acuerdo a la observación al microscopio electrónico de transmisión de cortes de células íntegras y rotas, se determinó que esas estructuras eran restos de la membrana plasmática que se mantenían adheridos a la inclusión después de que la bacteria se rompía.

Aunque, no se demostró que el CBI estuviera compuesto por enterotoxina, y ya que su existencia no está descrita en la literatura, esta inclusión merece un estudio detallado que brinde información sobre el posible papel que juega en la bacteria y/o en el microambiente del intestino humano y de animales.

Por otro lado, la rápida formación de enterotoxina a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria puede favorecer la causalidad de las toxi-infecciones alimentarias. Naik y Duncan (1977) y Craven (1980) demostraron que *C. perfringens* podía esporular y producir enterotoxina en alimentos a 37°C, además ellos han sugerido

que la ingestión de la toxina junto con el alimento podría incrementar la severidad de los síntomas de la toxi-infección alimentaria.

Como es sabido, muchos alimentos después de cocinarse, se enfrían a temperatura ambiente durante un largo período, otros, los del tipo de buffet, en muchos casos se mantienen a temperaturas alrededor de los 40 a 50°C por muchas horas. En estas condiciones de temperatura, se podría favorecer la proliferación rápida de *C. perfringens* en un período muy corto de tiempo, en el cual las células pudieran iniciar o terminar la esporulación con la consiguiente producción o liberación de la enterotoxina respectivamente, en el alimento.

Sin duda alguna los resultados descritos tendrán gran impacto en la conservación sana de los alimentos, ya que se deberá tomar en cuenta la potencialidad de *C. perfringens* de esporular y producir enterotoxina a su temperatura óptima de crecimiento.

Casi la totalidad de los estudios sobre la esporulación y la producción de enterotoxina tanto *in vitro* como *in vivo* se han realizado a 37°C, con la información generada en este trabajo, se requerirán de estudios profundos sobre estos y otros eventos interrelacionados tanto en medios de cultivo como en alimentos.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y con la información antecedente, se concluyó lo siguiente:

a) La incapacidad de las cepas enterotoxigénicas estudiadas de crecer y esporular a 46°C en el medio DS con almidón, se debe a que no pueden hidrolizar este carbohidrato a esa temperatura.

b) Existen cepas no enterotoxigénicas que hidrolizan el almidón del medio DS a 46°C, y crecen y esporulan a esa temperatura.

c) *C. perfringens* es capaz de crecer, esporular y producir enterotoxina a su temperatura óptima de crecimiento, en proporciones similares a las mostradas a 37°C, si se sustituye el almidón del medio DS por rafinosa.

d) La esporulación y la producción de enterotoxina, ocurren más rápido a su temperatura óptima de crecimiento que a 37°C.

e) La termorresistencia de las esporas es directamente proporcional a la temperatura de incubación a la que fueron formadas.

f) El CBI está compuesto principalmente de una proteína con un peso molecular de 47 Kd, que es diferente a la enterotoxina.

PERSPECTIVAS SOBRE FUTURAS INVESTIGACIONES EN EL TEMA

a) Actualmente las pruebas para clasificar una cepa de *C. perfringens* como enterotoxigénica o no enterotoxigénica, se basan en la detección de la enterotoxina, lo cual resulta tardado y laborioso, algunos los más rápidos son caros y requieren de equipo sofisticado.

La relación indirecta entre la capacidad de hidrolizar el almidón a 43-46°C y la enterotoxigenicidad de la bacteria, mostrada por las cepas estudiadas, motiva a hacer una investigación que involucre un mayor número de cepas, para determinar si este comportamiento sucede en ellas de la misma manera, de tal modo que pueda ser usado como una prueba diagnóstica sencilla rápida y económica.

b) Por otra parte, la regulación por temperatura de la hidrólisis del almidón, estimula a estudiar tanto la síntesis de la amilasa, como su proceso de secreción y su actividad a diferentes temperaturas.

c) La demostración de que *C. perfringens* esporula y produce enterotoxina en forma rápida a su temperatura óptima de crecimiento en los medios de laboratorio empleados, motiva también a analizar esos eventos en alimentos de

consumo generalizado que sean susceptibles de ser contaminados con esta bacteria.

d) Habiéndose demostrado en otros trabajos que las esporas bacterianas pueden soportar mayor temperatura cuando estas se calientan en los alimentos, resulta importante conocer el potencial de sobrevivencia en esos productos, de las esporas de *C. perfringens*, producidas a la temperatura óptima de crecimiento o mayores.

e) La acelerada producción de enterotoxina a la temperatura óptima de crecimiento, ofrece la posibilidad de hacer más rápidos los métodos de detección de enterotoxina, lo que sería de gran utilidad para los laboratorios de diagnóstico clínico y epidemiológico.

f) El cuerpo brillante intracelular, que ocupa un espacio considerable dentro de la bacteria, motiva a profundizar en la caracterización tanto fisicoquímica como biológica de la proteína, con el fin de determinar su papel en el ciclo de vida de este microorganismo o bien su efecto en aquellos organismos tanto procarióticos como eucarióticos con los que está en contacto.

L I T E R A T U R A C I T A D A

Ando, Y., T. Tsuzuki, H. Sunagawa and S. Oka. 1985. Heat resistance, spore germination, and enterotoxigenicity of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Immunol. 29(4): 317.

Andrews, A.T. 1986 Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications. 2nd Ed. Oxford. Univ. Press.

Barnes, E., J. Despaul and M. Ingram. 1963. The behavior of a food-poisoning strain of *Clostridium perfringens* in beef. J. Appl. Bacteriol. 26:415.

Bartholomew, B.A. and M.F. Stringer. 1983. Observations on the purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin and the production of a specific antiserum. FEMS Microbiol. Lett. 18: 43.

Bartlett, M., H. Walker and R. Zippin. 1972. Use of dogs as an assay for *Clostridium perfringens* enterotoxin. Appl. Microbiol. 23:196.

Borriello, S.P., F.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.

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

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

Centers for disease control. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. In CDC Surveillance Summaries, March 1990. MMWR 1990;39(No. SS-1): 15-57.

Chakrabarty, A.K. and K.G. Narayan. 1979. Pathogenesis of Hobbs' heat-sensitive spore forming *Clostridium perfringens* type A strain. Microbiol. Immunol 23(4): 213.

Craven, S.E. 1980. Growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in foods. Food Technol.34(4): 80.

Craven, S.E. 1990. The effect of the pH of the sporulation environment on the heat resistance of *Clostridium perfringens* spores. *Curr. Microbiol.* 22: 233.

Craven, S.E., J.C. Blankenship, and J.L. McDonel. 1981. Relationship of sporulation, enterotoxin formation, and spoilage during growth of *Clostridium perfringens* type A in cooked chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(5): 1184.

Dische, F.E. and S.D. Elek. 1957. Experimental food-poisoning by *Clostridium welchii*. *Lancet* ii: 71.

Duffy, L.K., J.L. McDonel, B.A. McClane and A. Kurosky. 1982. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin: characterization of the amino-terminal region. *Infect. Immun.* 38(1):386.

Duncan, C.L., G.J. King and W.R. Frieben. 1973. A paracrystalline inclusion formed during sporulation of enterotoxin-producing strains of *Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.* 114(2): 845.

Duncan, C.L. and D.H. Strong. 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 16:

82.

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

Duncan, C.L., Strong, D.H. and M. Sebald. 1972. Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 110(1): 378.

Duncan, C.L., H. Sugiyama and D.H. Strong. 1968. Rabbit ileal loop response to strains of *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 95(5): 1560.

Ellner, P. 1956. A medium promoting rapid quantitative sporulation in *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 71: 495.

Elmerrich, C. and J.P. Aubert. 1975. Involvement of glutamine synthetase and the purine nucleotide pathway in repression of bacterial sporulation, pp. 385. In: Gerhardt, P., R.N. Costilow and Sadoff (edi). Spores VI. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Freese, E. 1981. Initiation of bacterial sporulation. pp. 1-12. In H.S. Levinson, A.L. Sonenshein and D.J. Tipper (edi). Sporulation and germination. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

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

Fruin, J.T. 1977. Significance of *Clostridium perfringens* in processed foods. J. Food Protect. 49(5): 330.

Garvey, J.S., N.E Cremer and D.H. Sussdorf. 1977. Methods in Immunology. A laboratory text for instruction and research. 3th Ed. W.A. Benjamin, Inc.

Gerhardt, P. and R.E. Marquis. 1989. Spore thermoresistance mechanisms. pp. 17. In Smith, I., R. Slepecky and P. Setlow (eds). Regulation of procaryotic development. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Goldner, S.B., M. Solberg, S. Jones and L.S. Post. 1986. Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 52(3):

407.

Granum, P.E. 1985. The effect of Ca and Mg on the action of *Clostridium perfringens* enterotoxin on Vero cells. Acta. Path. Microbiol. Immunol, Scand. Sect. B. 93: 41.

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

Granum, P.E., W. Telle, O. Olsvik and A. Stavn. 1984. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* during sporulation and vegetative growth. Int. J. Food Microbiol. 1: 43.

Granum, P.E. and J.R. Whitaker. 1980. Improved method for purification of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. Appl. Environ. Microbiol. 39(6): 1120.

Gyobu, Y. and H. Kodama. 1976. Studies on the media for enterotoxin production and sporulation by *Clostridium perfringens*. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 17: 219.

Hames, B.D. 1981. An introduction to polyacrylamide gel

electrophoresis. pp. 1-91. In. Hames, B.D. and D. Rickwood (edi). Gel electrophoresis of proteins. IRL Press. Oxford. Washington, D.C.

Hao, J., J. Pazlarova, M. Strnadova and J. Chaloupka. 1989. Regulation of extracellular proteins and α -amylase secretion by temperature in *Bacillus subtilis*. Folia. Microbiol. 34: 179.

Harmon, S.M. and D.A. Kautter. 1986. Improved media for sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens*. J. Food Protect. 49(9): 706.

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

†
Hauschild, A.H. 1970. Erythemat activity of the cellular enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. Can. J. Microbiol. 16: 651.

Hauschild, A., L. Niilo and W. Dorward. 1970. Response of ligated intestinal loops in lambs to an enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. Can J. Microbiol.

16: 339.

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

Jarmund, T. and W. Telle. 1982. Binding of *Clostridium perfringens* enterotoxin to hepatocytes, small intestinal epithelial cells and Vero cells. Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B. 90: 377.

Jestin, A. et M.R. Popoff. 1987. L'entérotoxine de *Clostridium perfringens* de type A: intérêt de son étude dans la pathologie digestive du porc à l'engrais. Rec. Med. Vét. 163(1): 33

Keleti, G. and W.H. Lederer. 1974. Handbook of micromethods for the biological sciences. Van Nostrand Reinhold Co. pp. 83.

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

Kim, C.H., R. Cheney and M. Woodburn. 1967. Sporulation of *Clostridium perfringens* in a modified medium and selected foods. *Appl. Microbiol.* 15(4): 871.

Kumate, J. and A. Isibasi. 1986. Pediatric diarrheal diseases: a global perspective. *Pediatric Infec. Dis.* 5(1): S 21.

Labbé, R.G. 1980. Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* type A. *Food Technol.* 34(4): 88.

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

Labbé, R.G. and C.L. Duncan. 1970. Growth from spores of *Clostridium perfringens* in the presence of sodium nitrite. *Appl. Microbiol.* 19: 353.

Labbé, R.G. and C.L. Duncan. 1974. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A under conditions of controlled pH and temperature. *Can. J. Microbiol.* 20: 1493.

Labbé, R.G. and C.L. Duncan. 1975. Influence of carbohydrates on growth and sporulation of *Clostridium perfringens* type A. Appl. Microbiol. 29(3): 345.

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(2): 843.

Labbé, R.G. and L.L. Nolan. 1981 Stimulation of *Clostridium perfringens* enterotoxin formation by caffeine and theobromine. Infect. Immun. 34(1): 50.

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

Labbé, R.G. and D.K. Rey. 1979. Raffinose increases sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A. Appl. Environ. Microbiol. 37(6): 1196.

Labbé, R.G. and R. Rufner. 1980. Ultrastructure of sporulating cells of *Clostridium perfringens* type A grown in the presence of raffinose. Can. J. Microbiol. 26: 1153.

Labbé, R.G., E. Somers and C.L. Duncan. 1976. Influence of starch source on sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A. Appl. Environ. Microbiol. 31(3): 455.

Larson, H.E. and S.P. Borriello. 1988. Infectious diarrhea due to *Clostridium perfringens*. J. Infect. Dis. 157(2):390.

Law, J.H. and R.A. Slepecky. 1961. Assay of poli- β -hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. 82:33.

Lechowich, R.V. and Z.J. Ordal. 1962. The influence of the sporulation temperature on the heat resistance and chemical composition of bacterial spores. Can. J. Microbiol. 8(3): 287.

Lindsay, J.A., L.E. Barton, A.S. Leinart and H.S. Pankratz. 1990. The effect of sporulation temperature on spore characteristics of *Bacillus subtilis* A. Curr. Microbiol. 21: 75.

Löffler, A. and R.G. Labbé. 1983. Intracellular proteases during sporulation and enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A. Curr. Microbiol. 8: 187.

Loffler, A. and R.G. Labbé. 1985. Isolation of an inclusion body from sporulating, enterotoxin-positive *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol. Lett. 27: 143.

Loffler, A. and R.G. Labbé. 1986. Characterization of a parasporal inclusion body from sporulating, enterotoxin-positive *Clostridium perfringens* type A. J. Bacteriol. 165(2): 542.

Mandelstam, J., K. McQuillen and I Dawes (edi).1980. Biochemistry of bacterial growth. 3th. Ed. Jonh Wiley & Sons. pp. 355.

Matsuda, M., K. Ozutsumi, H. Iwahashi and N. Sugimoto. 1986. Primary action of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin on HeLa and Vero cells in the absence of extracellular calcium: rapid and characteristic changes in membrane permeability. Biochem. Biophys. Res, Commun. 141(2): 704.

McClane, B.A. 1989. Characterization of calcium involvement in the *Clostridium perfringens* type A enterotoxin-induced release of H-nucleotides from Vero cells. Microbial. Pathogenesis. 6: 17.

McDonel, J.L. and T. Asano. 1975. Analysis of unidirectional fluxes of sodium during diarrhea induced by *Clostridium perfringens* enterotoxin in the rat terminal ileum. *Infect. Immun.* 11(3): 526.

Mc. Donel, J.L., L. Chang, J. Pounds and C.L. Duncan. 1978. The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on rat and rabbit ileum. *Lab. Invest.* 39: 210.

Mitani, T., J.E. Heinze and E. Freese. 1977. Induction of sporulation in *Bacillus subtilis* by decoyinine or hadacidin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77(3): 1118.

Murai, H., S. Hara, T. Ikenaka, A. Goto, M. Arai, and S. Murao. 1985. Amino acid sequence of protein α -amylase inhibitor from *Streptomyces griseosporus* YM-25. *J. Biochem.* 97: 1129.

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

Naik, H.S. and C.L. Duncan. 1977a. Enterotoxin formation in

foods by *Clostridium perfringens* type A. J. Food Safety. 1: 7.

Naik, H.S. and C.L. Duncan. 1977b. Rapid detection and quantitation of *Clostridium perfringens* enterotoxin by counterimmunoelectrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 34(2): 125.

Niilo, L. 1971. Mechanism of action of the enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. Infect. Immun. 3(1): 100.

Niilo, L. 1974. Response of ligated intestinal loops in chickens to the enterotoxin of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 28: 889.

Niilo, L. and W. Dorward. 1971. The effect of enterotoxigenic *Clostridium welchii* type A on the bovine intestine. Res. Vet. Sci. 12: 376.

Oblinger, J.L. (ed). 1988. Bacteria associated with foodborne diseases. Food Technol. 42(4).

Pearson, C. and H. Walker. 1976. Effect of

oxidation-reduction potential upon growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. J. Milk Food Technol. 39: 421.

Phillips, K.D. 1986. A sporulation medium for *Clostridium perfringens*. Letters Appl. Microbiol. 3: 77.

Rey, C.R., H.W. Walker and P.L. Rohrbaugh. 1975. The influence of temperature on growth, sporulation, and heat resistance of spores of six strains of *Clostridium perfringens* Milk Food Technol. 38(8): 461.

Richardson, M. and P.E. Granum. 1985. The amino acid sequence of the enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. FEBS Lett. 182(2): 479.

Roberts, T.A. and A.D. Hitchins. 1969. Resistance of spores. In Gould G.W. and A. Hurst (edi). The bacterial spore. Academic Press. London and New York.

Robertson, J. 1977. Outbreak of *Clostridium absonum*. Among railway workers- British Columbia. Can. Dis. Weekly Rep. 3: 61.

Robinson, J. and M. Messer. 1969. *Clostridium perfringens*

food poisoning - Texas. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 18: 20.

Roper, G., J.A. Short and P.D. Walker. 1976. The ultrastructure of *Clostridium perfringens* spores. In Baker, A.M., J. Wold, D.J. Ellar, G.H. Dring and G.W. Gould (edi). Spore research. Academic Press Inc. (London), Ltd., London.

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

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

Sacks, L.E. and P.A. Thompson. 1978. Clear, defined medium for the sporulation of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 35(2): 405.

Sanders, S. and R. Hutcheson Jr. 1974. *Clostridium perfringens* food poisoning - Tennessee. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 23: 19.

Schaeffer, P. 1969. Sporulation and the production of

antibiotics, exoenzymes, and exotoxins. *Bacteriol. Rev.* 33(1): 48.

Schoemaker, J.M., J.M. Clark and J. Saukkonen. 1981. Characterization of polysaccharide accumulations in a cell division defective mutant of *Escherichia coli* 15T-. *J. Gn. Microbiol.* 123: 323.

Shandera, W.X., C.O. Tacket and P.A. Blake. 1983. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. *J. Infec. Dis.* 147(1): 167.

Sharp, J.C.M., P.W. Collier, G.I. Forbes and T.W. Hill. 1988. Surveillance programme for the control of foodborne infections and intoxications in Europe: the first 6 years' experience in Scotland, 1980-85. *Bulletin of the World Health Organization* 66(4): 471.

Silano, V., M. Furia, L. Gianfreda, A. Macri, R. Palescandolo, A. Rab, V. Scardi, E. Stella and F. Valfre. 1975. Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. *Biochim Biophys Acta.* 391: 170

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

Strong, D.H., C.L. Duncan and G. Perna. 1971. *Clostridium perfringens* type A food poisoning. II. Response of the rabbit ileum as an indication of enteropathogenicity of strains of *Clostridium perfringens* in human beings. Infec. Immun. 3(1): 171.

Sunagawa, H., T. Tsuzuki, K. Takeshi, Y. Ando and S. Oka. 1987. Enterotoxigenicity of heat-resistant and heat-sensitive strains of *Clostridium perfringens*. Jpn. J. Vet. Sci. 49(5): 853.

Suttgn, 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.

Ting, M.N. and D.Y. Fung. 1972. Chemically defined medium for growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 24(5): 755.

Todd, E.C.D. 1978. Foodborne diseases in six countries- A comparison. J. Food Protect. 41(7): 559.

Torres-Anjel, M.J., M. Castro, A. Cruz y R. Ochoa. 1978. Efecto de la inyección endovenosa de espora (entero) toxina de *Clostridium perfringens (welchii)* en el equino. Rev. lat-amer. Microbiol. 20: 31.

Tórtora, J.C.D. 1984. Alternative medium for *Clostridium perfringens* sporulation. Appl. Environ. Microbiol. 47(5): 1172.

Uemura, T., T. Maekawa and G. Sakaguchi. 1984. Biological assay for *Clostridium perfringens* enterotoxin with Vero cells. Jpn. J. Vet. Sci. 46(5): 715.

Uemura, T., G. Sakaguchi, T. Itoh, K. Okazawa and S. Sakai. 1975. Experimental diarrhea in Cynomolgus monkeys by oral administration with *Clostridium perfringens* type A a viable cells or enterotoxin. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 28: 165.

Ushijima, T., A. Sugitani and Y. Ozaki. 1987. A pair of semisolid media facilitate detection of spore and enterotoxin of *Clostridium perfringens*. J. Microbiol. Methods. 6:145.

Warth, A.D. 1978. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 134(3): 699.

Willardsen, R.R. , F.F. Busta, C.E. Allen and L.B. Smith. 1978. Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperatures. *J. Food Sci.* 43: 470.

Williams O.B. and W.J. Robertson. 1954. Studies on heat resistance. VI. Effect of temperature of incubation at which formed on heat resistance of aerobic thermophilic spores. *J. Bacteriol.* 67: 377.

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(2): 574.

Yamamoto, K., I. Ohishi and G. Sakaguchi. 1979. Fluid accumulation in mouse ligated intestine inoculated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(2): 181.

Yotis, W.W. and N. Catsimpoolas. 1975. Scanning isoelectric focusing and isotachopheresis of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Appl. Bacteriol. 39: 147.

Zar, J.H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice Hall Inc. pp. 228.

CURRICULUM VITAE

Datos Personales.

Nombre: José Santos García Alvarado

Fecha de nacimiento: 2 de Abril de 1961

Lugar de Nacimiento: Torreón, Coah.

Domicilio Actual: P.Zorrilla 343

Col. Nvo. Periférico

San Nicolás, N.L.

66450 México.

Educación:

Primaria, 1965-1971. Escuela Rafael --
Ramírez C. San Juan de Gpe, Dgo.

Secundaria, 1971-1974. Escuela. Prep. -
Carlos Pereyra. Torreón, Coah.

Preparatoria, 1974-1977. Escuela Prep.
Carlos Pereyra. Torreón, Coah.

Licenciatura, 1977-1982. Fac. Ciencias
Biológicas, UANL, San Nicolás, N.L. Tí-
tulo obtenido: Químico Bacteriólogo Pa-
rasitólogo, 1984.

Becas Otorgadas:

CONACYT, para estudios de doctorado en ciencias, 1984-1987.

Actividad Profesional:

1983-1987, Auxiliar de investigación. - Dpto. Microbiología e Inmunología. Fac. Ciencias Biológicas, UANL.

1987-1990, Personal profesional no docente. Dpto. Microbiología e Inmunología. Fac. Ciencias Biológicas, UANL.

1989-1990, Maestro por horas. Fac. Ciencias Biológicas, UANL.

1988 y 1989, Estancia de investigación en el Lab. de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Massachusetts, Amherst, M.A. E.U.A.

Trabajos en congresos:

García-Alvarado, J.S., N.L. Heredia-Rojas, M.A. Rodríguez-Quintanilla. Desarrollo de una técnica de ELISA para determinar enterotoxina de *Clostridium*

perfringens. Memorias del XIX Congreso Nacional de Microbiología, Monterrey, N.L. 1988.

García Alvarado, J.S., M.A. Rodríguez-Quintanilla, R.G. Labbé. La hidrólisis de almidón y su efecto en el crecimiento y esporulación de *C. perfringens*. - Memorias del XXI Congreso Nacional de Microbiología, Villahermosa Tab. 1990.

García Alvarado, J.S., M.A. Rodríguez-Quintanilla, y R.G. Labbé. Esporulación de *C. perfringens* a su temperatura óptima de crecimiento. Memorias del XXI Congreso Nacional de Microbiología Villahermosa Tab. 1990.

Heredia-Rojas, N.L., J.S. García-Alvarado, M.A. Rodríguez-Quintanilla, y R.G. Labbé. Efecto de tres sales biliares en la esporulación de *C. perfringens*. Memorias del XXI Congreso Nacional de Microbiología, Villahermosa Tab. 1990.

Convenios para Investigación:

**Responsable de los convenios SEP-UANL
C87-08-0199, y # C88-08-0128.**

Miembro de Asociaciones:

Asociación Americana de Microbiología





