

EL EFECTO DE LAS SALES BILIARES HUMANAS SOBRE  
EL CRECIMIENTO, LA ESPORULACION Y LA  
PRODUCCION DE ENTEROTOXINA DE  
*Clostridium perfringens*  
TIPO A

TESIS

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

PRESENTA

NORMA LAURA HEREDIA ROJAS

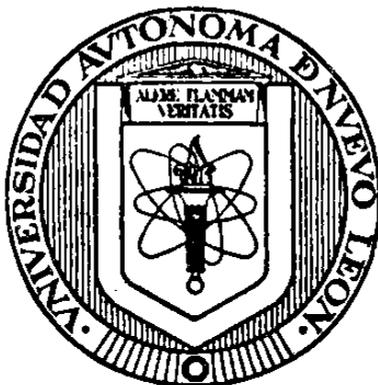
MONTERREY N.L.

DICIEMBRE DE 1991

TM  
Z665  
FM  
1991  
H4



1020071198



**EL EFECTO DE LAS SALES BILIARES HUMANAS SOBRE  
EL CRECIMIENTO, LA ESPORULACION Y LA  
PRODUCCION DE ENTEROTOXINA DE  
*Clostridium perfringens*  
TIPO A**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

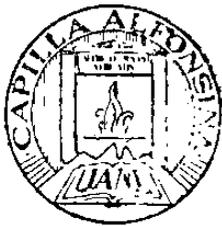
**PRESENTA**

**NORMA LAURA HEREDIA ROJAS**

**MONTERREY N.L.**

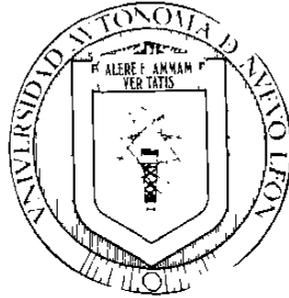
**DICIEMBRE DE 1991**

7M  
26658  
FMI  
1991  
14



FONDO TESIS

165205



EL EFECTO DE LAS SALES BILIARES HUMANAS SOBRE  
EL CRECIMIENTO, LA ESPORULACION Y LA  
PRODUCCION DE ENTEROTOXINA DE  
*Clostridium perfringens*  
TIPO A

POR

NORMA LAURA HEREDIA ROJAS

TESIS PRESENTADA A LA

FACULTAD DE MEDICINA

DE LA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA

LA OBTENCION DEL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

Monterrey, N.L.

Noviembre de 1991

COMISION DE TESIS.

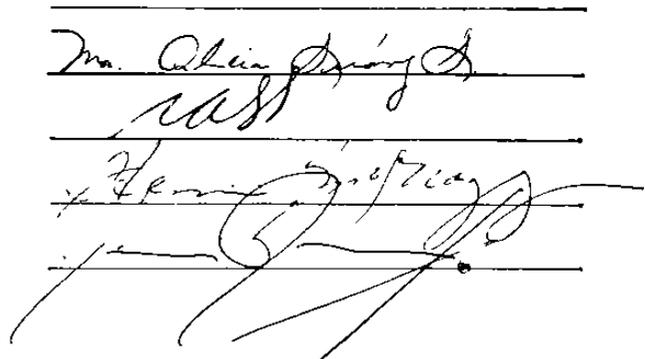
DR. MANUEL ANTONIO RODRIGUEZ O.

M.C. MARIA ALICIA SUAREZ SEMOUR

M.C. IRMA A. SALINAS GONZALEZ

Dña. HERMINIA G. MARTINEZ R.

DR. JAVIER RAMOS JIMENEZ

The image shows four horizontal lines representing a signature strip. The first line contains the signature of Maria Alicia Suarez Semour. The second line contains the signature of Irma A. Salinas Gonzalez. The third line contains the signature of Herminia G. Martinez R. The fourth line contains the signature of Javier Ramos Jimenez.

La presente investigación se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. teniendo como asesor interno al Dr. Manuel A. Rodríguez y como asesores externos al Dr. Ronald G. Labbe del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, E.U.A. y al Dr. José Santos García A. de Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

A MI ESPOSA.

PORQUE SIN TU APOYO, PACIENCIA, CONSEJOS  
Y SOBRE TODO TU ACRIBILANTE DE SUERCIÓN  
NO SE HUBIERAN HECHO REALIDAD  
¡GRACIAS AMOR!

A MIS PADRES.

QUIENES CON SUS CONSEJOS Y APOYO CON TANTE  
DILIGENCIA Y EFORTES EN EL DÍA DE SUERCIÓN

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Manuel Rodríguez Q. por su asesoría, apoyo e interés constantes, así como por su amistad a lo largo de mi trabajo.

Mi agradecimiento al Dr. Ronald Labbé, cuyo estímulo, y asesoría y sobre todo su amistad fueron de suma ayuda para que este trabajo se llevara a cabo.

Al Dr. José Santos García A. quien me brindó su asesoría y apoyo incondicional durante todo el tiempo. Sus consejos acertados fueron de gran ayuda para mí.

A la M.C. Alicia Suárez S. y a la M.C. Irma Salinas G. por su disposición y las facilidades otorgadas para la realización del trabajo experimental.

Al Dr. Per Einar Granum del Instituto Noruego para la Investigación de los Alimentos, por proporcionarnos suero antienterotoxina necesaria para la realización de este trabajo.

Al Dr. Gerald Stelma de la Administración de Drogas y Alimentos de E.U.A. por proporcionarnos enterotoxina de referencia necesaria para la realización de esta investigación.

A la Dra. Herminia Martínez R. y al Dr. Javier Ramos J. miembros de la comisión de revisión de este manuscrito, y que invirtieron su valioso tiempo en ello. Sus consejos fueron muy apreciados.

Al Dr. Jaime Garza del Departamento de Medicina Legal y al Dr. Jesús Ancer del Departamento de Patología Clínica del Hospital Universitario, por las facilidades proporcionadas para la obtención de muestras de jugo biliar humano.

Al Dr. Reyes S. Taméz Guerra de quien he recibido un valioso apoyo para lograr mi superación académica.

Al Dr. Hugo Barrera y al Dr. Mario César Salinas quienes me brindaron su ayuda y su amistad durante la realización de mis estudios.

Al personal de los Departamentos de Microbiología de la Facultad de Medicina y de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, por su apoyo y amistad durante el desarrollo de este trabajo.

## INDICE

	página
Página de título .....	i
Comisión de tesis.....	ii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de tablas .....	viii
Lista de Figuras .....	ix
Listas de abreviaciones .....	xi
Introducción .....	1
Material y Métodos .....	13
cepas utilizadas .....	13
Producción y purificación de la enterotoxina .....	13
-- Cultivo .....	13
-- Extracto celular .....	14
-- Purificación de la enterotoxina .....	15
-- Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo con- diciones no disociantes .....	16
Producción de suero antienterotoxina .....	17
Detección de enterotoxina.....	18
-- Contrainmnoelectroforesis .....	18
Determinación de proteínas .....	19
-- Método de Bradford .....	19
Sales biliares y jugo biliar usados .....	19
-- Sales biliares .....	19
-- Bilis humana total .....	20
Detección de sales biliares .....	21

-- Cromatografía en capa fina .....	21
Análisis del crecimiento, la esporulación y la producción de enterotoxina .....	22
-- Cultivo .....	22
-- Curva de crecimiento .....	24
-- Determinación de esporas .....	24
a) Esporas termorresistentes .....	24
b) Cálculo de la proporción de esporulación ...	25
-- Determinación de enterotoxina .....	25
Resultados .....	26
Producción y purificación de la enterotoxina .....	26
Determinación de proteínas .....	27
Determinación de sales biliares en la bilis .....	28
Efecto de las sales y jugo biliar en el crecimiento	30
Efecto de las sales biliares sobre la esporulación.	49
Efecto de las sales biliares sobre la producción de enterotoxina.....	51
Discusion y conclusiones .....	55
Resumen .....	63
Bibliografía .....	64
Trabajo publicado .....	76

## LISTA DE TABLAS

- 1.- Composición del Medio Definido (D) de Sacks y Thompson.
- 2.- Porcentaje de reducción de la absorbancia de los cultivos de *C. perfringens* cuando se añadieron sales biliares al medio de cultivo.
- 3.- Esporulación de *C. perfringens* en presencia de sales biliares.
- 4.- Producción de enterotoxina de *C. perfringens* en presencia de sales biliares.
- 5.- Esporulación y producción de enterotoxina de *C. perfringens* en presencia de sales biliares.

## LISTA DE FIGURAS

- 1.- Derivación de los ácidos biliares humanos.
- 2.- Perfil de elución obtenido por cromatografía en columna durante el proceso de purificación de la enterotoxina de *C. perfringens*.
- 3.- Curva estandar para la determinación de proteínas.
- 4.- Perfil de elución obtenido por cromatografía en capa fina de las sales y jugo biliar humano.
- 5.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 cultivada en medio Definido con colato de sodio
- 6.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 cultivada en medio Definido con taurocolato de sodio.
- 7.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 cultivada en medio Definido con glicoquenodesoxicolato de sodio.
- 8.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 cultivada en medio Definido con quenodesoxicolato de sodio.
- 9.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8679 cultivada en medio definido con colato de sodio.
- 10.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8679 cultivada en medio definido con taurocolato de sodio.
- 11.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8679 cultivada en medio Definido con glicoquenodesoxicolato de sodio.
- 12.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8679 cultivada en medio definido con quenodesoxicolato de sodio.
- 13.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 10240 cultivada en medio Definido con colato de sodio.
- 14.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 10240 cultivada en medio Definido con taurocolato de sodio.
- 15.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 10240 cultivada en medio Definido con glicoquenodesoxicolato de sodio.
- 16.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 10240 cultivada en medio Definido con quenodesoxicolato de sodio.

- 17.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio Definido con colato de sodio.
- 18.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio Definido con taurocolato de sodio.
- 19.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio Definido con glicoquenodesoxicolato de sodio.
- 20.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio Definido con quenodesoxicolato de sodio.
- 21.- Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio Definido con la mezcla de sales biliares.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A <sub>600</sub>	absorbancia a 600 nm
°C	grados centígrados
cm	centímetro(s)
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ent <sup>-</sup>	no enterotoxigénica
ent <sup>+</sup>	enterotoxigénica
g	fuerza gravitacional
gr	gramo(s)
hr	hora(s)
kD	kilodatonnes
Kg	kilogramo
l	litro
M	molar
mg	miliqramo(s)
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
mm	milímetro(s)
µg	microqramo(s)
µl	microlitro(s)
nm	nanómetro(s)
pH	logaritmo del recíproco de la concentración de ion hidronio
PMSF	floruro de fenilmetilsulfonilo
R <sub>f</sub>	frente de corrida

seg

Tris

UFC

segundos

tris(hidroximetil)aminometano

unidades formadoras de  
colonias

## INTRODUCCION

### GENERALIDADES

Las toxi-infecciones alimentarias son una de las principales preocupaciones de salud pública en el mundo, ya que representan pérdidas económicas considerables, en parte debido a los costos de los tratamientos médicos y a la pérdida de la productividad (48). Se ha observado en los países no desarrollados, que arriba del 30% de los alimentos preparados son descompuestos por infestaciones de insectos ó por crecimiento microbiano (principalmente bacterias, aunque también hongos, parásitos y virus) antes de ser consumidos (28).

Entre las principales bacterias involucradas en la causalidad de las intoxicaciones alimentarias se encuentran: *Salmonella typhi* y otras especies del género, especies de *Shigella*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, y *Clostridium botulinum* (2, 48, 68).

*C. perfringens* ha sido históricamente asociado como causa de gangrena gaseosa. Su papel como causante de toxi-infección alimentaria fué determinado a principios de los años setentas (36). Además de esta enfermedad, se le ha involucrado como agente causal de diarrea infecciosa asociada a la administración de antibióticos (8, 41) y se le ha asociado con el síndrome de muerte fulminante infantil (46).

En términos de incidencia de casos de intoxicación alimentaria reportados cada año, *C. perfringens* generalmente ocupa un segundo lugar en Canadá y en el Reino Unido y un tercer lugar en Estados Unidos como causante de la enfermedad (30, 53, 59, 62). Este mismo problema se ha encontrado también en otros países como Brasil, Colombia, Japón y Noruega, entre otros (1, 11, 33). Quizá esta gran frecuencia se deba a que *C. perfringens* es la bacteria conocida más ampliamente distribuida en el medio ambiente, ya que es encontrada en suelo, agua, alimentos, en el intestino de casi todos los animales y en el aire (37) y además, a que puede tener tiempos de generación tan cortos como 1.1 min (71), lo que favorece un crecimiento rápido.

*C. perfringens* es una bacteria de forma bacilar, gram positiva, formadora de esporas, encapsulada y no móvil. Es capaz de producir más de 13 proteínas biológicamente activas. Algunas son toxinas con actividad enzimática, y una de ellas es una enterotoxina. Las cepas se han clasificado en 5 tipos (A-E) de acuerdo a la producción de 4 toxinas extracelulares: alfa, beta, epsilon e iota (36). Las cepas del tipo A son las principales productoras de enterotoxina, sin embargo, se ha encontrado que algunas del tipo C también la producen (37).

La enterotoxina es una proteína termolábil (17), de una sola cadena (36), compuesta por 309 aminoácidos (25), con un peso molecular de 34,262 daltones y un punto isoeléctrico de 4.3 (14).

Esta toxina es producida intracelularmente cuando la bacteria esporula, pero es liberada junto con la spora madura al final del proceso de esporulación (18, 39, 47).

#### ENFERMEDADES ALIMENTARIAS POR *Clostridium perfringens*.

La toxi-infección alimentaria resulta al ingerir alimento contaminado con: a) gran número de células viables (entre  $4 \times 10^7$  y  $6 \times 10^9$ ), las cuales, al llegar al intestino esporulan, produciendo la enterotoxina (57), b) células en esporulación, que pueden producir la enterotoxina cuando están en el alimento, y la liberan en el tracto intestinal (12, 18), y c) enterotoxina preformada en el alimento, de la cual se necesitan de 8-10  $\mu$ g para producir la sintomatología (64).

Los síntomas aparecen generalmente entre 8 a 24 horas después de haber ingerido el alimento contaminado. e incluyen cólico abdominal severo y una diarrea profusa, puede presentarse también náusea y vómito, la fiebre y el dolor de cabeza están usualmente ausentes (67).

La diarrea infecciosa también se presenta con dolor abdominal difuso, vómito y en muchos casos las heces son sanguinolentas (41). Un número importante de estas diarreas se presentan después de que los pacientes han recibido tratamientos con antibióticos (8). se piensa que esta enfermedad es producida por una sobreabundancia de *C. perfringens* en el intestino donde continuamente está liberando

la enterotoxina (41).

También, se ha asociado a esta bacteria con el síndrome de muerte súbita infantil ya que se encontró la presencia de la enterotoxina en el suero de bebés que habían fallecido por esa enfermedad. Se cree que la enterotoxina puede jugar un papel directo ó indirecto en la causalidad del síndrome (46).

El sitio de fijación de la enterotoxina en las enfermedades diarreicas es la membrana de las células epiteliales del borde de cepillo en el intestino, en donde se une a un receptor específico formando un complejo de 160 Kd (73). Una vez ligada la toxina, actúa solo en el epitelio intestinal, en donde causa alteraciones en la permeabilidad membranar, provocando salida de agua, de iones sodio y de pequeñas moléculas y se ve afectada también la absorción de glucosa (7, 25, 65). Histológicamente causa descamación del epitelio del íleon y el borde de cepillo pierde su configuración plegada (45).

#### **ESPORULACION Y PRODUCCION DE ENTEROTOXINA.**

Desde hace tiempo se ha reportado una relación estrecha entre la producción de enterotoxina y la esporulación de la bacteria (12, 34), incluso se reportó que la enterotoxina era un producto de uno de los genes específicos de la esporulación (18).

Sin embargo, se ha descrito que pequeñas cantidades de

enterotoxina son producidas por células vegetativas no esporuladas (22, 26). Afortunadamente estas cantidades son tan pequeñas que no son de importancia como causa de intoxicaciones alimentarias por *C. perfringens* (64).

Se ha demostrado que la enterotoxina comienza a producirse en estadios tempranos del proceso de esporulación, acumulándose intracelularmente, para después ser liberada junto con la espora madura al medio extracelular (38). Se había reportado que la enterotoxina era parte estructural importante de las capas de la espora (21). Sin embargo, recientemente Kyu y Labbe encontraron que las capas de la espora contienen solo cantidades muy pequeñas de enterotoxina (34), lo que sugiere que esta proteína no tiene un papel estructural importante en las cubiertas esporales.

Löffler y Labbé describieron la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas que eran producidas por células esporulantes, y que estaban compuestas de una proteína con actividad biológica y con características fisicoquímicas e inmunológicas semejantes a la enterotoxina (42, 43).

Se tiene un conocimiento muy pobre sobre la genética de la producción de enterotoxina. Solo se sabe que los genes responsables de su síntesis se encuentran en el cromosoma (36), y que aproximadamente el 6% de las muestras fecales (no aisladas de ningún proceso patológico) contienen el gen de la enterotoxina (37).

## LA BILIS EN EL INTESTINO.

Se ha estimado que la flora microbiana intestinal de una persona, contiene mas de 400 especies diferentes, en donde las bacterias anaerobias son las predominantes: entre estas se encuentran los generos de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium* y *Peptostreptococcus* (25).

La mayoría de las bacterias que se ingeren junto con el alimento, durante su paso por el tracto gastrointestinal, son destruidas por los ácidos gástricos (13). El intestino delgado constituye una zona de transición entre el estómago, escasamente poblado y la abundante flora del colon. Bajo condiciones normales la microflora del duodeno es similar a la del estómago (73), encontrándose concentraciones de aproximadamente  $10^2$  a  $10^4$  UFC/ml siendo las especies predominantes: *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus* (6, 61).

El duodeno además de ser un lugar de transición entre el estómago y veyuno, es el lugar donde se realizan importantes descargas de sustancias, las cuales facilitan la digestión de los componentes nutritivos de los alimentos. Entre ellas se encuentran como principales la secreción biliar y la pancreática. Estas secreciones pueden además jugar un papel importante en el tipo de flora predominante en ese lugar (29).

Las células hepáticas constantemente están formando una

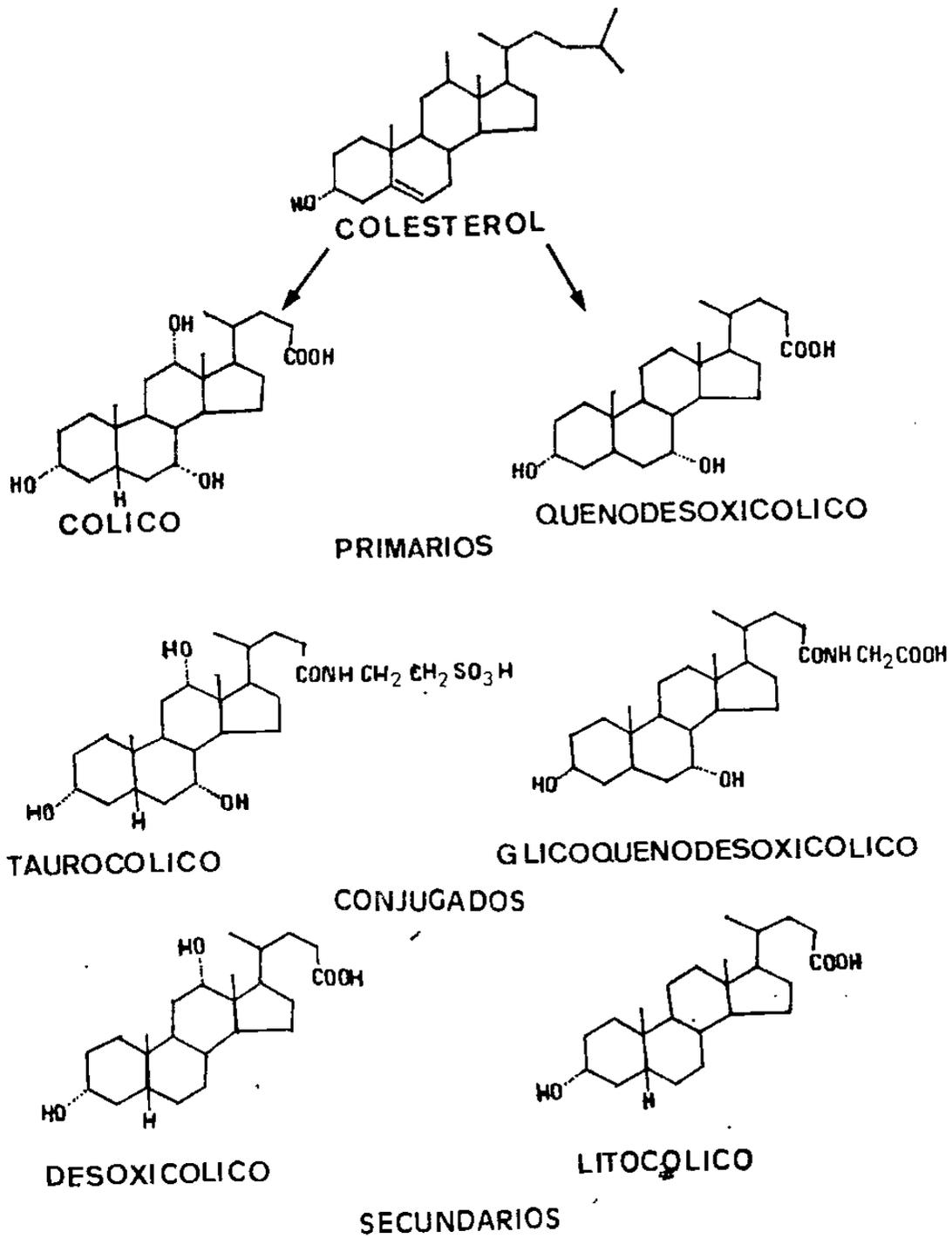


Fig. 1. Derivación de los Acidos biliares humanos.

secreción llamada jugo biliar o bilis, que es almacenada en la vesícula biliar (31). Los componentes más abundantes de la bilis son los ácidos biliares, los cuales representan aproximadamente la mitad de los solutos biliares, el resto está compuesto por bilirrubina, colesterol, ácidos grasos, lecitinas y electrolitos del plasma (52). Bajo las condiciones fisiológicas de pH, los ácidos biliares son ionizados y se combinan con iones sodio, formando sales, lo que aumenta en forma considerable su solubilidad (29).

Las sales biliares derivan del colesterol, formándose dos en el humano: colato y quenodesoxicolato de sodio, las cuales son llamadas sales primarias. En la vesícula biliar éstas se combinan con residuos de glicina y taurina formando taurocolato y glicocolato de sodio. Ya en el intestino (íleon y colon), y por la acción de algunas bacterias anaerobias como *Fusobacterium sp.* y *Bacteroides sp.* las sales biliares primarias son transformadas a desoxicolato y litocolato de sodio que son llamadas sales biliares secundarias. La subsecuente modificación de estas últimas, resulta en la producción de sales biliares terciarias las cuales son insolubles en agua y se eliminan casi totalmente en las heces (Fig 1 (60)).

Después de una comida, cuando el alimento llega al duodeno la grasa presente en él estimula la liberación de la hormona colecistocinina de la mucosa intestinal, la cual es absorbida por

la sangre y al llegar a la vesícula biliar causa una contracción muscular específica. Este mismo efecto es producido por una estimulación vagal asociada con reflejos gastrointestinales. Al contraerse la vesícula, se provocan estímulos neuro ó miogénicos sobre el esfínter de Oddi provocando su relajación y por ende, la liberación del contenido biliar en el intestino, mezclándose con el alimento (29).

La función de las sales biliares son dos principalmente. 1) emulsificación de grasas, debido a su naturaleza anfipática las sales biliares poseen acción detergente, ya que son capaces de disminuir la tensión superficial de las partículas de grasa, rompiéndolas, formando micelas, y 2) Contribución en la absorción de ácidos grasos, colesterol y otros lípidos en el tracto gastrointestinal. debido a la formación de micelas, que son muy solubles (31).

Ciertas enfermedades pueden modificar tanto la secreción, como la composición ó la proporción de los componentes biliares (19, 52). Entre esas se incluye a la cirrosis, la hepatitis aguda, la colestasis, la colelitiasis, etc. (5, 31).

La colelitiasis que es la presencia de cálculos biliares generalmente compuestos de colesterol, es la enfermedad más frecuente de las vías biliares (70). En un estudio epidemiológico realizado en Estados Unidos se encontró que el 70% de las mujeres

mayores de 30 años padecían este problema (52). Así mismo, se encontró que el embarazo era un factor predisponente de esta enfermedad (31).

El tratamiento contra la colelitiasis es la cirugía para la mayor parte de los pacientes, sin embargo, en los últimos años se ha utilizado como tratamiento alternativo, la administración oral de altas cantidades (10 a 15 mg/kg de peso/día) de glicocodenodesoxicolato de sodio, la cual es una sal biliar y ha mostrado buenos resultados (14).

Se ha observado que en las infecciones bacterianas de vías biliares *C. perfringens* es una de las principales bacterias anaerobias involucradas (10, 63). Incluso, se ha podido observar que esta bacteria es capaz de producir la desconjugación de varias sales biliares debido a su potencial enzimático (4, 24, 44, 49, 66).

Algunos autores han estudiado el efecto de la secreción biliar sobre el crecimiento de *C. perfringens*. Tal es el caso de Flotch y colaboradores (20), quienes encontraron que las sales biliares eran capaces de inhibir el crecimiento de bacterias de la flora normal, entre ellas *C. perfringens*, cuando eran adicionadas al medio de cultivo.

Ushijima y colaboradores (69) reportaron que algunas sales

biliares podían estimular la esporulación de *C. perfringens*, sin embargo, en un trabajo similar desarrollado por Hickey y Johnson (32) no se detectó ningún efecto sobre la bacteria. Debido a estas discrepancias no se cuenta con una idea confiable de la influencia de las sales biliares sobre la esporulación de la bacteria. Por lo que uno de los objetivos del presente trabajo fué el de demostrar si había algún efecto decisivo.

En relación con el efecto de las sales biliares sobre la producción de enterotoxina, no se ha encontrado ningún trabajo que haya estudiado este aspecto, por lo que en la presente investigación se estudió el efecto de las principales sales biliares y de la bilis humana sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens*.

Para este trabajo se estableció la siguiente hipótesis: las cuatro principales sales biliares humanas (colato, taurocolato, quenodesoxicolato y glicokenodesoxicolato de sodio) así como la bilis humana, son capaces de provocar una estimulación del crecimiento, la esporulación y de la producción de enterotoxina de *C. perfringens*.

Para esclarecer la veracidad de la hipótesis se produjo el siguiente objetivo general: Determinar el efecto de las cuatro sales biliares principales, una mezcla de ellas y del jugo biliar humano sobre a) el crecimiento

- b) la esporulación
- c) la producción de enterotoxina de *C. perfringens*.

## MATERIAL Y METODOS

### CEPAS UTILIZADAS.

En este estudio se utilizaron tres cepas enterotoxigenicas (ent<sup>+</sup>) y una cepa no enterotoxigenica (ent<sup>-</sup>). Las cepas productoras de enterotoxina fueron: NCTC 8239 (serotipo de Hobbs 3 = H-3), NCTC 8679 (serotipo de Hobbs 6 = H-6) y NCTC 10240 (serotipo de Hobbs 13 = H-13); la cepa no enterotoxigenica fue la ATCC 3624. Todas ellas fueron proporcionadas por el Dr. Ronald Labbé de la Universidad de Massachusetts, E.U.A.

Cuando las bacterias fueron recibidas, se inocularon en tubos que contenian caldo con tioqlicolato y se incubaron a 37°C por 12-14 horas, después de lo cual se inoculo una alicuota del cultivo en medio de carne cocida segun Robertson (12) y se incubó de nuevo por 48 horas a 37°C. Estos cultivos se almacenaron a 20°C y se les hicieron resiembras cada 6 meses.

### PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA ENTEROTOXINA

Esto se llevó a cabo de acuerdo a la metodologia descrita por Granum y Withaker (21), con algunas modificaciones, tal como se describe a continuación:

#### CULTIVO.

Para este fin se utilizo la cepa NCTC 8239. Esta se activo inoculando una alicuota del cultivo de reserva en un tubo de 16 x 150 mm con 10 ml de caldo con tioqlicolato, preparado

recientemente. Inmediatamente después se sometió a un choque térmico (75°C por 15 min), posteriormente se enrió con agua a temperatura ambiente y se incubo a 37°C por 14 a 16 horas. Con estos cultivos se inoculó (0.5%) medio de esporulación de Duncan y Strong (16) contenidos en matraces de 1 litro. Estos cultivos fueron incubados por 7 a 8 horas, tiempo en el cual se detectaron células con esporas retringentes, mediante la observación de los cultivos en un microscopio de contraste de fases.

#### EXTRACTO CELULAR.

Las células cultivadas fueron centrifugadas a 10,000 x g por 15 min a 5°C. El paquete celular fué recuperado y se lavó con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 6.8 (más inhibidores de proteasas: EDTA 0.1 M y fluoruro de fenil-metil-sulfonio (PMSF) 0.1 mM) (50). La suspensión bacteriana lavada se colocó en un matraz estéril dentro de un baño de agua con hielo y se sometió a ultrasonido para romper las células. El instrumento (Biosonik modelo BIO-1L) fué operado a intervalos de 1 minuto con 1 minuto de descanso. El procedimiento continuó hasta que obtuvimos aproximadamente un 95% de esporas libres mediante la observación de preparaciones de los cultivos en un microscopio de contraste de fases. La muestra fué centrifugada a 12,000 x g por 20 min a 5°C. El sobrenadante se recuperó y fué nuevamente sometido a centrifugación en las mismas condiciones antes señaladas. El sobrenadante obtenido (extracto celular) se utilizó para purificar la enterotoxina.

#### PURIFICACION DE LA ENTEROTOXINA

El extracto celular obtenido en el paso anterior fué sometido a una precipitación con un volumen igual de sulfato de amonio estéril al 80% de saturación. El procedimiento se llevó a cabo con agitación constante, agregando el sulfato de amonio muy lentamente y en un baño de agua con hielo. Después de concluir este proceso, se continuó agitando por 30 minutos más. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12,000 x g por 20 min a 4°C. El precipitado fué recuperado y resuspendido en amortiguador de fosfatos, y se sometió a una nueva precipitación con un volumen igual de sulfato de amonio al 30% de saturación, repitiéndose el proceso antes especificado. El precipitado obtenido se disolvió en amortiguador de fosfatos y se dializó contra la misma solución por 12-14 horas a 4°C.

Después que la muestra fue dializada, se adicionó 0.25 gr de sacarosa y se homogenizó. Esta solución fué sometida a cromatografía de exclusión molecular, usando una columna de 2.4 x 40 cm previamente empacutada con Sephadex G-100 y equilibrada con amortiguador de fosfatos. El proceso se desarrolló a 4°C.

Se obtuvieron fracciones de 5 ml y se les determinó su absorbancia a 280 nm. Aquellas que mostraron absorbancias a esa longitud de onda, se les determinó la actividad biológica e identidad inmunológica con la enterotoxina, mediante la técnica de inmunodifusión doble de Ouchterlony (70), utilizando suero anti-enterotoxina estándar proporcionado por el Dr. Per Einar Granum

del Instituto Noruego para la Investigación de los Alimentos.

Para determinar la pureza de la enterotoxina obtenida se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones no disociantes.

#### ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES NO DISOCIANTES.

Para realizar esta técnica se modificó la metodología descrita por Andrews (1) de la manera siguiente: la muestra de proteína (aproximadamente 1 mg/ml) fue mezclada 1:1 con una solución que contenía 0.01% de azul de bromofenol, glicerol al 20% (p/v) y Tris al 1.5% con un pH de 6.8.

Esta solución se centrifugó a 6,000 x g para eliminar cualquier material insoluble y una alícuota (20-60 µl) se sometió a electroforesis en un gel separador de poliacrilamida al 7% de 3 mm de grueso, con un gel concentrador al 2.5%. Se aplicaron 100 Volts para la concentración de las proteínas y 150 Volts para su separación. Todo el procedimiento fue llevado a cabo a 4°C. Se utilizó también una muestra de enterotoxina estandar facilitada por el Dr. Gerald Steina de la Administración de Drogas y Alimentos de E.U.A.

Después de la electroforesis el gel se colocó en una solución colorante (azul Commassie R-250 al 0.1% (p/v), metanol al 50% y

ácido acético al 10%) durante 1 hora con agitación constante. Posteriormente se eliminó el exceso de colorante manteniendolo en una solución al 10% de ácido acético en agitación y con recambios constantes.

#### PRODUCCION DE SUERO ANTIENTEROTOXINA.

El suero antienterotoxina fué producido en conejos siguiendo la metodología descrita por Bartholomew y Stringer (3):

Dosis Enterotox ( $\mu$ g)	Volumen Dosis (ml)	Adyuvante Completo*	Vía Administ	Día Inoculación
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 del adyuvante fué igual al volumen de la dosis

\*\* intramuscular

\*\*\* intravenosa

El sangrado se realizó el día 58

La actividad antienterotoxina del suero, se demostró mediante una inmunodifusión doble, usando la enterotoxina obtenida en nuestro laboratorio como antígeno y suero de referencia como

testigo.

#### DETECCION DE LA ENTEROTOXINA

##### CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Esta tecnica se desarrollo de acuerdo a la metodologia descrita por Naik y Duncan (47) con algunas modificaciones. las cuales se describen a continuación:

Se utilizo una solucion de agarosa tipo III (alta electroendosmosis) al 0.6% disuelta en amortiguador de barbital 0.06 M pH 8.5. De esta solucion se anadieron 38 ml a una placa de vidrio de 14 x 14 cm previamente cubierta con una fina capa de agar al 1% disuelto en el mismo amortiguador.

Despues de que la agarosa solidificó, se hicieron 5 hileras de pozos dobles con un diametro de 4 mm, distanciados 5 mm entre cada pozo y 1.3 cm entre cada hilera.

Los estandares de enterotoxina que contenian 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4 y 0.2 ug/ml, asi como las muestras a examinar fueron colocados (10 ul) en los pozos de las hileras mas cercanas al catodo. El suero anti-enterotoxina se diluyo 1:2 y se aplico en los pozos de las hileras mas proximas al anodo, en la misma cantidad que el antigeno.

Inmediatamente despues se realizo una electroforesis horizontal, utilizando el amortiguador de barbital en los

reservorios, y aplicando 130 Volts por un tiempo de 30 min.

Terminado el tiempo, las placas se colocaron en una cámara húmeda y se mantuvieron a temperatura ambiente por 12-14 horas. Posteriormente la placa se tino por 2 minutos con ácido tánico al 2% recién preparado y se determinó la presencia de bandas de precipitación. La última concentración del estándar que mostró banda se comparó con la última dilución de la muestra en la que se observó banda.

#### **DETERMINACION DE PROTEINAS**

##### **METODO DE BRADFORD.**

Se siguió el procedimiento descrito por este autor (9), el cual consistió en: añadir 5 ml del reactivo de Bradford (100 mg de azul brillante Comassie G-250, 50 ml de metanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v) diluido a 1 litro de agua bidestilada) a 100 µl de la solución problema o a estándares, se mezcló inmediatamente con ayuda de un agitador eléctrico y se dejó reposar por 15 min. Se determinó la absorbancia a 595 nm. En este caso se utilizó albumina sérica bovina como estándar. El contenido de proteínas en las muestras se determinó mediante una curva estándar (Ver Fig. 3)

#### **SALES BILIARES Y JUGO BILIAR USADOS**

##### **SALES BILIARES.**

Se utilizaron las cuatro principales sales biliares contenidas

en la bilis y descargadas en el duodeno humano: colato, taurocolato, quenodesoxicolato y glicoguenodesoxicolato de sodio.

De cada sal se utilizaron tres diferentes concentraciones que pueden encontrarse en el intestino humano. El colato, taurocolato y quenodesoxicolato, se usaron a 2.0, 0.5 y 0.125 mg/ml (concentracion final), en tanto que para el glicoguenodesoxicolato de sodio las concentraciones usadas fueron 5.0, 2.0 y 0.125 mg/ml. Se prepararon soluciones concentradas en amortiguador TRIS 0.05 M pH 8.8 y fueron esterilizadas por filtracion, utilizando una membrana con un poro de 22  $\mu$ m. Las soluciones estériles fueron guardadas en refrigeracion a 5°C hasta su uso. Tambien se utilizo una mezcla de las sales biliares colato, taurocolato, quenodesoxicolato y glicoguenodesoxicolato de sodio a una concentracion de 0.5:0.5:0.5:2.0 mg/ml respectivamente.

#### BILIS HUMANA TOTAL.

En este estudio se utilizo tambien bilis humana normal extraida por puncion directa de la vesicula biliar, durante la autopsia de personas fallecidas en un lapso no mayor a 12 horas. Las muestras se colectaron con ayuda de una jeringa esteril y se colocaron en recipientes estériles. Dichas muestras provenian de personas en su mayoria murieron en forma accidental violenta, y en ningun caso los fallecimientos fueron originados por problemas biliares o hepaticos. El historial clinico de estos pacientes no fue determinado. Las muestras se almacenaron a 20°C.

Para determinar si las muestras biliares presentaban alguna

contaminación, una alícuota de cada muestra fue sembrada en cajas petri con agar sangre (BBL), agar nutritivo (MERCK) y en tubos conteniendo caldo infusión cerebro corazón (BHI, BBL), los cuales fueron incubados en condiciones aeróbicas, y en placas con agar nutritivo, agar sangre y tubos con caldo tiodiolato (Difco), bajo condiciones anaeróbicas, usando para este fin, una mezcla de  $CO_2$ ,  $N_2$ ,  $H_2$  (90:5:5 respectivamente (51)) . Las placas y los tubos fueron incubados por 48 horas a  $37^\circ C$ . Las muestras que no mostraron crecimiento en ninguno de los medios usados, fueron mezcladas y se colocaron en recipientes estériles, congelándose a  $-20^\circ C$  hasta su uso.

## DETECCION DE SALES BILIARES

### CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Para determinar si la mezcla de jugo biliar contenía las principales sales biliares, se analizó una muestra de ésta mediante cromatografía en capa fina.

Esta se realizó según la metodología descrita por Plotch y colaboradores (20), con algunas modificaciones. El procedimiento fue el siguiente: se utilizaron placas de vidrio de 16 x 16 cm, las cuales se cubrieron con una placa de 3 mm de Sílica gel 60 (Pharmacia). Las placas se prepararon y se pudieron almacenar, sin embargo, antes de usarse se activaron calentándose a  $245^\circ C$  por 30 min. Las muestras estándar que se utilizaron (colato, taurocolato, quenodesoxicolato y alicoenodesoxicolato de sodio),

fueron obtenidas comercialmente (Sigma Chemical Co.), y se usaron a una concentración de 1 mg/ml. También se utilizó la bilis humana completa y la mezcla de sales biliares. Las muestras (10 µl) se añadieron con ayuda de un aplicador.

Posteriormente la placa se colocó en una cuba cromatográfica, la cual contenía como fase móvil ácido acético, éter etílico, amil acetato, isopropanol y benceno en proporción 1:4:10:10:2:2 respectivamente. El sistema se corrió por tres horas, al cabo del cual la placa se colocó en una campana de ventilación y se le aplicó revelador universal (Sigma chemical Co.) dejándose reposar por un tiempo de 30 min. Posteriormente la placa se calentó a 245°C por 30 min, para observar la aparición de manchas.

#### **ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO, ESPORULACION Y PRODUCCION DE ENTEROTROXINA.**

##### **CULTIVO.**

Las cepas fueron activadas colocando una alícuota del cultivo de reserva en un tubo que contenía 10 ml de caldo con tioglicolato. Inmediatamente después se le realizó un choque térmico (75°C/15 min) para activar las esporas y se incubó a 37°C por 14-16 horas.

Este cultivo sirvió para inocular (al 10%) tubos de 16 x 150 mm que contenían 10 ml de medio definido (D) de Sacks y Thompson (58, Tabla 1) recién preparado con 0.9% de sacarosa y 1 mM de guanosina (56). Los tubos fueron incubados por 3 horas a 37°C. De

este cultivo se inocularon (al 2%) tubos de 13 x 100 mm y matraces Erlenmeyer de 50 ml que contenían 3 y 25 ml respectivamente de medio D con las sales biliares o el jugo biliar. La cantidad de la dextrina en el medio D fué el triple que la formulación original (35). Los cultivos fueron incubados en un baño de agua a 37°C.

Tabla 1. Composición del medio D.

Componente	Conc. final (mg/l)	Componente	Conc. final (mg/l)
L-Alanina	500	MOPS	10,000
L-Arginina	5000	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,000
L-Asparagina	500	NaHCO <sub>3</sub>	500
L-Cistina	50	Dextrina	3,000
Glicina	500	Glucosa	1,500
L-Ac. Glutámico	5000	Riboflavina	0.5
L-Glutamina	250	Pantotenato de Ca	1.0
L-Histidina	250	Piridoxamina	0.5
L-Hidroxiprolina	125	Ac. Nicotínico	1.0
L-Isoleucina	250	Ac Fólico	1.0
L-Leucina	375	Tiamina	0.5
L-Lisina	500	Biotina	0.005
L-Metionina	250	EDTA sal férrica	93.8
L-Prolina	250	EDTA sal tetrasódica	41.6
L-Fenilalanina	500	Cloruro de manganeso	19.79
L-Serina	375	Cloruro de calcio	122
L-Treonina	125	Sulfato de zinc	11.5
L-Triptorano	250	Sulfato de cobre	0.025
L-Tirosina	125	Tiocticolato sódico	100
L-Valina	187.5	Ascorbato de sodio	250
Uracilo	12.5		
Adenina	14.25		

Los cultivos en los tubos fueron utilizados para realizar las curvas de crecimiento y la determinación de esporas, en tanto que los cultivos de los matraces se utilizaron para la determinación de

enterotoxina.

#### CURVA DE CRECIMIENTO.

Estas se realizaron mediante la determinación de la densidad óptica de los cultivos a 600 nm cada hora. Para este fin se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 35.

#### DETERMINACION DE ESPORAS.

##### a) ESPORAS TERMORRESISTENTES.

Los cultivos fueron incubados a 37°C por 10 horas. Posteriormente, se les realizó un choque termico (de la manera descrita anteriormente), a fin de matar las células vegetativas. Después de esto, los cultivos fueron rápidamente enfriados colocándolos en un baño de agua con hielo.

Para determinar las esporas presentes se utilizó el método de conteo en placa (35), el cual consistió en hacer diluciones decimales de los cultivos en agua peptonada al 1%. Posteriormente fueron inoculadas en placas de Petri a las que luego se les adicionó medio nutritivo con agar (1.5% Trypticase peptona (BBL), 1.0% extracto de levadura (Difco) y 1.5% de agar agar (Merck)).

Después que las placas de gelosa se solidificaron, fueron colocadas en anaerobiosis (utilizando la mezcla de gases antes descrita) y se incubaron a 37°C por 24 horas. tiempo después del cual se determinó el número de colonias presentes en las placas.

#### b) CALCULO DE PROPORCION DE ESPORULACION.

Esto se realizó mediante preparaciones húmedas de los cultivos, tomando una alícuota de ellos y colocándola entre porta y cubreobjetos. El conteo de células vegetativas y en esporulación se realizó mediante un microscopio de contraste de fases. Se contaron al menos 300 células por preparación y se realizaron al menos dos preparaciones por muestra.

#### DETERMINACION DE ENTEROTOXINA

Los cultivos incubados por 7-8 horas fueron enfriados y centrifugados a 10,000 x g por 15 min, a 5°C. Del baquete celular obtenido se obtuvo el extracto celular de la manera descrita anteriormente y a este se le determinó su contenido de enterotoxina y de proteína total por los métodos ya descritos.

## RESULTADOS.

### PRODUCCION Y PURIFICACION DE ENTEROTOXINA.

Si siguiendo el procedimiento descrito, se obtuvo un cromatograma con dos grupos de fracciones con absorbancias a 280 nm (Fig 2). El primero mostro una absorbancia maxima a 260 v no demostró identidad inmunológica con la enterotoxina. El segundo grupo de fracciones mostro bandas de identidad inmunológica total en la técnica de inmunodifusión doble de Ouchterlony.

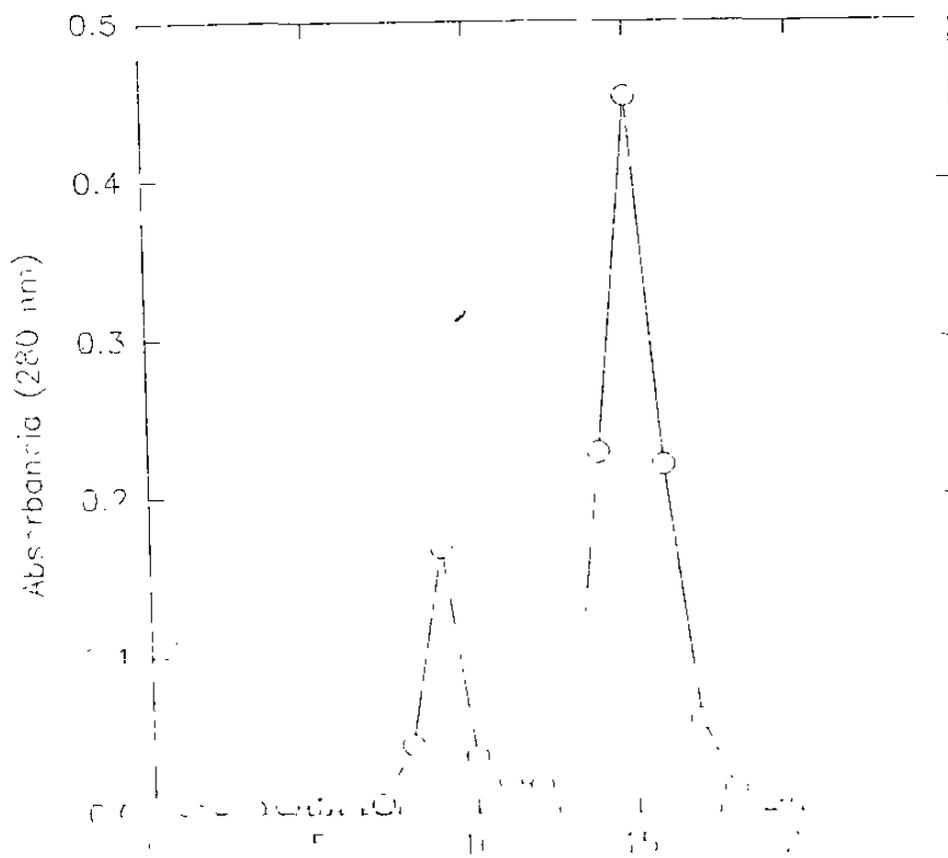


Fig. 2

Fig 2. Cromatograma obtenido durante el proceso de purificación de la enterotoxina de *C. perfringens*.

Al realizarse la electroforesis en gel de poliacrilamida del segundo grupo de fracciones, se observó una sola banda, la cual coincidía con la enterotoxina estándar (dato no mostrado). Esto nos indicó que la enterotoxina que se produjo y se purificó se encontraba en un buen estado de pureza.

#### DETERMINACION DE PROTEINAS.

En la determinación se utilizaron estándares de albúmina sérica bovina, obteniéndose una curva estándar (Fig. 3), la cual sirvió para determinar el contenido proteico de los extractos celulares.

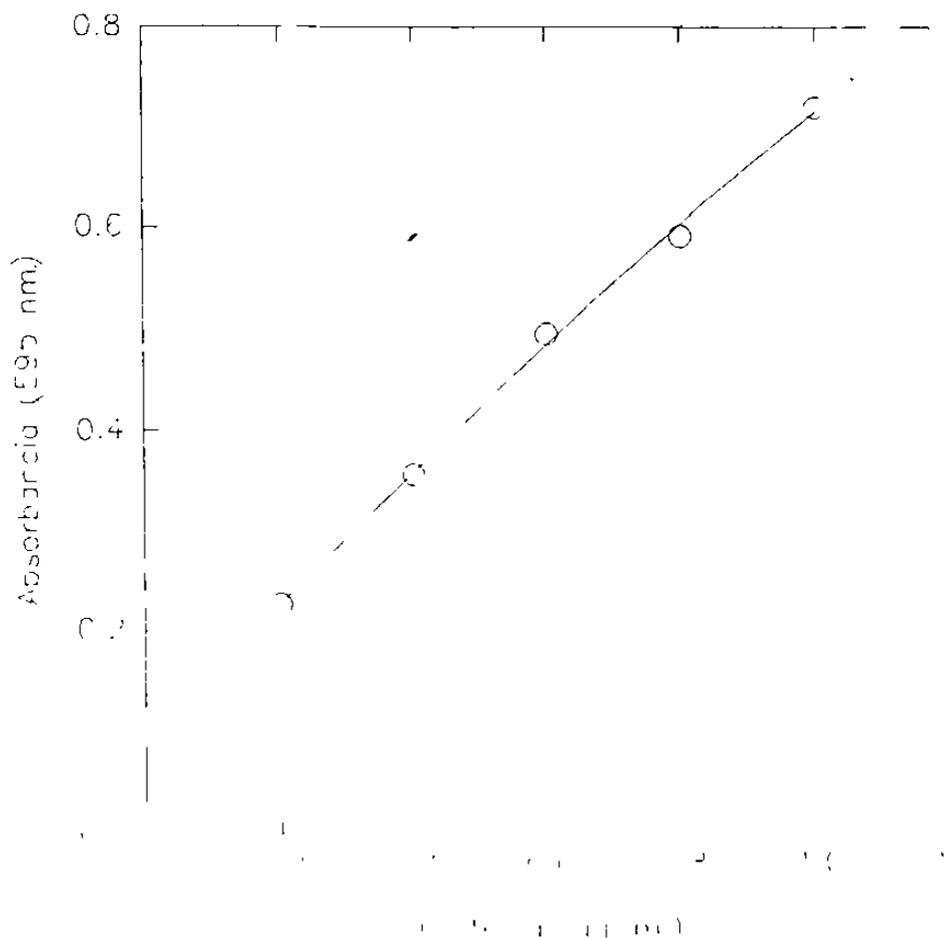


Fig. 3 Curva estándar para la determinación de proteínas.

#### DETECCION DE SALES BILIARES EN LA BILIS.

Se colectaron 29 muestras de jugo biliar, de las cuales 19 se probó que se encontraban estériles. Estas fueron mezcladas en una muestra única y luego sometida a cromatografía en capa fina. Las muestras contaminadas fueron desechadas.

El cromatograma del jugo biliar (Fig 4) mostro 5 manchas bien definidas, 4 de las cuales correspondian a nuestros estandares de sales biliares y la otra pudiera corresponder a pigmentos u otros componentes biliares.

Los Rf de los diferentes estandares de las sales biliares fueron los siguientes:

colato:	0.39	guenodesoxicolato:	0.18
taurocolato:	0.05	glicoguenodesoxicolato:	0.73

Estos datos indicaron que se pudo tener una buena separacion entre cada sal usada. El estandar taurocolato produjo dos bandas, una de ellas, se encontro en la misma posicion que la mostrada por el colato de sodio. Esto pudo explicarse debido a que la sal comercial taurocolato de sodio contenia un bajo porcentaje de colato de sodio (2-5%).

Los Rf de la mezcla de muestras de jugo biliar fueron: 0.05, 0.18, 0.38 y 0.73. Al comparar los resultados de los estandares con la mezcla de jugo biliar, pudimos observar que son similares.

Con lo anterior, se pudo demostrar la presencia de las

principales sales biliares en la mezcla de jugo biliar humano.

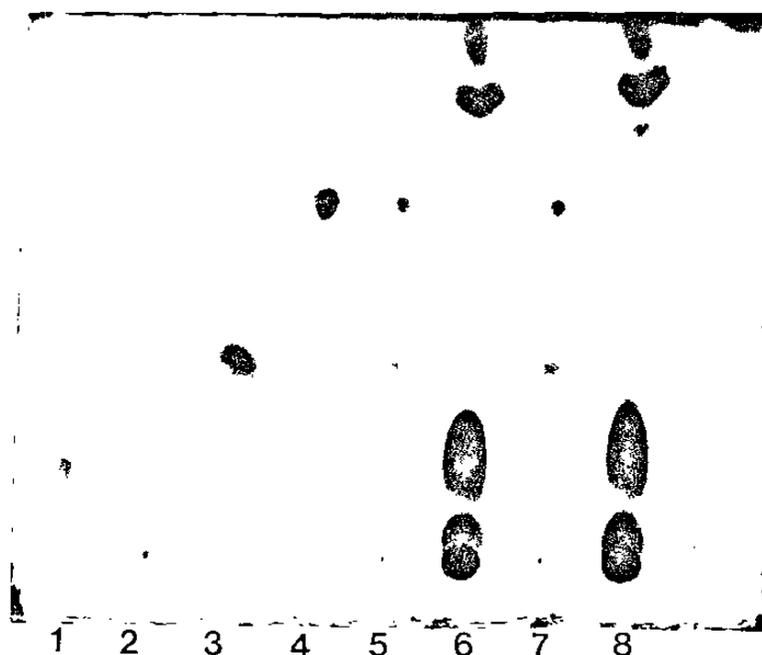


Fig. 4. Perfil de elución obtenido después de realizar cromatografía en capa fina de las sales y bilis humana. En el carril 1 al 4 se encuentran los estándares de sales biliares: quenodesoxicolato, taurocolato, colato y glicodenodesoxicolato de sodio respectivamente. En los carriles 5 y 7, las mezclas de los estándares anteriores y en los carriles 6 y 8 la mezcla de las muestras bilis.

**EFFECTO DE LAS SALES Y JUGO BILIAR EN EL CRECIMIENTO DE *C. perfringens*.**

El efecto de las sales biliares humanas sobre el crecimiento de las cepas enterotoxigenicas (ent<sup>+</sup>) y no enterotoxigenicas (ent<sup>-</sup>) de *C. perfringens* está resumido en la tabla 2.

Las figuras 5 a la 20 muestran las curvas de crecimiento para las cuatro cepas de *C. perfringens* ensayadas con las sales biliares, en donde se observo que estas sales a altas concentraciones produjeron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas. Este efecto tué disminuyendo cuando se utilizaron concentraciones más bajas, incluso se obtuvieron bajos niveles de estimulación a bajas concentraciones en la cepa no enterotoxigenica (ent<sup>-</sup>).

El quenodesoxicolato de sodio, cuando tué anadido a los cultivos en concentraciones altas, resultó ser el más fuerte inhibidor del crecimiento en todas las cepas.

Cuando se utilizó la mezcla de sales biliares no se pudo detectar crecimiento en las cepas ent<sup>+</sup>. Sin embargo, la cepa ent<sup>-</sup> si pudo crecer aunque a bajos rendimientos (Fig. 21).

Cuando el jugo biliar se adicionó a los cultivos en dilución 1:20 a 1:320, no se detectó crecimiento. Para eliminar la posibilidad de que algún componente proteico del jugo biliar con

actividad inhibitoria del crecimiento estuviera presente en la muestra, la bilis fué calentada a 75°C por 15 min, y posteriormente incorporada al cultivo. Sin embargo, tampoco pudo detectarse crecimiento.

CEPA	SAL BILIAR	PORCIENTO DE REDUCCION <sup>1</sup>			
		CONCENTRACION DE LA SAL (mg/ml)			
		0.125	0.5	2.0	5.0
NCTC 8239	Colato	11	10	16	ND
	Taurocolato	14	18	81	ND
	Glicoquenodesoxi- colato	4	ND	60	66
	Quenodesoxicolato	8	63	100	ND
NCTC 8679	Colato	68	88	80	ND
	Taurocolato	53	61	88	ND
	Glicoquenodesoxi- colato	53	ND	23	30
	Quenodesoxicolato	50	99	99	ND
NCTC 10240	Colato	20	32	43	ND
	Taurocolato	27	25	88	ND
	Glicoquenodesoxi- colato	19	ND	23	30
	Quenodesoxicolato	33	96	96	ND
ATCC 3624	Colato	0 <sup>2</sup>	0	20	ND
	Taurocolato	0	5	98	ND
	Glicoquenodesoxi- colato	2	ND	61	67
	Quenodesoxicolato	0	95	100	ND

<sup>1</sup>A<sub>600</sub> en la presencia de sales biliares/ A<sub>600</sub> en la ausencia de las sales. La lectura de la absorbancias corresponde a las 6 horas de cultivo.

0<sup>2</sup>, no inhibición o estimulación ligera.

ND, no determinado.

Tabla 2. Porciento de reducción de la absorbancia de los cultivos de *C. perfringens* cuando se añadieron sales biliares al medio de cultivo.

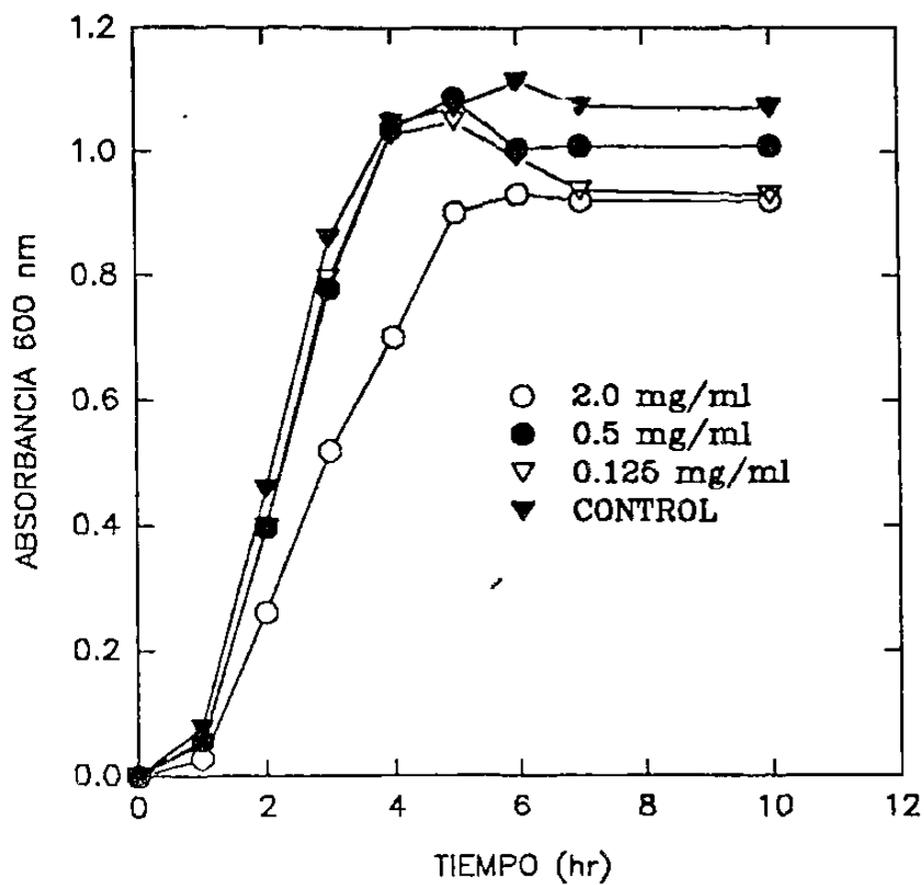


Fig. 5. Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 cultivada en medio Definido con colato de sodio

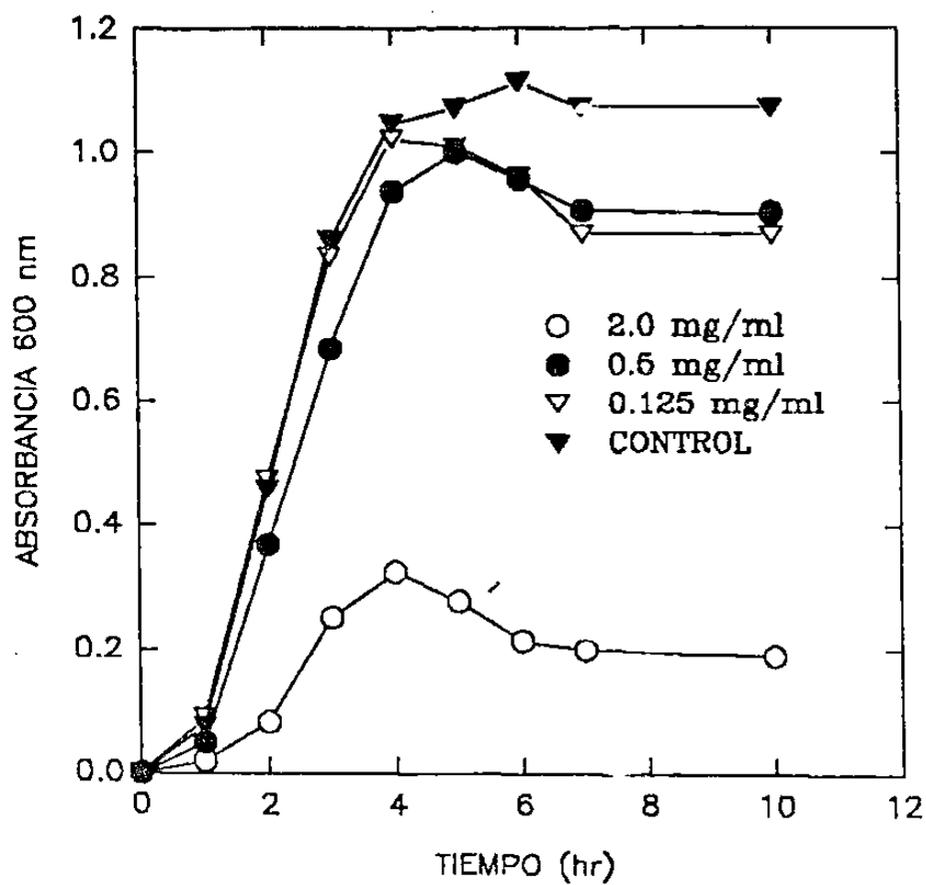


Fig. 6. Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 cultivada en medio Definido con taurocolato de sodio.

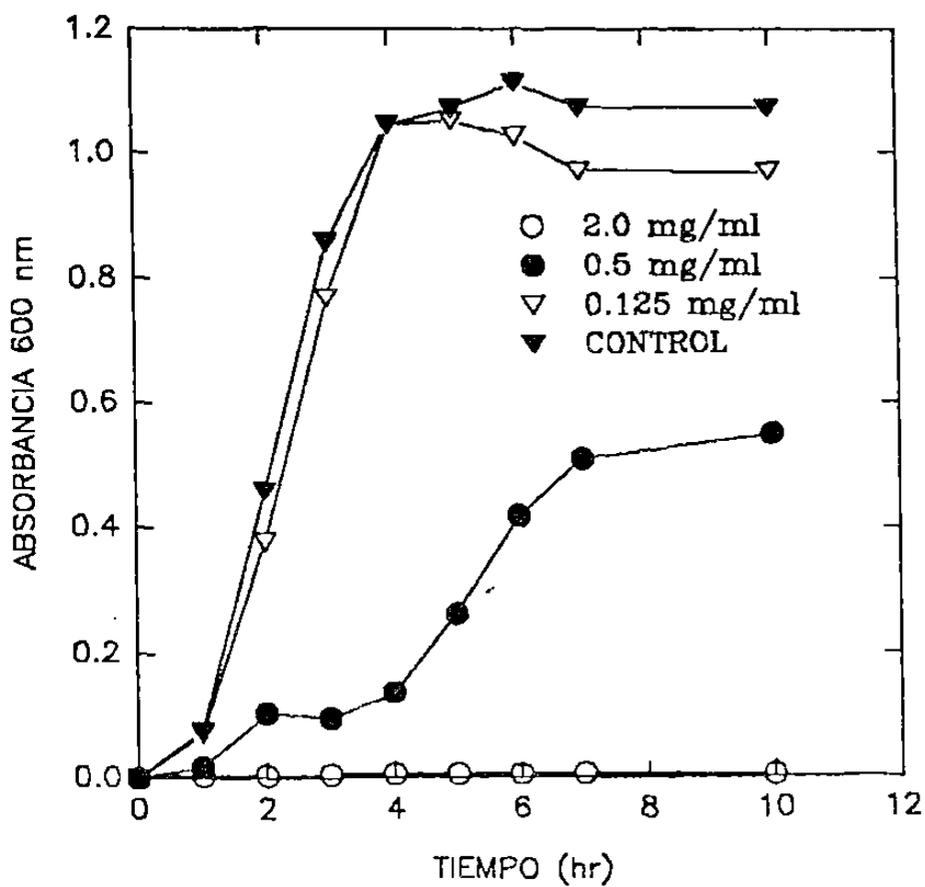


Fig. 7. Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8239 cultivada en medio Definido con glicoquenodesoxicolato de sodio.

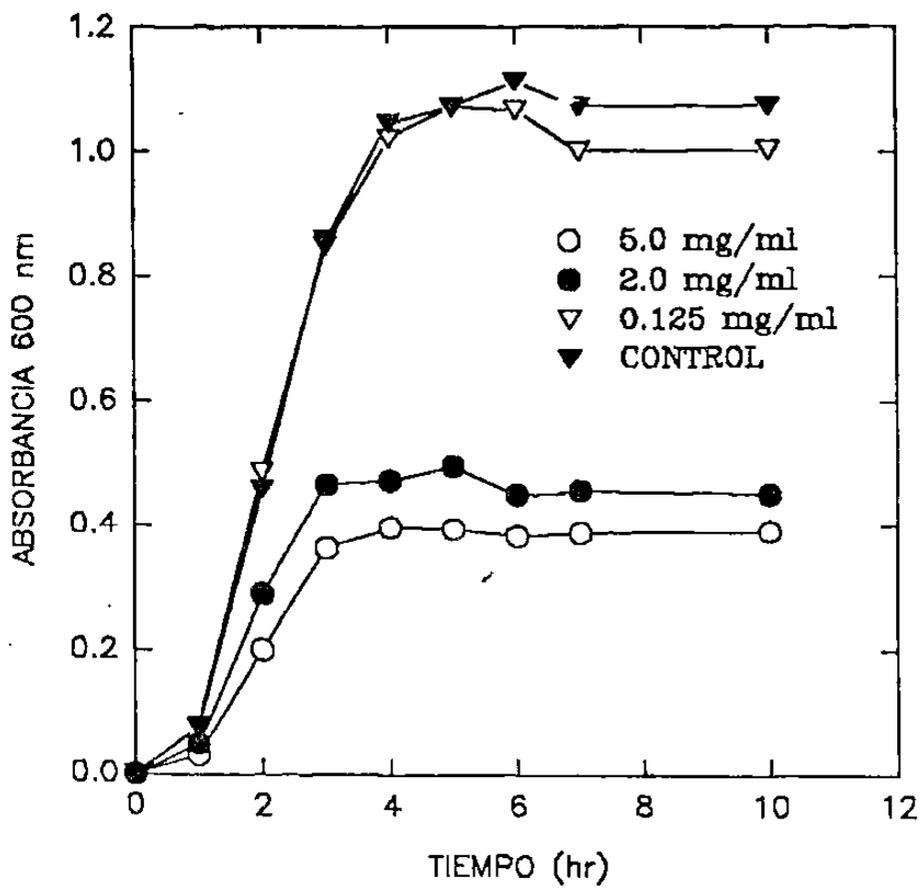


Fig.8. Curva de crecimiento de *C. peritringens* cepa NCTC 8239 cultivada en medio Definido con quenodesoxicolato de sodio.

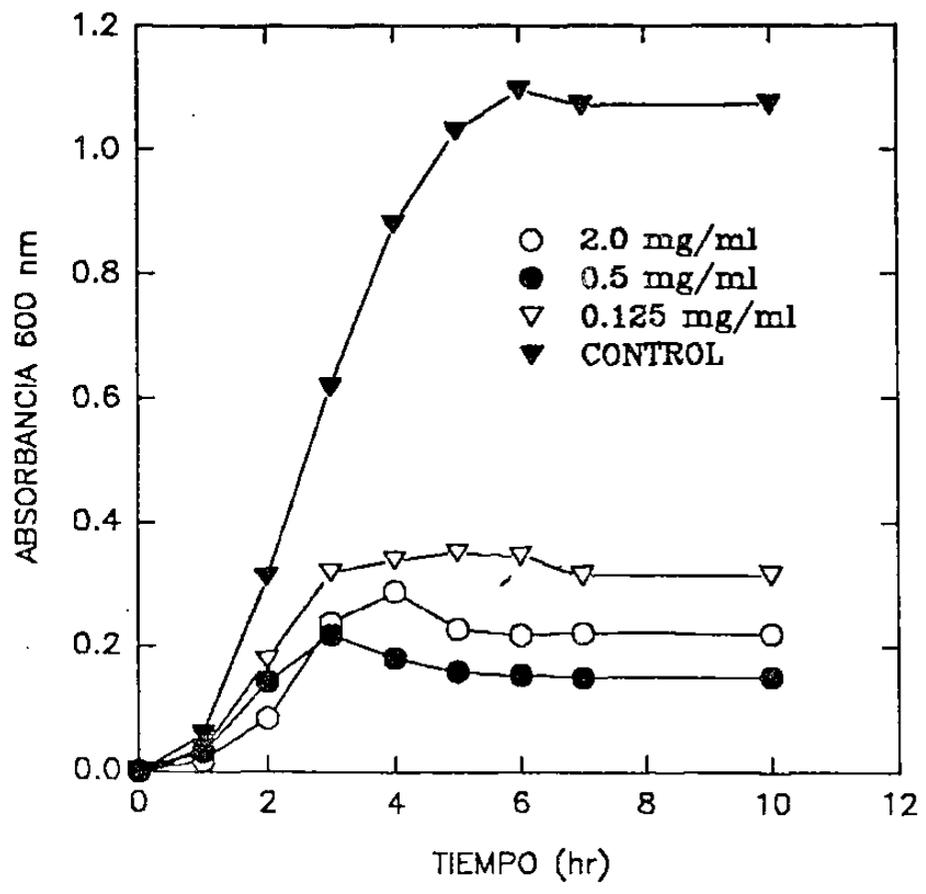


Fig. 9- curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8679 cultivada en medio definido con colato de sodio.

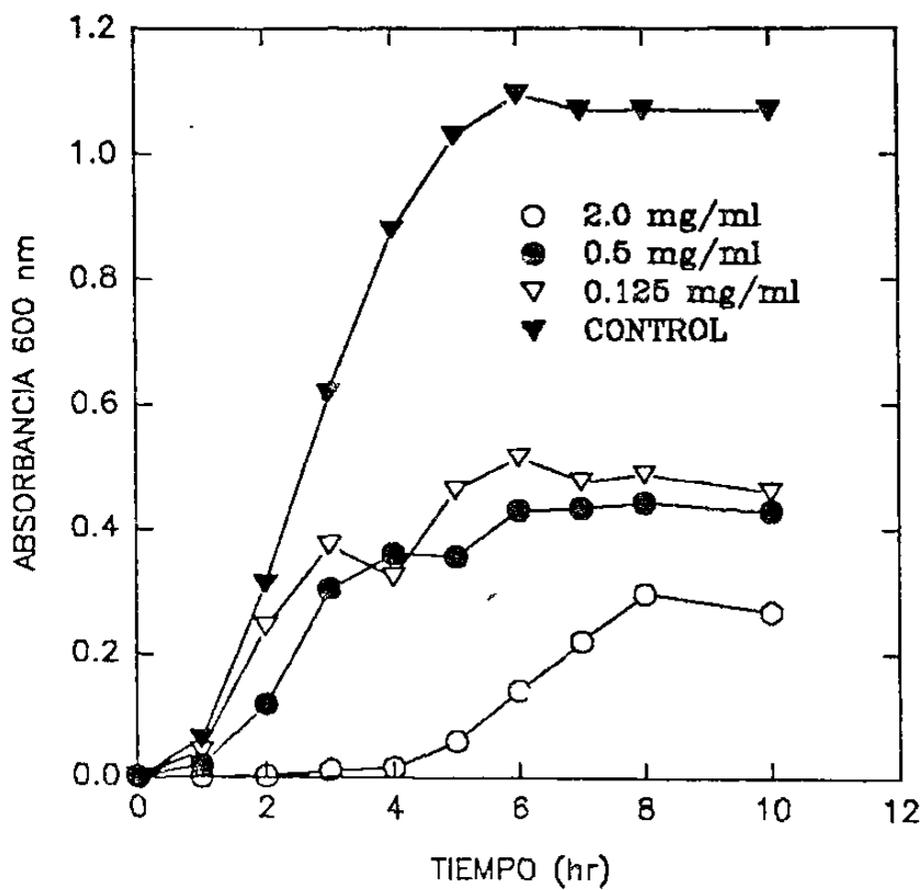


Fig. 10. Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8579 cultivada en medio definido con taurocolato de sodio.

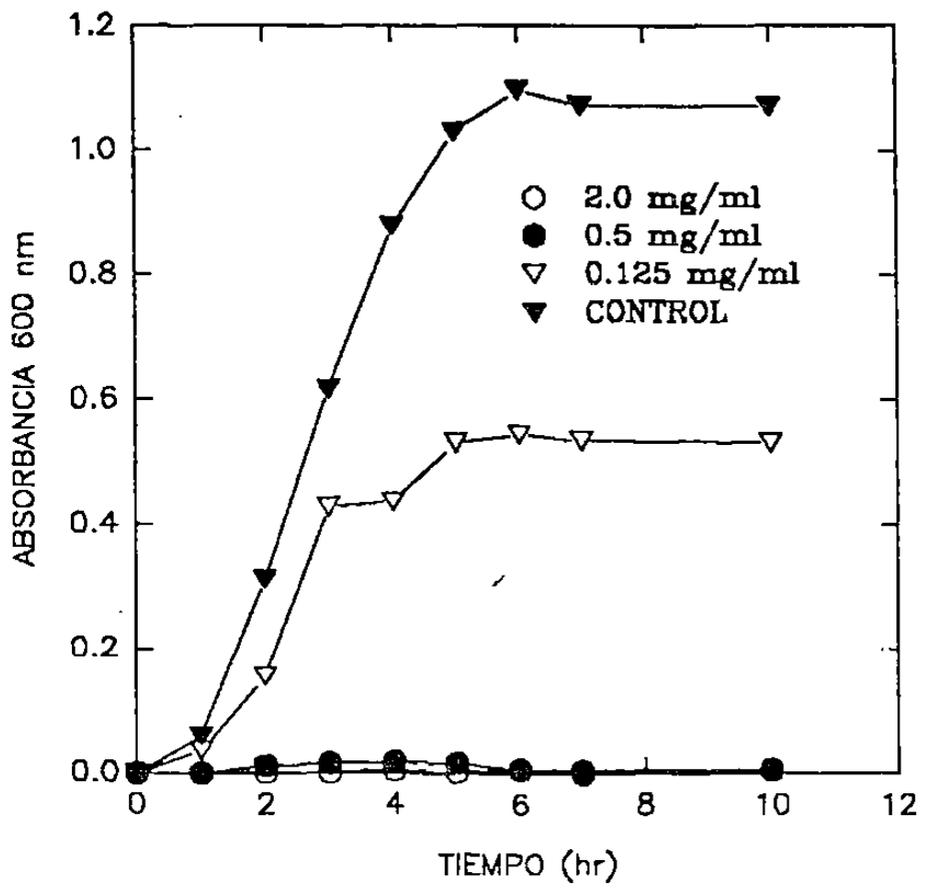


Fig. 11. Curva de crecimiento de *C. parvum* cepa NCTC 8679 cultivada en medio definido con quemodesoxicolato de sodio.

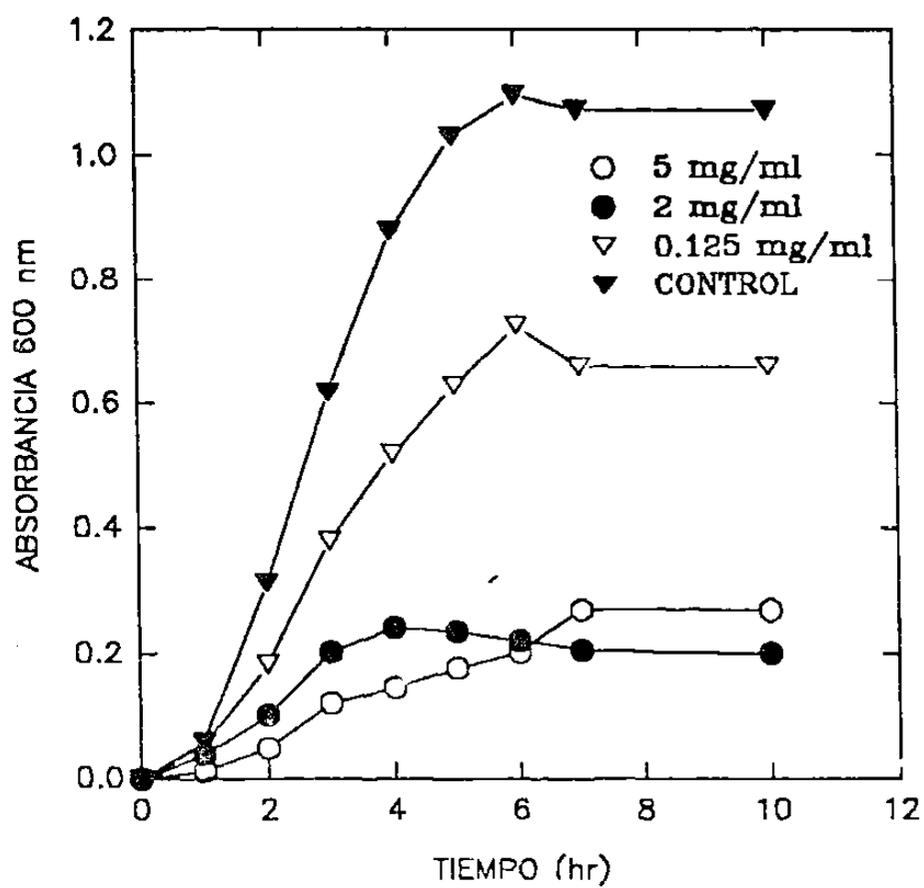


Fig. 12. Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 8679 cultivada en medio Definido con glicoquenodesoxicolato de sodio.

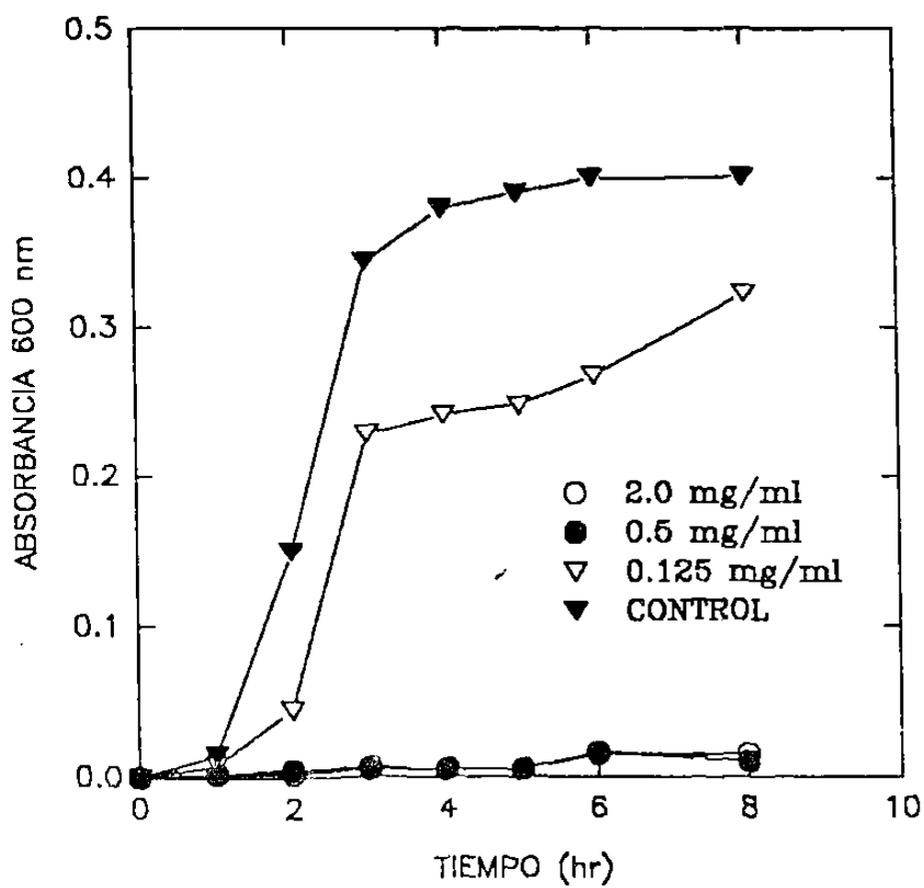


Fig.13. Curva de crecimiento de *C. peritrinzens* cepa NCTC 10240 cultivada en medio Definido con quenedesoxicolato de sodio.

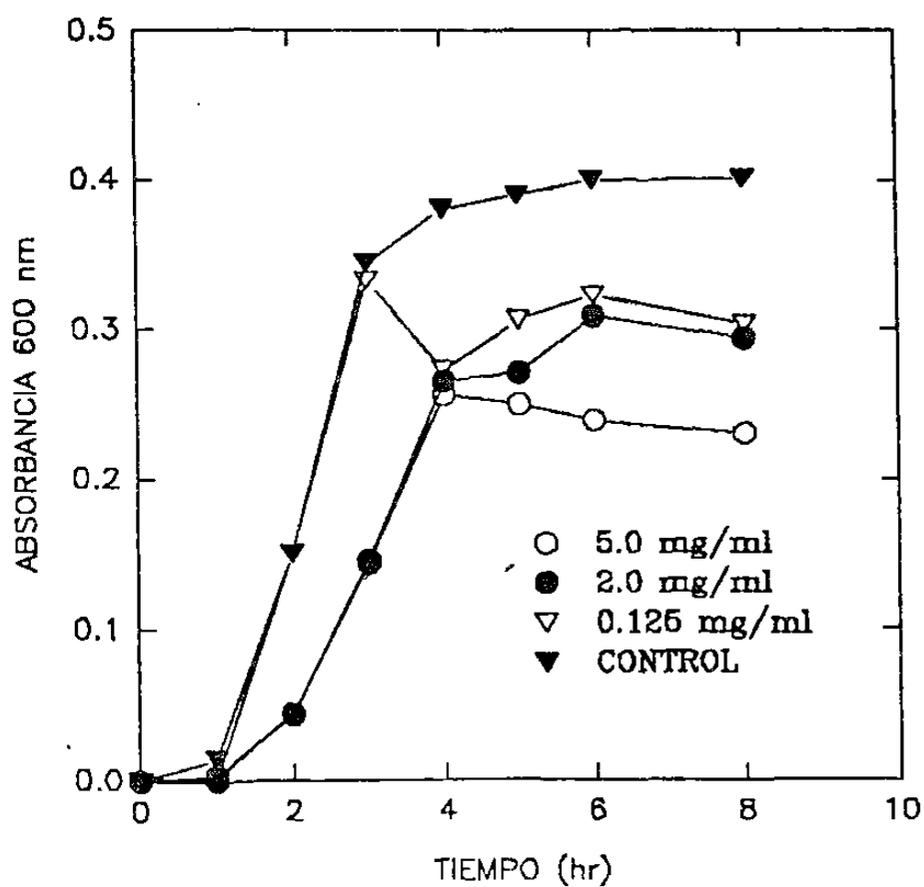


Fig.14. CURVA de crecimiento de *C. peritringens* cepa NCTC 10240 cultivada en medio Definido con glicocuenodesoxicolato de sodio.

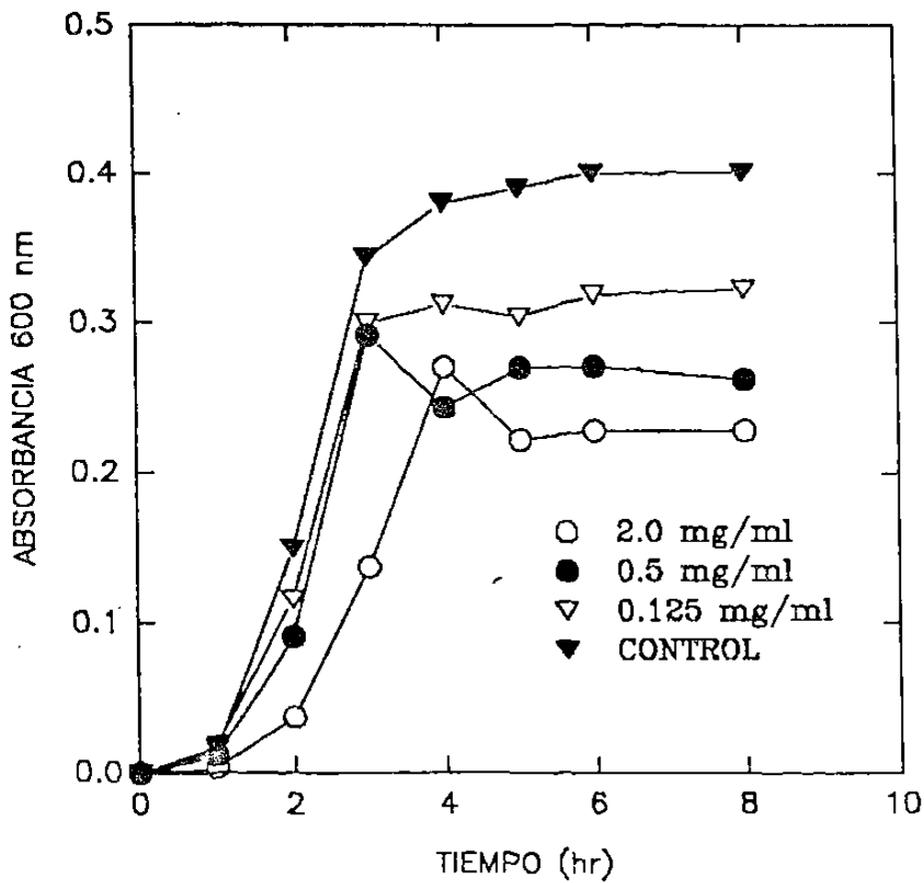


Fig.15. Curva de crecimiento de *C. peritrinagens* cepa NCTC 10240 cultivada en medio definido con colato de sodio.

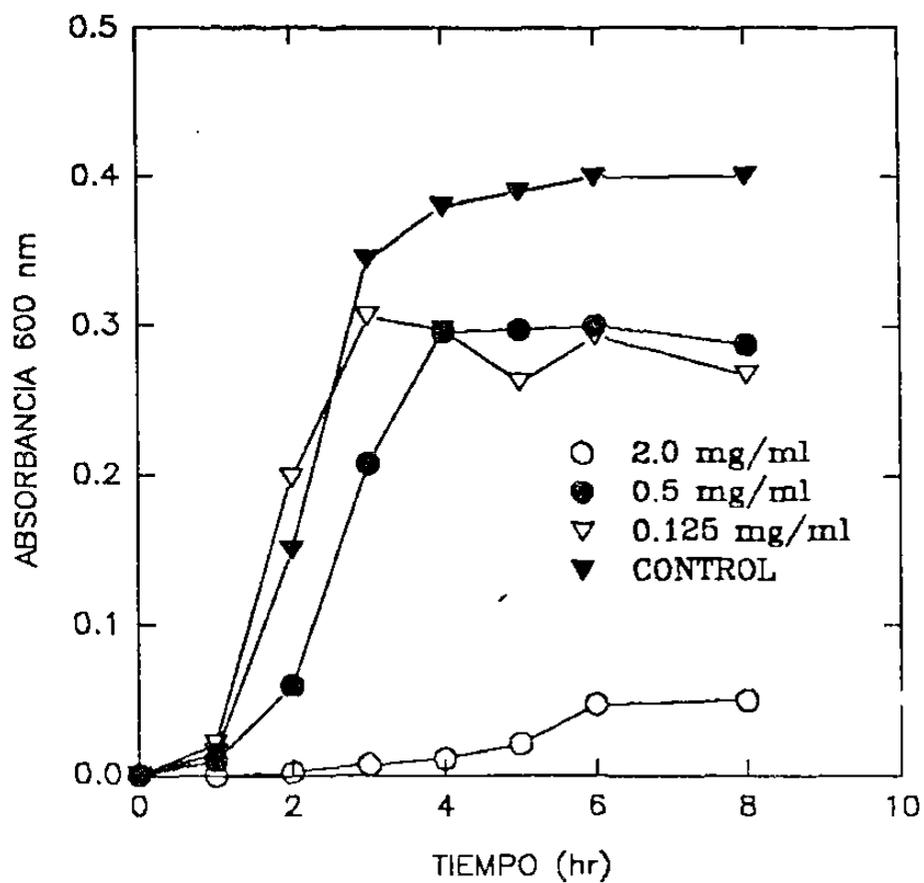


Fig.16. Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa NCTC 10240 cultivada en medio Definido con taurocolato de sodio.

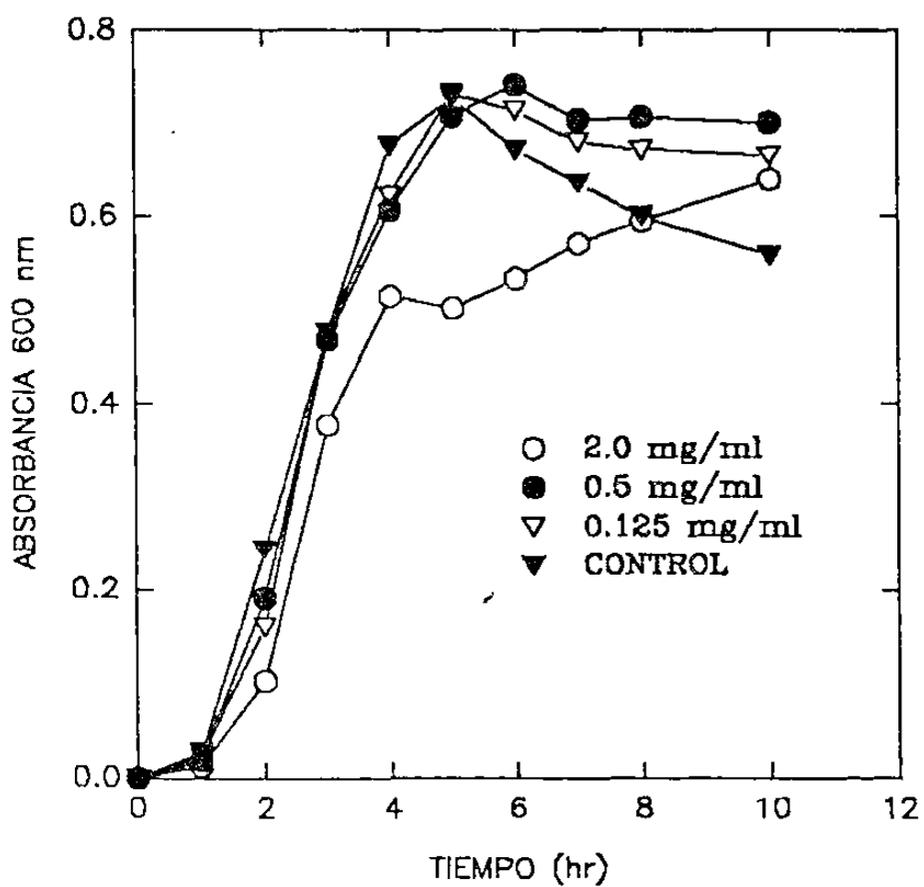


Fig. 17. Curva de crecimiento de *Clostridium perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio definido con colato de sodio

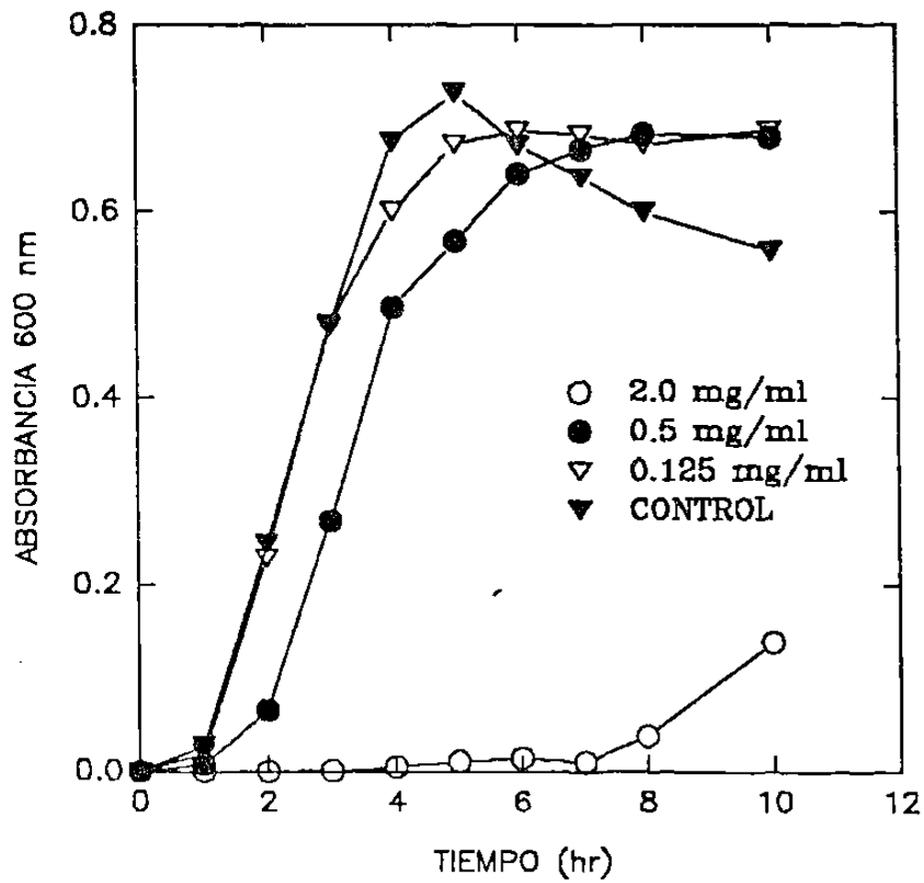


Fig. 18. Curva de crecimiento de *Clostridium perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio definido con taurocolato de sodio

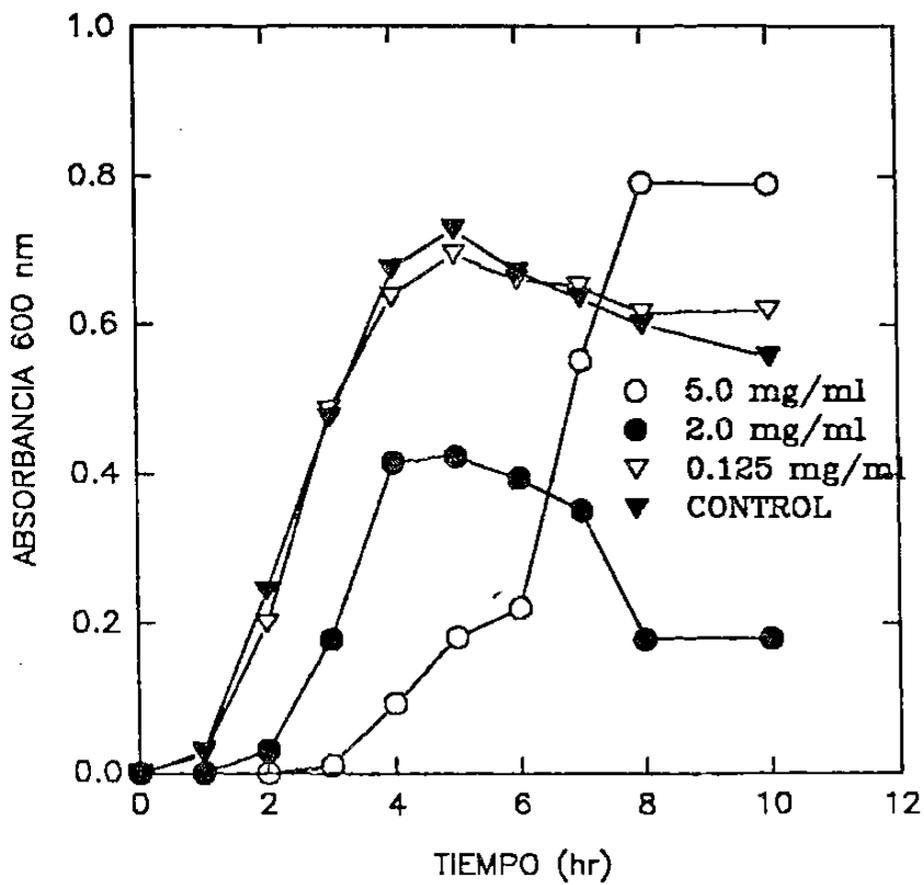


Fig. 19. Curva de crecimiento de *Clostridium perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio definido con glicocolesoxicolato de sodio

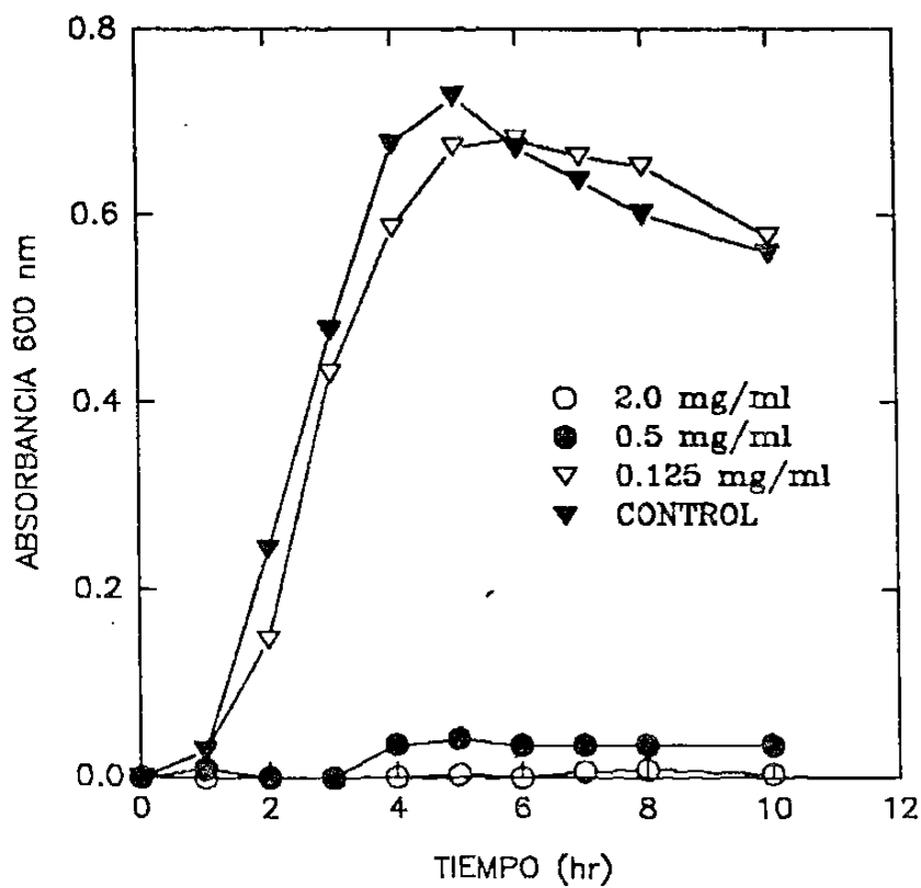


Fig. 20. Curva de crecimiento de *Colstridium perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio definido con queno-desoxicolato de sodio

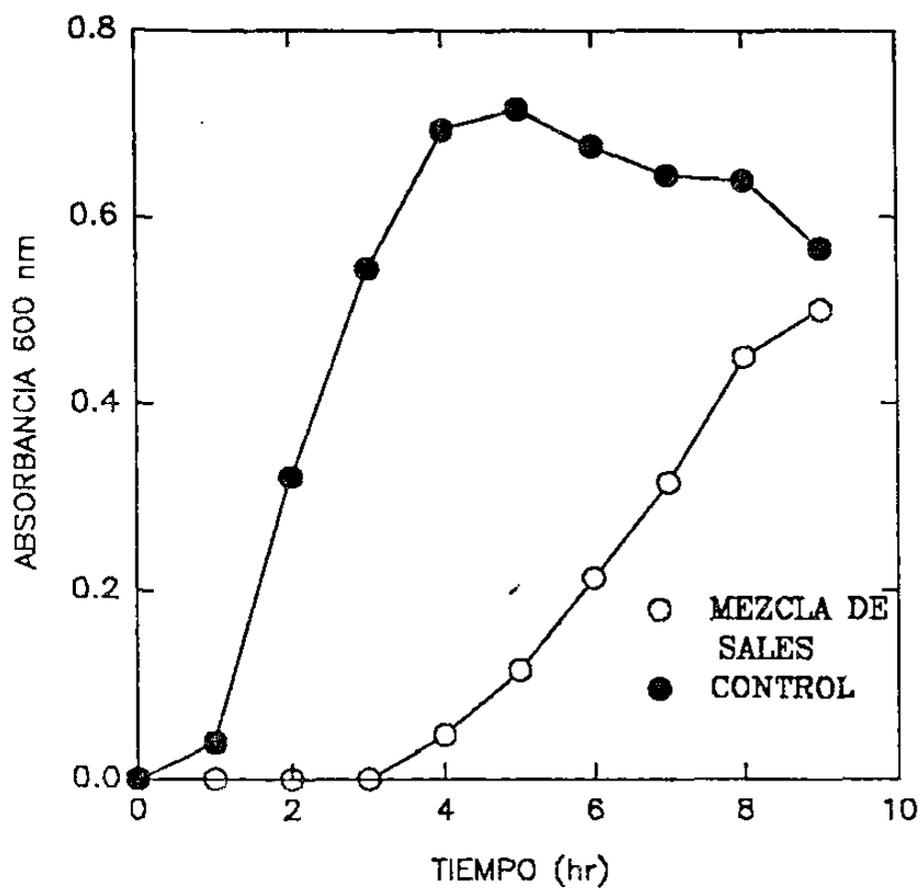


Fig.21 . Curva de crecimiento de *Clostridium perfringens* cepa ATCC 3624 cultivada en medio definido con la mezcla de sales biliares.

#### **EFFECTO DE LAS SALES BILIARES SOBRE LA ESPORULACION.**

Los resultados obtenidos en este punto fueron sometidos a un análisis estadístico, mediante la comparación múltiple de medias (Prueba de Tukey) y la "t" de student.

Las cepas NCTC 8239 (H-3) y NCTC 86769 (H-6) no esporularon en el medio D normal, por lo que se pudo observar un efecto estimulador muy claro de la esporulación cuando se adicionaron las sales biliares al medio de cultivo (Tabla 2). Este mismo efecto no pudo ser detectado en forma tan convincente en las otras cepas (NCTC 10240 y ATCC 3624), ya que sus controles produjeron altos niveles de esporas.

Cuando se utilizó el colato de sodio se obtuvo un efecto estimulador directamente proporcional con su concentración en todas las cepas utilizadas. Un efecto contrario fué obtenido al utilizar las otras sales biliares.

En algunos cultivos no fué posible detectar la presencia de esporas termorresistentes. Sin embargo, cuando esos fueron observados con ayuda de un microscopio de contraste de fases, se pudo detectar la presencia de esporas defectuosas, por lo que en estos casos se realizó un conteo de células y se determinó el porcentaje de esporulación.

TABLA 3. Esporulación de *C. perfringens* en presencia de sales biliares.

CEPA	SAL BILIAR	CONTROL	CONCENTRACION DE LA SAL (mg/ml.)		
			0.125	0.5	2.0
NCTC 8239	Colato	< 1			
	Taurocolato		4.8	6.3	--
	Glicocoqueno-		2.7	(1%) <sup>2</sup>	--
	desoxicolato		--	(15%)	(<1%)
	Quenodesoxi-		6.5	< 1	--
colato					
NCTC 8679	Colato	< 1			
	Taurocolato		5.7.	6.3	--
	Glicocoqueno-		6.9	< 1	--
	desoxicolato		--	3.7	< 1
	Quenodesoxi-		5.6	< 1	--
colato					
NCTC 10240	Colato	6.2			
	Taurocolato		6.0	5.0	--
	Glicocoqueno-		6.3	2.3	--
	desoxicolato		--	(63%)	(40%)
	Quenodesoxi-		5.3	< 1	--
colato					
ATCC 3624	Colato	4.2			
	Taurocolato		4.6	5.7	--
	Glicocoqueno-		7.3	0.6	--
	desoxicolato		--	2.5	< 1
	Quenodesoxi-		2.5	< 1	--
colato					

1: Log de esporas termo resistentes/ ml.

2: Todos los números en parentesis indican porcentaje de esporulación a las 7 horas. No se detectaron esporas termoresistentes.

#### **EFFECTO DE LAS SALES BILIARES EN LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA.**

La determinación de enterotoxina se realizó mediante la metodología descrita anteriormente, usando la técnica de contrainmunolectroforesis, la cual tuvo una sensibilidad de 3 µg/ml. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico de comparación múltiple de medias (prueba de Tukey), así como al análisis "t" de student.

En la mayoría de los casos las sales biliares produjeron un efecto estimulador en la producción de enterotoxina cuando se añadieron a los cultivos de las cepas ent\* (Tabla 4).

Al igual que en el punto anterior, en donde los cepas NCTC 8239 y NCTC 8679 no esporularon en el medio de cultivo, tampoco se pudo detectar enterotoxina. Sin embargo, se pudo observar un efecto estimulador muy claro en la producción de enterotoxina cuando fueron tratados con varias concentraciones de sales biliares. Por otro lado, en la cepa NCTC 10240, a diferencia de la esporulación, si fué posible observar un notable efecto estimulador de la producción de enterotoxina.

El colato de sodio mostró el mejor efecto estimulador cuando se utilizó en la concentración de 2.0 mg/ml. Como en el caso de la formación de esporas, las otras sales biliares indujeron la producción de mayores cantidades de enterotoxina cuando se utilizaron las concentraciones más bajas.

TABLA 4. Producción de enterotoxina de C. perfringens en presencia de sales biliares.

CEPA	SAL BILIAR	CONTROL	CONCENTRACION DE LA SAL (mg/ml.)			
			0.125	0.5	2.0	5.0
NCTC 8239	Colato	<sup>2</sup> ND	8.0	18.5	78.7	3
	Taurocolato		20.2	11.3	18.4	--
	Glicoqueno-desoxicolato		23.8	--	17.4	4.6
	Quenodesoxicolato		38.3	10.0	--	--
NCTC 8679	Colato	ND	58.4	32.3	186.2	--
	Taurocolato		66.0	93.1	ND	--
	Glicoqueno-desoxicolato		43.5	--	5.1	ND
	Quenodesoxicolato		38.3	4.5	--	--
NCTC 10240	Colato	64.0	92.4	114.4	130.5	--
	Taurocolato		142.9	137.2	ND	--
	Glicoqueno-desoxicolato		146.6	--	45.3	21.5
	Quenodesoxicolato		329.4	21.5	--	--
ATCC 3624	Colato	ND	ND	ND	ND	--
	Taurocolato		ND	ND	ND	--
	Glicoqueno-desoxicolato		ND	--	ND	ND
	Quenodesoxicolato		ND	ND	ND	--

1: µg enterotoxina/mg proteína del extracto celular. 3: No determinado

<sup>2</sup>ND: No detectado

No se detectó enterotoxina cuando la cepa ATCC 3624 (ent<sup>-</sup>) fué cultivada en presencia de bilis ó de sales biliares.

La relación entre esporulación y producción de enterotoxina previamente reportada (34, 12) pudo ser observada en este trabajo (Tabla 5), ya que cuando se detectaron bajos niveles de enterotoxina, se obtuvieron bajos niveles de esporas, y viceversa.

En algunos casos pudimos detectar enterotoxina, sin embargo no se demostró la presencia de esporas termorresistentes. Cuando estos cultivos fueron observados con ayuda de un microscopio de contraste de fases pudimos observar esporas defectuosas, por lo que en estos casos se determinó el porcentaje de esporulación en los cultivos.

En el caso de la cepa NCTC 8239 (H-3) tratada con glicoquenosodexicolato de sodio a una concentración de 5.0 mg/ml, se detectaron bajos niveles de enterotoxina, sin embargo no se detectaron esporas termoresistentes, y el porcentaje de esporulación no pudo ser determinado debido a la presencia de inclusiones intracelulares en la bacteria que impedían determinar la formación de los estadios iniciales de la esporulación.

TABLA 5. Esporulación y producción de enterotoxina de *C. perfringens* en presencia de sales biliares.

CEPA	SAL BILIAR	CONTROL		CONCENTRACION DE LA SAL (mg/ml.)									
		ENT.	<sup>2</sup> ESPORA	0.125	0.5	2.0	5.0	ENT.	ESPORA	ENT.	ESPORA		
NCTC 8239		<sup>4</sup> ND	< 1										
	Colato			8.0	2.5	18.5	4.8	78.7	6.3				
	Taurocolato			20.2	5.3	11.3	2.7	18.4	(1%) <sup>5</sup>				
	Glicoqueno-desoxicolato			23.8	(47%)	--	--	17.4	(15%)			4.6	(<1°
	Quenodesoxicolato			38.3	2.5	10.0	6.5	--	< 1			--	--
NCTC 8679			< 1										
	Collato			58.4	5.8	32.3	5.7	186.2	6.3			--	--
	Taurocolato			66.0	5.8	93.1	6.9	ND	< 1			--	--
	Glicoqueno-desoxicolato			43.5	6.6	--	--	5.1	3.7			ND	< 1
	Quenodesoxicolato			38.3	6.9	4.5	5.6	--	< 1			--	--
NCTC 10240			64.0	6.2									
	Colato			92.4	6.0	114.4	6.0	130.5	5.0			--	--
	Taurocolato			142.9	6.0	137.2	6.3	ND	2.3			--	--
	Glicoqueno-desoxicolato			146.6	6.3	--	--	45.3	(63%)			21.5	(40°
	Quenodesoxicolato			329.4	6.6	21.5	5.3	--	< 1			--	--
ATCC 3624			ND	4.2									
	Colato			ND	5.0	ND	4.6	ND	5.7			--	--
	Taurocolato			ND	7.3	ND	7.3	ND	0.6			--	--
	Glicoqueno-desoxicolato			ND	6.7	--	--	ND	2.5			ND	< 1
	Quenodesoxicolato			ND	5.0	ND	2.5	ND	< 1			--	--

<sup>1</sup>ENT.: ug enterotoxina/mg proteína del extracto celular.

<sup>3</sup>: No determinado

<sup>2</sup>ESPORA: Log de esporas termo resistentes/ ml.

<sup>4</sup>ND: No detectado

<sup>5</sup>Todos los números en parentesis indican porcentaje de esporulación a las 7 horas. No se detectaron esporas termoresistentes.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el proceso de purificación de enterotoxina, se obtuvieron dos grupos de fracciones durante la cromatografía en columna, en donde solo el segundo mostró identidad inmunológica con la enterotoxina. Se ha descrito (27) que el primer grupo de fracciones, que mostró una absorbancia máxima a 260 nm, está compuesto principalmente por ácidos nucleicos.

Al realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida de la enterotoxina obtenida, sólo fue posible detectar una sola banda, lo que nos indicó que la enterotoxina se encontraba en un buen estado de pureza. Otros autores (50) han utilizado técnicas más sensibles para la detección de proteínas separadas por gel de poliacrilamida como el oro coloidal, en donde solo se ha mostrado la presencia de una banda de proteína que corresponde a la enterotoxina.

La técnica de contraelectroforesis presentó una sensibilidad satisfactoria para los propósitos de este trabajo. La observación de las bandas se hizo más clara al tener la placa con ácido tánico, tal como lo reportaron Naik y Duncan (47).

El análisis de esterilidad de la muestra biliar resultó muy importante, ya que de 29 muestras obtenidas, 10 de ellas se encontraban contaminadas. Cabe señalar que todas las muestras provinieron de personas que no fallecieron por problemas biliares ó hepáticos.

Duante la detección de las sales biliaras en la bilis, por cromatografía en capa fina, se utilizó una fase móvil diferente a la reportada por Flotch y colaboradores (20) . Sin embargo, fué posible obtener una buena separación de todas las sales, lo cual se mostró por sus Rf's. Al analizar el patrón de manchas mostrado por el taurocolato de sodio pudimos detectar la presencia de dos manchas, una de ellas, la menor, correspondía al Rf del colato de sodio. Esto puede explicarse ya que el taurocolato comercial contiene de un 2-5% de colato de sodio, el cual no se conjugó con taurina durante el proceso industrial.

Al analizar la bilis se obtuvieron manchas semejantes a nuestros estándares, lo que nos indicaba la presencia de dichas sales en la muestra del jugo biliar.

Es difícil saber la concentración real de las sales biliaras en el intestino delgado, ya que varía de acuerdo al contenido de grasa ingerido en el alimento, a la velocidad del paso del alimento por el duodeno y a factores dilucionales (29). En este trabajo se usaron tres concentraciones las cuales se pueden encontrar en un momento dado en el intestino delgado.

Los resultados demostraron un efecto inhibitorio general de las sales y la bilis sobre el crecimiento de este microorganismo.

Se pudieron detectar diversos grados de inhibición del

crecimiento debido a las diferentes sales biliares. Cuando la mezcla de las sales fué añadida al cultivo, solo la cepa ent<sup>-</sup> pudo crecer. Hasta el momento no existe información en la literatura sobre los factores que determinan la capacidad de crecimiento de este microorganismo en presencia de sales biliares, por lo que se requiere de un estudio a fondo sobre este aspecto, utilizando cepas productoras y no productoras de enterotoxina.

Cuando la bilis fué añadida a los cultivos se obtuvo una inhibición total del crecimiento tanto en las cepas ent<sup>+</sup> como en la ent<sup>-</sup>. Este efecto pudiera ser debido también a otros factores presentes en el jugo biliar además de las sales biliares. Flotch y colaboradores (20) encontraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento cuando bilis fué adicionada a los cultivos. Sin embargo, en aquel estudio, la mínima concentración que produjo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. perfringens* fué 1:20. En este trabajo no pudimos detectar crecimiento cuando fueron agregadas diluciones hasta 1:320. Estas discrepancias pudieron deberse al hecho que el grupo de Flotch obtuvo la bilis de pacientes con drenaje en T, que habían sufrido colecistotomía ó coledocolitotomía, ya que se ha reportado (18) que ciertas enfermedades biliares ó hepáticas pueden modificar la cantidad y proporción de sales biliares en el jugo biliar, mientras que la bilis utilizada en nuestro trabajo procedía de personas que fallecieron sin ninguna enfermedad biliar ó hepática reportada.

El análisis estadístico que se realizó de las cuentas de esporas termorresistentes obtenidas al tratar los cultivos con diferentes concentraciones de sales biliares, demostró, con un 99% de confiabilidad, una diferencia significativa entre los controles y los tratamientos con productos biliares, por lo que podemos decir que hubo un efecto estimulador real sobre la esporulación de la bacteria cuando se adicionaron a los cultivos ciertas sales biliares. De la misma manera se demostró una diferencia significativa en cuanto a la producción de enterotoxina de los controles y los tratamientos con sales biliares.

En este trabajo el colato de sodio mostro un efecto estimulador de la esporulación en todas las cepas analizadas. Anteriormente, Ushijima (69) reportó que esta sal era capaz de producir un efecto estimulador de la esporulación, el cual fué cepa dependiente. Hickey y Johnson (32) no pudieron detectar ningún efecto de esta sal sobre la esporulación de la única cepa que ellos utilizaron. Ushijima también reportó que el taurocolato de sodio generalmente estimulaba la esporulación cuando era adicionado a los cultivos a altas concentraciones (4 mg/ml, 67). En nuestro trabajo, pudimos detectar poco o ningún efecto estimulador de la esporulación a concentraciones similares a las reportadas. Sin embargo, a bajas concentraciones se obtuvo un efecto estimulador muy claro. Estas discrepancias pudieron deberse a diferencias en cepas y medios de cultivo utilizados.

Cuando las sales biliares provocaron un estímulo en la esporulación, también se observó un aumento en la producción de enterotoxina y viceversa. Esto apoya la sugerencia de que la enterotoxina es codificada por uno de los genes de la esporulación (12, 18, 34).

Se ha demostrado que ciertos compuestos como cafeína, teobromina, papaverina y metilxantinas (40, 55, 57) pueden inducir el proceso de esporulación. Se ha visto que estos compuestos tienen la capacidad de reemplazar o reducir los requerimientos de hierro durante el proceso de esporulación o de inhibir la síntesis macromolecular (principalmente nucleótidos). En este trabajo se encontró que las sales biliares son inductores efectivos del proceso de esporulación y producción de enterotoxina, sin embargo el proceso por el que se lleva a cabo la inducción no se conoce. Para esclarecer el mecanismo bioquímico de inducción, se requiere realizar estudios apropiados sobre el tema.

En algunos cultivos se pudo detectar enterotoxina, pero no se produjeron esporas termorresistentes, sin embargo, cuando estos fueron observados con un microscopio de contraste de fases, se demostró la presencia de esporas defectuosas. La presencia de enterotoxina en tales células no sorprende, ya que se ha reportado que la producción de enterotoxina se inicia en los primeros estadios del proceso de esporulación, estadio III (38). Esto indica, que algunas sales biliares son capaces de inducir el

proceso de esporulación, pero impiden el desarrollo de esporas maduras en ciertas cepas.

En el caso de la cepa NCTC 8239 , cuando se trató con 5 mg/ml de glicocuenodesoxicolato de sodio, no se demostró la formación de esporas, aunque si bajas cantidades de enterotoxina en los extractos celulares. Esto probablemente pudo deberse a un muy bajo porcentaje (< 1%) de células con esporas refráctiles o a la presencia de células que hubieran iniciado los primeros estadios de la esporulación, pero que no pudieron ser detectados mediante la observación al microscopio de contraste de fases debido a que estas células presentaron la formación de inclusiones intracelulares, que pudieron haber enmascarado los estadios tempranos del proceso de esporulación.

Las sales biliares fueron estimuladores efectivos de la producción de enterotoxina cuando fueron agregadas a ciertas concentraciones. Esto pudiera ser útil para los procesos de producción y purificación de enterotoxina en el laboratorio.

Para determinar si una cepa aislada de un proceso diarreico es o no productora de enterotoxina, generalmente se crece en un medio de cultivo y posteriormente se determina la producción de enterotoxina. Sin embargo, se ha visto que algunas cepas producen cantidades muy bajas de enterotoxina cuando se cultivan en medios usuales, por lo que generalmente no se detecta enterotoxina en

tales cepas. En esos casos resultaría de gran utilidad la adición de sales biliares en los cultivos, a fin de inducir una estimulación de la producción de enterotoxina, que se pudiera detectar mediante las técnicas usuales.

Desde hace tiempo se ha utilizado como tratamiento de la colelitiasis (calculos biliares, generalmente compuestos por colesterol), la administración oral de altas cantidades de sales biliares, entre ellas el glicocuenodesoxicolato de sodio (14). En este trabajo, cuando se adicionaron altas concentraciones de esta sal a los cultivos, se obtuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de enterotoxina. Esto pudiera ser de importancia en la prevención de las intoxicaciones alimentarias producidas por *C. perfringens* en estos pacientes, sin embargo para poder llegar a afirmar lo anterior, se necesitarían estudios a fondo sobre este tema.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la hipótesis de este trabajo se aceptó parcialmente, es decir que las cuatro sales biliares humanas (colato, taurocolato, glicocuenodesoxicolato y quenodesoxicolato de sodio) son capaces de estimular la esporulación y la producción de enterotoxina, pero inhiben el crecimiento de *C. perfringens*.

Con todo lo anterior concluimos que:

a) Las cuatro principales sales biliares humanas son capaces

de producir inhibición del crecimiento de las cepas de *C. perfringens* estudiadas.

b) La mezcla de colato, taurocolato, quenodesoxicolato y glicokenodesoxicolato de sodio a concentraciones de 0.5:0.5:0.5:2.0 mg/ml respectivamente, tiene la habilidad de inhibir completamente el crecimiento de las cepas enterotoxigénicas estudiadas.

c) El jugo biliar humano en dilución 1:20 a 1:320 inhibe completamente el crecimiento de las cepas analizadas.

d) Las sales biliares humanas a determinadas concentraciones, son capaces de producir una estimulación del proceso de esporulación.

e) La producción de enterotoxina puede ser estimulada por ciertas concentraciones de sales biliares.

f) El colato de sodio presentó un efecto inductor de la esporulación y la producción de enterotoxina, directamente proporcional a su concentración, en tanto que las otras sales mostraron un efecto inverso.

## RESUMEN.

Las sales biliares son sustancias que continuamente se están secretando en el intestino delgado, lugar donde *Clostridium perfringens* llega junto con el alimento contaminado e inicia el proceso de esporulación y producción de enterotoxina, pudiendo originar una toxi-infección alimentaria.

En este trabajo fue estudiado el efecto del jugo y las principales sales biliares descaragadas en el duodeno humano (colato, taurocolato, quenodesoxicolato y glicoquenodesoxicolato de sodio), sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens*.

Cada sal biliar fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano a diferente grado. Una mezcla de sales biliares tuvo la capacidad de inhibir completamente el crecimiento de las cepas enterotoxigénicas, pero no de la cepa no enterotoxigénica usada. El jugo biliar humano diluido hasta 1:320 inhibió completamente el crecimiento de todas las cepas.

Se observó un efecto estimulador de las sales biliares sobre la esporulación de todas las cepas. Las sales también fueron capaces de incrementar la producción de enterotoxina en las cepas enterotoxigénicas estudiadas. No se observó ningún efecto estimulador de la producción de enterotoxina cuando se examinó la cepa no enterotoxigénica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andrews, A. T. Electrophoresis. theory, techniques in biochemical and clinical applications. 2nd. Edition Oxford. Univ. Press. (1986).
- 2.- Banwell, J.G. Pathophysiology of diarrheal disorders. Rev. Infect. Dis, 12(1): S30 (1990).
- 3.- Bartholomew, B.A. and Stringer, M.F. Observations on the purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin and the production of a specific antiserum. FEMS Microbiol. Lett. 18:43 (1983)
- 4.- Batta, A.K., Salen, G. and Shefer, S. Transformation of bile acids into iso-bile acids by *Clostridium perfringens*: possible transport of  $\beta$  beta-hydrogen via the coenzyme. Hepatology 5(6): 1126 (1985).
- 5.- Berman, M.D., Angelico, M. and Carey, M.C. Biliary tract stones and associated diseases. In Stein, C.F. (ed.) Internal Medicine. Little Brown and Co. Boston/Toronto. pp.245 (1987).
- 6.- Borriello, S.P. Bacteria and gastrointestinal secretion and motility. J. Med. Microbiol. 25: 115 (1988).

- 7.- Borriello, S.P., Barclay, F.E., Welch, A.R., Stringer, M.F., Watson, G.N., Williams, R.N. Seal, D.V. and Sullens, K. Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. J. Med. Microbiol. 20:363 (1985)
- 8.- Borriello, S.P., Welch, A.R., Larson, H.E., Barclay, F., Stringer, M.F. and Bartholomew, B. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. Lancet 1:305 (1984).
- 9.- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248 (1976).
- 10.- Brook, I. Aerobic and anaerobic microbiology of biliary tract disease. J. Clin. Microbiol. 27(10): 2373 (1989).
- 11.- 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
- 12.- Craven, S.E., Blankenship, I. and Mc. Donel, J.L. Relationship of sporulation, enterotoxin formation and spoilage during growth of *Clostridium perfringens* type a in cooked chicken. Appl. Environ. Microbiol. 41(5): 1184 (1981).

- 13.- Cummins, J.H. and Macfarlane, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl. Bacteriol.* 70:443 (1961)
- 14.- Danzinger, R.G., Holmann, A.F., Schoentfeld, L.J. and Thistle, J.L. Dissolution of cholesterol gallstones by glycochenodeoxycholic acid. *N. Engl. J Med.* 286(1): 1 (1972).
- 15.- Dische, F.E. and Elek, S.D. Experimental food-poisoning by *Clostridium welchii*. *Lancet* 11:71 (1957).
- 16.- Duncan, C.L. and Strong, D.H. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 16:82 (1968).
- 17.- Duncan, C.L. and Strong, D.H. Experimental production of diarrhea in rabbits with *Clostridium perfringens*. *Can. J. Microbiol.* 15:765 (1969).
- 18.- Duncan, C.L., Strong, D.H. and Sebald, M. Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 110(1): 378 (1972).
- 19.- Fisher, M.M. and Yousef, I.M. Sex differences in the bile acid composition of human bile: studies in patients with and without gallstones. *C.M.A Journal* 109:190 (1973).

- 20.- Flotch, M.H., Binder, H. J., Filburn, B. and Gershengoren, .W  
The effect of bile acids on intestinal microflora. Am. J.  
Clin. Nutr. 25: 1418 (1972).
- 21.- Friebe, W. and Duncan, C.L. Homology between enterotoxin  
protein and spore structural protein in *Clostridium*  
*perfringens* type A. Eur. J. Biochem. 55:821 (1975).
- 22.- Goldner, S.B., Solberg, M., Jones, S. and Post, L.S.  
Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of  
*Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 52(3):407  
(1986).
- 23.- Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. The intestinal microflora and  
the colon cancer connection. Rev. Infect. Dis. 12(2): 8252  
(1990).
- 24.- Gopal-Srivastava, R. and Hylemon, P.B. Purification and  
characterization of bile salt hydrolase from *Clostridium*  
*perfringens*. J. Lip. Res. 29: 1079 (1988).
- 25.- Granum, P.E. and Harbitz, O. A circular-dichroism study of  
the enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. J. Food  
Biochem. 9:137 (1984).
- 26.- Granum, P.E., Telle, W, Olsvik, O. and Stavn, A. Enterotoxin

formation by *Clostridium perfringens* during sporulation and vegetative growth. *Int. J. Food. Microbiol.* 1:43 (1984).

- 27.- Granum, P.E. and Whitaker, J.R. Improved method for purification of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(6):1120 (1980).
- 28.- Guerrant, R.L., Hughes, J. M., Lima, N.L. and Crane, J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev. Infect. Dis.* 12(1): 541 (1990).
- 29.- Guyton, A.C. Human physiology and mechanisms of disease. 4th ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia PA. pp 497 (1987).
- 30.- Hatheway, C.L., Whaley, D.N. and Dowell, V.R. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* foodborne illness. *Food Technol.* 34(4):77 (1980).
- 31.- Heaton, K.W. Bile salts. in Wright, R., Millward-Saaler, G.M., Alberti, K.G. and Karran, S. Liver and biliary disease. 2nd. ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia PA. pp 277 (1985).
- 32.- Hickey, C.S. and Johnson, M.G. Effects of pH, bile salts and glucose on sporulation of *Clostridium perfringens* NCIC 8196.

Appl. Environ Microbiol. 41(1): 124 (1981).

- 33.- Kumate, J. and Isibasi, A. Pediatric diarrheal diseases: a global perspective. Pediatric Infect. Dis. 5(1): S 21 (1986).
- 34.- Labbe R.G. Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* type A. Food Technol. 34(4): 88 (1980).
- 35.- Labbe, R.G. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A in a defined medium. Appl. Environ. Microbiol 41: 315 (1981).
- 36.- Labbe, R.G. *Clostridium perfringens*. In Doyle, M.P. (ed). Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc. New York-Basel (1989).
- 37.- Labbe, R.G. *Clostridium perfringens*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74(4): 711 (1991).
- 38.- Labbe, R.G. and Duncan. Evidence for stable messenger ribonucleic acid during sporulation and enterotoxin synthesis by *Clostridium perfringens* type A. J. Bacteriol. 129(2): 843 (1977).
- 39.- Labbe, R.G. and Harmon, S.M. *Clostridium perfringens*. In

Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Third Edition. American Public Health Association, Washington DC. (1991).

- 40.- Labbé, R.G. and Nolan, L.L. Stimulation of *Clostridium perfringens* formation by caffeine and theobromine. Infect. Immun. 34(1):50 (1981).
- 41.- Larson, H.E. and Borriello, S.P. Infectious diarrhea due to *Clostridium perfringens*. J. Infect. Dis. 157(2): 390 (1988).
- 42.- Lottler, A. and Labbé R.G. Isolation of an inclusion body from sporulating, enterotoxin-positive *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol. Lett. 27: 143 (1985)
- 43.- Lottler, A. and Labbe R.G. Characterization of a paraspore inclusion body from sporulating, enterotoxin-positive *Clostridium perfringens* type A. J. Bacteriol. 165(2): 542 (1986).
- 44.- Masclee, A., Tanderman, A., Schaik, A.V., Van Der Hoek, E.W. and Van Tonderen, J.H. Unconjugated serum bile acids as a marker of small intestinal bacteria overgrowth. E. J. Clin. Invest. 19: 584 (1989).
- 45.- Mc. Donei, J.L., Chang, L., Pounds, J. and Duncan C.L. The

effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on rat and rabbit ileum. Lab. Invest. 39: 210 (1978).

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

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

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

49.- Owen, R.W. Biotransformation of bile acids by Clostridia. J. Med Microbiol. 30: 233.

50.- Park, K.B. and Labbe, R.G. Proteolysis of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin during purification. Infect. Immun. 58(6): 1999 (1990).

51.- Phillips, K.D. A sporulation medium for *Clostridium perfringens*. Lett. Appl. Microbiol. 3: 77 (1986).

- 52.- Redinger, R.N. and Small, D.M. Bile composition, bile salt metabolism and gallstones. Arch. Intern. Med. 130: 618 (1972).
- 53.- Robinson, J. and Messer, M. *Clostridium perfringens* food poisoning-Texas. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 18: 20 (1969).
- 54.- Ryu, S. and Labbé R.G. Coat and enterotoxin-related proteins in *Clostridium perfringens* spores. J. Gen. Microbiol. 135: 3109 (1989).
- 55.- Sacks, L.E. Stimulation of sporulation of *Clostridium perfringens* by papaverine. Experientia 38:246 (1982).
- 56.- Sacks, L.E. Influence of carbohydrates on growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in a defined medium with and without guanosine. Appl. Environ. Microbiol. 46(5): 1169 (1983).
- 57.- Sacks, L.E. and P. Thompson. Increased spore yields of *Clostridium perfringens* in the presence of methylxanthines. Appl. Environ. Microbiol. 34(2): 189 (1977).
- 58.- Sacks, S. and Thompson, P.A. Clear, defined medium for the sporulation of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 35(2): 405 (1978).

- 59.- Sanders, S. and Hutcheson, R. Jr. *Clostridium perfringens* food poisoning-Tennessee. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 23: 19 (1974).
- 60.- Schmidt, E. Chemistry and metabolism of bile acids. In Proceedings from the second international symposium on bile acids in hepatobiliary and gastrointestinal disease. IRL Press. Oxford, England. pp 1 (1988).
- 61.- Simon, G.L. and Gorbach, S.L. The human intestinal microflora. Dig. Dis. Sci. 31(9): 1478 (1986).
- 62.- Shandera, W.X., Tacket, C.O. and Blake, P.A. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. J. Intec. Dis. 147(1): 167 (1983).
- 63.- Shimada, K., Urayama, K., Noro, T. and Inamatsu, T. Biliary tract infection with anaerobes and the presence of free bile acids in bile. Rev. Infect. Dis. 6(1): S147 (1984).
- 64.- Skjelkvale, R. and Uemura, T. Experimental diarrhoea in human volunteers following oral administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. J. Appl. Bacteriol. 43: 281 (1977).

- 65.- Strong, D.H., Duncan, C.L. and Perna, G. *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. Infect. Immun. 3(1): 1/1 (1971).
- 66.- Sutherland, J.D., Hutchison, D.M. and Williams, C.N. Lyophilized *Clostridium perfringens* 3 alpha v *Clostridium bifermentans* 1 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: two new stable enzyme preparations for routine bile acid analysis. Biochem. Biophys. Acta. 962: 116 (1988).
- 67.- Sutton, R.G.A and Hobbs, B.C. Food poisoning caused by heat-sensitive *Clostridium welchii*. A report of five recent outbreaks. J. Hyg. Camb. 66: 135 (1965).
- 68.- Todd, E.C.D. Foodborne disease in six countries- A comparison. J. Food Protect. 41(7): 559 (1978).
- 69.- Ushijima, T. Glycocholic and taurocholic acids as potent sporulation stimulating of *Clostridium perfringens*. Med. Biol. 113(3): 193 (1986).
- 70.- Whiting, M.J. and Watts, J. Mck. Cholesterol gallstone pathogenesis: a study of potential nucleating agents for cholesterol crystal formation in bile. J. Med. Sci.(1985).

- 71.- Williardsen, R.R., Busta, F.F., Allen, C.E. and Smith, L.B.  
Growth and survival of *Clostridium perfringens* during  
constantly rising temperatures. J. Food Sci. 43:470 (1978).
- 72.- Willis, A.T. Anaerobic bacteriology in clinical medicine.  
Butterworth and Co. (Publishers) Ltd. London (1960).
- 73.- Wnek, A. and Mc. Clane. Preliminary evidence that  
*Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a  
160,000-Mr complex in mammalian membranes. Infect. Immun.  
57(2): 574 (1989).
- 74.- Yotlis, W.W. and Castimopoulos. Scanning isoelectric focusing  
and isotachopheresis of *Clostridium perfringens* type A  
enterotoxin. J. Appl. Bacteriol 39: 147 (1975).

