



*Universidad Nacional  
Autónoma de México*

*Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán*

*Desarrollo de conjugados de clostridium para el  
diagnóstico diferencial de especie por medio de  
microscopia de inmunofluorescencia.*

**T E S I S**

*Que para obtener el Título de  
Químico Farmacéutico Biólogo  
p r e s e n t a*

*Guillermo Priego Hernández*



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION. - - - - -	1
Morfología. - - - - -	1
Consideraciones Generales. - - - - -	2
CLASIFICACION DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR CLOSTRIDIUM	4
CLASIFICACION DE LOS CLOSTRIDIUM. - - - - -	5
HISTORIA. - - - - -	6
<u>Clostridium chauvoei.</u> - - - - -	7
<u>Clostridium septicum.</u> - - - - -	7
<u>Clostridium novyi.</u> - - - - -	8
<u>Clostridium sordellii.</u> - - - - -	8
<u>Clostridium perfringens.</u> - - - - -	9
DIAGNOSTICO. - - - - -	10
AISLAMIENTO E IDENTIFICACION. - - - - -	10
GENERALIDADES SOBRE LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES	12
JUSTIFICACION DEL TRABAJO. - - - - -	17
OBJETIVOS. - - - - -	18
MATERIAL Y METODOS. - - - - -	18
Material Biológico. - - - - -	18
Reconstitución de ampulas liofilizadas. - - - - -	19
Producción de antígenos. - - - - -	20
Obtención de los sueros hiperinmunes. - - - - -	21
DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS. - - - - -	22
CONJUGACION DE ANTICUERPOS CON ISOTIACIANATO DE FLUORESCINA	23
RESULTADOS. - - - - -	27
DISCUSION. - - - - -	33
CONCLUSIONES. - - - - -	36
BIBLIOGRAFIA. - - - - -	37

## INTRODUCCION.

Los Clostridium son bacilos anaerobicos o microaerofílicos gram positivos, formadores de esporas, que en su mayor parte llevan en la naturaleza una existencia saprófita. Su habitat natural es el suelo y aparato gastrointestinal del hombre y de los animales. Estas bacterias existen en una relación simbiótica mal comprendida, en la cual protegen contra la colonización e invasión por bacterias patógenas y contribuyen a la función digestiva normal; sin embargo, los microorganismos anaerobios endógenos o adquiridos exógenamente pueden invadir y destruir tejidos cuando la piel y las barreras mucosas resultan comprometidas por la cirugía, traumatismo o tumor y cuando los potenciales redox de los tejidos se alteran por isquemia, necrosis o infección, ocasionando así diversos procesos patológicos. (21).

No todos los Clostridium son patógenos. En realidad solo una pequeña minoría son capaces de producir enfermedad.

Esta minoría de Clostridium patógenos tienen una característica común; todos producen potentes exotoxinas con actividad enzimática. Existen especies que descomponen proteínas, otras fermentan carbohidratos y algunas tienen ambas actividades.

## Morfología.

Estos bacilos son de tamaño variable, generalmente son largos, estrechos y con extremos redondeados. Todas las especies esporulan, pero la situación de la spora es variable (central,

subterminal y terminal). La mayoría de las especies son móviles gracias a flagelos peritricos (flagelos diseminados en toda la superficie celular). En algunas se observa una capsula (C. perfringens). Son gram-positivos en los cultivos jóvenes, pero se decoloran fácilmente en cultivos viejos. Cabe señalar, sin embargo, que no todos los Clostridium son gram positivos (los Clostridium que fermentan la celulosa por ejemplo, son gram-negativos) no todos son anaerobios estrictos (C. histolyticum y C. tertium por ejemplo crecen en aerobiosis) y algunos como C. welchii (C. perfringens) esporulan raramente y solo en medios especiales (15). El tamaño y forma de las colonias es muy variable según distintas condiciones. En agar sangre la hemólisis al principio es del tipo alfa, pero más tarde se transforma en tipo beta (12).

#### Consideraciones Generales.

La especificidad de tipo entre los Clostridium depende aparentemente de los antígenos O y H. Los antígenos solubles y las globulinas específicas han sido eficaces en la diferenciación de especie (12). Sin embargo, otros autores (2) mencionan que muchas especies de Clostridium se han separado en tipos según su capacidad de elaborar exotoxinas específicas. La naturaleza y cantidad de toxinas varia considerablemente para las diferentes especies y cepas. Hay cuatro toxinas mayores y ocho menores - descritas y clasificadas según letras griegas (2). Entre las más importantes estan la lecitinasa, colagenasa, hialorunidasa, la toxina hemolítica teta, leucosidina, desoxirribonucleasa y una fibrinolisisina (21). Todas ellas se producen en el interior

de las células, algunas fácilmente difunden a través de la pared celular y salen al fluido de cultivo, estas son las toxinas extracelulares (exotoxinas). Otras no se difunden a través de la pared celular fácilmente y sólo se encuentran en el fluido de cultivo después de la lisis de la célula, estas son las toxinas protoplásmicas (endotoxinas) (17). Estas potentes toxinas son excretadas en la lesión local y pueden causar la muerte cuando son vertidas a la sangre circulante del individuo. Característicamente las enfermedades se manifiestan primero por una toxemia aguda (botulismo y tétanos) y secundariamente como un edema gaseoso, el edema es la regla general y la producción de gas es inconstante. Los miembros de el género que son de significancia en enfermedades animales y humanas incluyen al C. chauvoei, C. septicum, C. novyi, C. perfringens, C. sordellii, C. botulinum, C. tetani, C. haemolyticum, C. bifermentans, C. histolyticum y C. fallax (2,4,6,12,19,21).

Los tipos de enfermedades determinadas por los Clostridium pueden clasificarse en toxigénicas e histotóxicas (12). Clostridium tetani y Clostridium botulinum provocan enfermedades toxigénicas mediante las toxinas que producen. En tétanos la toxina se libera por el germen en la zona de la herida, se difunde a torrente sanguíneo y luego a todo el organismo. En el botulismo, la toxina se forma en carne insuficientemente esterilizada y la enfermedad se produce por la ingestión de alimentos que la contienen. Las especies que causan el tipo histotóxico de enfermedad (lesión grave del músculo) se llaman frecuentemente grupo de "edema gaseoso" o de la "gangrena gaseosa".

Este grupo da lugar a una toxina que lesiona las células musculares. Fermentan la glucosa muscular, originando gas. Se produce edema por la alteración de los capilares de los músculos, lo cual provoca que la linfa se acumule en la zona afectada. Clostridium chauvoei, que produce el carbunco sintomático y Clostridium septicum que determina el edema maligno, son excelentes ejemplos de las especies que originan el tipo histotóxico de enfermedad.

En la inmunización contra los anaerobios toxigénicos se emplean antitoxinas. Para los tipos menos toxigénicos se dispone de filtrados bacterianos y suero antitoxinas. La inmunización contra el tétanos, botulismo y carbunco sintomático se practica universalmente con éxito.

Las Clostridiasis, debido a la ubicuidad de sus agentes etiológicos, a las peculiaridades de esa ubicuidad y a la necesidad de la intervención, para su aparición, de algunos factores determinantes, tienen tres caracteres epizootiológicos comunes:

- a) Diseminación universal.
- b) No transmisibilidad por contacto directo.
- c) Incidencia esporádica con grandes variaciones de un clima a otro y, en el mismo país, de una región a otra.

#### CLASIFICACION DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR CLOSTRIDIUM.

Max Sterne e Irene Batty (19) clasifican a los Clostridium de acuerdo a las enfermedades que causan, de la siguiente mane

ra:

ENFERMEDAD	AGENTE
A) Gangrenas gaseosas e infecciones de heridas.	<u>C. chauvoei</u> <u>C. histolyticum</u> <u>C. novyi</u> tipo A y B <u>C. perfringens</u> tipo A <u>C. septicum</u> <u>C. sordellii</u>
B) Enterotoxemias e infecciones.	<u>C. novyi</u> tipo B y D (haemoliticum) <u>C. sordellii</u> <u>C. perfringens</u> tipo A, B, C y D <u>C. septicum</u>
C) infecciones neurotrópicas	<u>C. botulinum</u> , tipo A, B, C, D, E, F y G <u>C. tetani</u>

#### CLASIFICACION DE LOS CLOSTRIDIUM.

Pijoan (15) clasifica a los Clostridium de acuerdo a la forma en que estos producen sus exotoxinas. Así los Clostridium patógenos pueden ser subdivididos en 3 grupos más o menos bien definidos:

#### A) Clostridium exotóxicos:

Estos clostridium se caracterizan por producir toxinas de



gran potencia (de hecho los venenos más poderosos que se conocen). Estas toxinas son las responsables de producir la enfermedad y eventualmente la muerte del animal; sin embargo la bacteria en sí no es invasiva. Dos especies caen naturalmente dentro de este grupo: C. tetani y C. botulinum.

B) Clostridium invasivos de origen traumático:

Este grupo incluye todos los agentes de la gangrena gaseosa del hombre y la mayoría de dichos agentes en los animales. Sus dos especies más representativas son: C. perfringens en el humano y C. septicum en los animales (Wilson y Miles, 1975), aunque una gran variedad de especies, tales como C. novyi (C. oedematiens), C. bifermentans, C. sordellii y C. histolyticum, ocasionalmente se asocian en este síndrome.

C) Clostridium invasivos de origen digestivo.

Estos Clostridium, que solo se han demostrado de manera concluyente en animales, presentan la patogenia menos comprendida. El grupo está representado fundamentalmente por C. chauvoei (que produce el Carbón Sintomático también llamado carbunco sintomático o pierna negra) C. haemolyticum (Hemoglobinuria bacilar) y algunos serotipos de C. perfringens.

HISTORIA:

Debido a que el genero Clostridium es muy amplio, me restringiré a estudiar a las especies que estan intimamente asociadas a la "gangrena gaseosa", también conocida como "edema gaseoso" o "edema maligno", las cuales son enfermedades que afectan

frecuentemente al ganado bovino, caprino y ovino.

Clostridium chauvoei.

La pierna negra (Carbunco sintomático), es una infección del grupo de la gangrena gaseosa que afecta al ganado bovino, caprino y ovino, es causada por la propagación de C. chauvoei\* en los músculos y asociado a tejido conectivo. Otras de las sinonimias de este agente son: Bacillus chauvoei, Bacillus gangraenae emphysematosae, Clostridium feseri, bacilo del carbunco sintomático.

Las primeras referencias sobre el descubrimiento de este agente se refieren a Chabert, en los años 1780s, quien enuncia doctrinas de diagnóstico, diferencia el carbunco sintomático - del carbunco bacteriano a base de los síntomas y lesiones. Bollinger y Feser (1875-1876 respectivamente) son los primeros en demostrar que el carbunco bacteriano y el sintomático tenían - agentes etiológicos distintos. Arloing, Cornevin y Thomas (1877) realizaron importantes aportaciones sobre el carbunco sintomático, idearon y atenuaron una bacterina la cual ahora se encuentra desacreditada pero que sin embargo fue usada durante 60 años o más; esto explica porque con frecuencia se les considera como los descubridores del germen (4,6,12,16,17).

Clostridium septicum.

Este microorganismo fue probablemente el primero de los -

---

\*El nombre de este germen se debe a J.B.A. Chaurean, científico francés del siglo XIX.

Clostridium histotóxicos descrito por su apariencia e indentificado por Pasteur y Joubert como Vibrion septique (17,18). Koch y Gaffky (1881) lo describieron y le dieron el nombre de Oedembacillus, Liborius lo nombra como Bacillus oedematis maligni, Mace lo llama Bacillus septicus, y Schroeter como Bacillus oedematis. En la actualidad se tiende a darle el nombre específico septique de Pasteur, que tiene prioridad, latinizándolo y convirtiéndolo en septicum. Clostridium septicum es uno de los gérmenes del grupo del edema gaseoso que se ha asignado frecuentemente en los períodos bélicos (4,6,12,16,17).

#### Clostridium novyi.

Fue descrito por primera vez bajo el nombre de Bacillus oedematis maligni II por Novyi en 1894. El nombre fue cambiado a Bacillus novyi por Migula en 1900. En 1915 fue aislado y descrito por Weinberg y Seguin bajo el nombre de Bacillus oedematiens. El Manual de Bergey 8° Edición reconoce como válida la designación de Clostridium novyi. Un organismo similar fue aislado de casos de hepatitis necrótica en cabras por Zeissler y Rassfeld (1929), quienes lo nombran Bacillus gigas. Cultivos no patógenos fueron aislados de animales de laboratorio por Kraneveid (1934). En la clasificación de Prévot (1938) se le encuentra como Clostridium bubalorum. Aunque los autores Británicos y Europeos lo nombran Clostridium oedematiens, parece tener prioridad el nombre de Clostridium novyi (4,6,12,16,17).

#### Clostridium sordellii.

En 1922, Sordelli aisló en Argentina un germen al que de-

nomino Bacillus oedematiens sporogenes, de dos casos mortales de gangrena gaseosa humana. Meloney, Humphreys y Carp (1927), sin conocer el trabajo de Sordelli describieron y denominaron un germen similar, el Clostridium oedematoides. En 1927 Hall y Scott propusieron el nombre de Bacillus sordellii después de haber estudiado cultivos aislados de casos humanos de gangrena gaseosa. Algunos microbiólogos encontraron similitud entre el Clostridium sordellii y el Clostridium bifermentans; por lo cual, consideraron al Clostridium bifermentans una variante no patógena del Clostridium sordellii. Actualmente se sabe que existen diferencia serológica y bioquímica entre estas dos especies (4,6,12,16,17).

#### Clostridium perfringens.

Este germen fue aislado por primera vez y descrito correctamente, en 1892, por Welch y Nutal, quienes lo aislaron de un cadáver. En 1893 E. Fraenkel aisló un germen al que llamó B. phlegmonis emphysematosae de cuatro casos de gangrena gaseosa. En 1898, Veillon y Zuber le dieron el nombre de Bacillus perfringens empleado en la edición de 1948 del Manual de Bergey. En su clasificación de 1900 Migula designó el germen con el nombre de Bacillus welchii. Desde la descripción realizada por Welch en 1900 a la fecha se han aislado de multitud de procesos que afectan tanto al hombre como a los animales, por lo cual se ha dado las siguientes sinonimias: Bacillus aerogenes capsulatus, Bacillus welchii, Bacillus phlegmonis emphysematosae, B. enteritidis sporogenes, Bacillus perfringens, Granulo bacillus saccharo butyricus immobilis, Bacillus anaerobicus crytobutyricus, -

Bacillus cadaveris butyricus, Bacillus emphysematis vaginae, -  
Clostridium welchii (12,16).

#### DIAGNOSTICO.

La bacteriología de anaerobios en el área de procedimientos de diagnóstico de rutina ha sido muy descuidada. Esto se debe a que los procedimientos para la identificación de las bacterias anaerobias son difíciles y poco conocidos, especialmente para los laboratorios de diagnósticos de rutina (3,8,14). Sin embargo, se ha visto que muchas clínicas que se han enterado de procedimientos disponibles para el cultivo e identificación de bacterias anaerobias, han incrementado el número de cultivos de anaerobios positivos en sus aislamientos (9,14,23).

#### AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.

Los primeros frotis con tinción de Gram, tomados de exudados de las heridas que muestren bacilos Gram-positivos esporulados siempre deben ser sospechosos.

#### Rutinas a seguir para estas muestras:

Las muestras sospechosas son sembradas en los siguientes medios:

- Agar sangre, incubado en forma aerobia.
- Agar sangre y agar yema de huevo incubados en forma anaerobia.

NOTA: Para muestras que son transportadas se recomienda sembrar en 2 frascos de medio de Robertson con carne o medio reforzado para Clostridium, uno de los cuales es calentado a 65°C durante 30 minutos para aniquilar los organismos no esporulados después

de la inoculación (como C. perfringens no forma esporas en los tejidos, el frasco calentado quizá no muestre este microorganismo en los cultivos secundarios).

- Medio Smith y Holdeman el cual es un excelente medio para anaerobios y para pruebas de utilización de carbohidratos. Los carbohidratos más usados en la diferenciación de especie son: Glucosa, lactosa, sucrosa, maitosa, salicin y manitol (ver tabla I).

- Las pruebas bioquímicas son variadas y para diferenciar entre tipos, se requiere generalmente de pruebas con antitoxinas.

La serología de los anaerobios patógenos fue revisada por Smith (1955). Con excepción de la prueba de inmunofluorescencia las reacciones serológicas, tales como aglutinación somática y flagelar, pruebas de precipitación y fijación de complemento, no juegan un papel importante en el reconocimiento o subdivisión de estos microorganismos debido a que presentan muchas reacciones cruzadas.

La aplicación de las técnicas de tinción inmunofluorescentes de algunas especies de Clostridium por Batty y Walker (1963 a,b; 1965; 1966) proporcionan un sistema adecuado para la identificación de estos organismos (Walker, Batty y Thomson, Métodos de Microbiología, vol.5). El trabajo de Batty y Walker (1963 a,b; 1965), mostró que Clostridium septicum y Clostridium chauvoei pueden identificarse y diferenciarse uno de otro con certera especificidad usando antisueros "O" vegetativos marcados con fluorescencia. Por estos métodos los organismos pueden identificar

se, no solamente en frotis de cultivo puros y mixtos, sino también en frotis de material patológico y en secciones de tejidos. Esta técnica puede proveer igual valor en diferenciación de miembros proteolíticos como en Clostridium botulinum de Clostridium sporogenes (Batty y Walker, 1964, 1965; Boothroyd y Georgala 1964). La fluorescencia de anticuerpos marcados también actúa específicamente para Clostridium oedematiens y Clostridium tetani (Batty y Walker, 1963b, 1965). La aplicación con éxito de las técnicas de inmunofluorescencia depende del fraccionamiento de las porciones antigénicas de varias capas de las especies particulares para obtener al menos un antígeno en común que no pertenece a ninguna otra especie (13).

#### GENERALIDADES SOBRE LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

La técnica de marcar los anticuerpos o los antígenos con ciertos productos químicos que poseen la propiedad de ser fluorescentes, es de desarrollo creciente y ha sido la base de muchos métodos de diagnóstico e investigación (11). Entre los diferentes reactivos que introducen grupos fluorescentes en las proteínas, el más ampliamente usado es el isotiocianato de fluoresceína. Los anticuerpos marcados con fluoresceína son intensamente fluorescentes, retienen su reactividad específica y esta se puede percibir por medio de microscopios con iluminación ultravioleta.

El principio básico implicado en el procedimiento es que en el portaobjetos del microscopio se produce la microconjugación entre el anticuerpo marcado conocido y el patógeno específico.

TABLA I. REACCIONES BIOQUIMICAS CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES MAS IMPORTANTES DE CLOSTRIDIUM

Organismo	Moti- lidad	Glu- cosa	Mal- tosa	Lac- tosa	Sucro- sa*	Sali- cin	Mani- tol	Activi- dad ge- latina- sa	Indol	Diges- tión de le- che	Yema de huevo Opalescencia	Capa perlada	Patogenici- dad de aní- males de laboratorio
<i>Cl.perfringens</i>	-	+	+	+	+	V	-	+	-	-	+	-	V
<i>Cl.butyricum</i>	+	+	+	+	+	+	V	-	-	-	-	-	-
<i>Cl.fallax</i>	+	+	+	+	+	+	V	-	-	-	-	-	V
<i>Cl.chauvoei</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Cl.septicum</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Cl.botulinum (A,B y F)</i>	+	+	+	-	-	V	-	+	-	+	+	+	+
<i>Cl.botulinum (C-E)</i>	+	+	+	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cl.oedematiens (A) (novyi)</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Cl.oedematiens (B)</i>	+	+	V	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Cl.oedematiens (C)</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Cl.oedematiens (D)</i>	+	+	-	-	-	-	-	V	+	-	+	-	+
<i>Cl.bifermentans</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Cl.sordellii</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	V
<i>Cl.sporogenes</i>	+	+	+	-	-	V	-	+	-	+	+	+	V
<i>Cl.tetanomorphum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
<i>Cl.capitovale</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
<i>Cl.tetani</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	V
<i>Cl.histolyticum</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+

V = Variable

\* Sucrosa = Sacarosa.

Tomado de Willis, A.T. (1977) y comple-  
mentado de Smith, L.D. (1975).



TABLA II. ESQUEMA DE TRABAJO PARA AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CLOSTRIDIUM

NOTA: Se puede trabajar la muestra de las siguientes formas:

MUESTRA SOSPECHOSA (BASTONES ESPORULADOS)

SE SIEMBRA EN:

MEDIOS LIQUIDOS

MEDIOS SOLIDOS (no selectivos)

MEDIOS SOLIDOS (selectivos)

- Medio reforzado para Clostridium
  - Medio Smith y Hoideman
  - Medio Robertson con carne
  - Medio de Tioglicolato
  - Medio selectivo para Clostridium (Merck).
- Dos tubos conteniendo cualquiera de los medios antes mencionados son inocuados con la muestra. Un tubo se calienta a 65°C durante 30 min. y posteriormente se incubaba a 37°C durante 24 h y el otro tubo se incubaba directamente a 37°C durante 24 h.

El crecimiento obtenido se siembra en:

MEDIOS NO SELECTIVOS

- \*Agar sangre enriquecido con suero de caballo (8%)
- \*\*Agar yema de huevo enriquecido con suero estéril de caballo (8%)
- + Polimixin B
- + Polimixin B

Se inocula una placa de cada uno de los medios y se incuban en atmósfera anaerobia de 24 a 36 horas a 37°C.

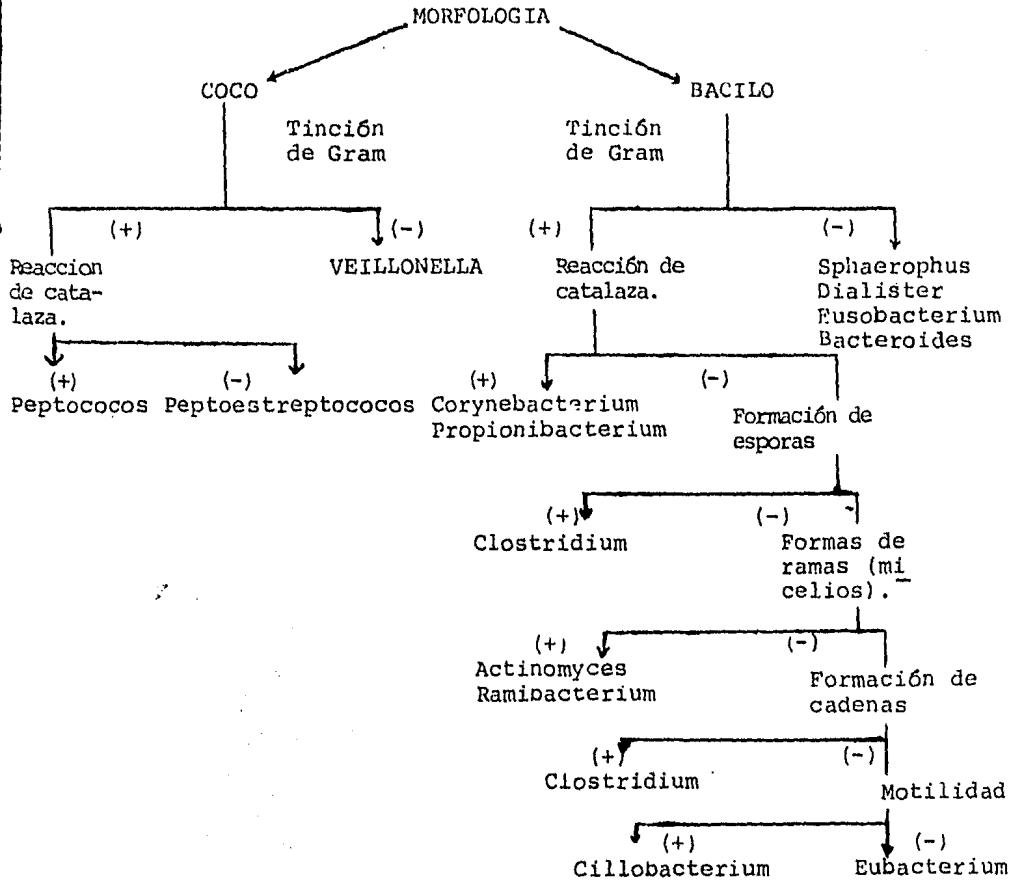
\* Sin polimixin      \*\* Sin polimixin

Se inocula una placa de cada uno de los medios y se incuban en atmósfera anaerobia de 24 a 36 horas a 37°C.

La identificación de las colonias aisladas se efectua de acuerdo a las siguientes pruebas y observaciones:

- Cambios de medio
- Características de las colonias.
- Reacción de Gram (morfología).
- Catalaza.
- Fermentación de carbohidratos o cromatografía de gases.
- Pruebas con antitoxinas.
- Pruebas de inmunofluorescencia.

TABLA III. GUIA PARA LA IDENTIFICACION DEL GENERO DE LAS BACTERIAS ANAEROBIAS MAS IMPORTANTES.



fico, aún cuando el último esté presente incluso en cantidades muy pequeñas ya sea vivo o muerto. Recíprocamente, empenado un antígeno conocido marcado es posible determinar si un suero conocido contiene algún anticuerpo específico (11). Como en todas las reacciones inmunológicas es necesario establecer la especificidad con controles adecuados. Los anticuerpos conjugados con fluoresceína pueden ser usados tanto en reacciones directas como en indirectas para la determinación y localización de una amplia variedad de antígenos. La prueba directa consiste en colocar sobre el antígeno el anticuerpo marcado. La prueba indirecta o de sandwich consiste en colocar sobre el antígeno los anticuerpos específicos sin marcar. Después de un período de incubación se lava el exceso y se agrega un segundo anticuerpo marcado específico contra el primer anticuerpo. La reacción indirecta amplifica la respuesta y permite que un conjugado sea utilizado en una amplia variedad de reacciones serológicamente específicas.

Mediante el uso de anticuerpos específicos marcados se pueden identificar varias especies de *Clostridium*, por lo que la enfermedad como enterotoxemia (*C. perfringens* tipo A,B,C y D) enfermedad del riñon pulposo (*C. novyi* tipo D también llamado *C. haemolyticum* o *C. perfringens* tipo D); hepatitis necrótica en bovinos (*C. novyi* tipo B); tetanos (*C. tetani*); carbunco sintomático (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* tipo B, *C. sordellii*), disentería ovina (*C. perfringens*), etc., se pueden diagnosticar rápidamente (19).

En este trabajo utilizamos el método directo ya que es sencillo, fácil de usar y permite identificar los gérmenes - patógenos involucrados. Es necesario mencionar que al usar bacterias completas como antígenos se crea una amplia respuesta de anticuerpos, por lo que puede bajar la especificidad de la prueba, sin embargo este método tiene la ventaja de ser rápido, reproducible y nos permite abrir la puerta para un campo de investigación más amplio hasta la obtención de antisueños monoespecíficos que mejoren la especificidad y aplicación del método.

#### JUSTIFICACION DEL TRABAJO.

En algunos países existen pruebas como la neutralización de toxinas, cromatografía de gases, y algunas otras que son de gran utilidad para confirmar diagnóstico bacteriológicos, sin embargo, es necesario emplear métodos que proporcionen la rápida identificación de los gérmenes patógenos específicos, mientras se esperan los resultados de las técnicas bacteriológicas tradicionales.

La caracterización de las distintas especies de Clostridium involucradas en los procesos patológicos de los animales (pierna negra, mal de paleta, edema maligno, etc.) no ha sido hasta la fecha un sistema de diagnóstico adecuado. De poder evitarse la contaminación de las muestras por la flora anaerobia normal, la actual tecnología permitiría aislar microorganismos anaerobios de importancia clínica hasta en el 10% de las

muestras enviadas a un laboratorio de Bacteriología (21).

Como es conocido en nuestro país, la toma de muestras es muy deficiente por lo tanto, aumenta la dificultad para diferenciar entre las especies causantes del proceso y aquellas producto de contaminación después de la muerte del animal, es por esta razón que buscando una solución adecuada para este problema, se investiga el sistema de pruebas de inmunofluorescencia, (anticuerpos fluorescentes).

En México se han realizado estudios de inmunofluorescencia para Clostridium perfringens solo en el laboratorio (22), sin embargo no se ha reportado la efectividad de esta prueba con muestras de campo.

#### OBJETIVOS.

- a) Obtención de conjugados a partir de cepas de C. septicum, C. chauvoei, C. sordellii y C. novyi tipo B
- b) A partir de estos conjugados realizar diagnóstico diferencial de especies, por medio de microscopía de inmunofluorescencia.

#### MATERIAL Y METODOS.

##### Material biológico.

Los conjugados de los Clostridium se hicieron a partir de las siguientes cepas:

- C. cnauvoei IRP 206                      Estas cepas fueron donadas por  
C. novyi tipo B IRP 190                el National Veterinary Services  
C. sordellii IRP 233                    Laboratories.  
Ames, Iowa.
- C. septicum                                Cepa donada por el Laboratorio  
de Bacteriología de la Escuela  
Veterinaria de la Universidad  
de Glasgow.

Las cepas donadas por estos laboratorios fueron remitidas a nuestro país en ampulas liofilizadas.

Reconstitución de las ampulas liofilizadas.

Las ampulas liofilizadas se reconstituyeron con solución amortiguadora de fósforo pH 7.0 y fueron inoculadas en el medio recomendado por Kolbe y col (10), para su desarrollo. Para mantener estos cultivos se obtuvieron esporas viables de las diferentes especies siguiendo la técnica descrita por Bagadi (1).

Se verificó el género y especie de estas cepas observando las características de crecimiento en medios de agar sangre y agar yema de huevo, patogenicidad en animales de laboratorio, tinción de gram, pruebas de motilidad, catalasa, indol y utilización de carbohidratos (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, salicin, manitol).

Producción de antígeno.

Se sembraron las cepas de C. septicum, C. chauvoei, C. sordellii y C. novyi tipo B, en tubos que contenían caldo tioglicolato y en medio reforzado para Clostridium; se incubaron estos tubos durante 24 hrs a 37°C y para el caso de C. novyi tipo B, durante 48 hrs a 37°C (ya que crece lentamente).

A partir del crecimiento de estas cuatro cepas tipo para desaffo, se produjeron los antígenos de acuerdo a la técnica - descrita por Claus y Macheak (5), estos antígenos se obtuvieron inoculando matraces de 500 ml que contenían 125 ml de medio de Smith y Holdeman (19) con crecimiento bacteriano de los tubos y se incubaron en jarras de anaerobiosis a 37°C durante 12 hrs, - después de este tiempo se adicionaron nuevamente 125 ml del mismo medio, se sometieron a incubación en anaerobiosis durante - otras 8 hrs a 37°C, posteriormente se efectuó una prueba de pureza (frotis) por medio de una observación microscópica; cuando las cepas estaban puras (y existía como mínimo un 80% de células vegetativas), se procedió a inactivarlas adicionando formalina con una concentración final equivalente al 1%, esta última se mezcló con la suspensión de bacterias por agitación lenta durante 18 hrs a 37°C, una vez terminado este paso, se procedió a lavar las células inactivadas; esto se hizo con solución amortiguadora de fosfatos salino (3 veces), y después se estandarizó el antígeno a una concentración de  $9 \times 10^8$  bacterias/ml (usando como referencia el tubo 3 del Nefelometro de Mac-Farland).

Posteriormente los antígenos estandarizados se sometieron

a prueba de esterilidad, sembrando estos en placas de agar sa<sub>h</sub>gre t agar yema de huevo e incubando aerobica y anaerobicamente por 36 hrs a 37°C; una vez aprobada la prueba se esterilidad se envasaron los antígenos en frascos de 100 ml y se conservaron a 4°C.

Obtención de los sueros hiperinmunes.

Los antígenos obtenidos según la técnica de Claus y Macheak (5), se inocularon en conejos, como lo recomienda Frerichs y Gray (7), ya que estos proporcionan buenos títulos de anticuerpos cuando son desafiados con bacterinas de Clostridium.

Se trabajaron 8 conejos con un peso promedio de 1.5 kg, estos conejos se sometieron a la misma alimentación 1 mes antes del experimento. Se inocularon 2 conejos por cada cepa bacteriana. La ruta de administración fue la intravenosa y no se utilizó adyuvante, esto es con el fin de obtener la respuesta más rápida (respuesta humoaral).

ESQUEMA DE INOCULACION

Conejos de 1.5 kgr. (aproximadamente)	0	2	8	12	DIAS
Volumen de antígeno administrado	0.2	0.8	1.5	2	ML
Número aproximado de bacterias administradas	$1.8 \times 10^8$	$7.2 \times 10^8$	$1.35 \times 10^9$	$1.8 \times 10^9$	BACT/ML
Vía de inoculación	I.V.	I.V.	I.V.	I.V.	

I.V. = INTRAVENOSA.



El volumen de inoculos se administró según lo reportado por Max Strene e Irene Batty (19). Antes de las dos últimas inoculaciones, se sangraron los conejos y se observaron los títulos obtenidos por la prueba de aglutinación en placa que se describe más adelante; así los títulos obtenidos el 12vo. día eran bajos; entonces se procedía a efectuar una inoculación el 15vo. día y la dosis a administrar era de 2.0 ml. Si al finalizar el período de inoculación, los títulos de anticuerpos eran adecuados (iguales o superiores a 1:400) entonces se procedía a efectuar el sangrado en blanco de estos animales para obtener el suero niperinmune, el cual fue utilizado para la elaboración del conjugado con isotiocianato de Fluoresceína.

#### DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS.

Los títulos de anticuerpos obtenidos en la inoculación de los antígenos de C. chauvoei, C. septicum, C. sordellii y C. novyi tipo B fueron determinadas por prueba de aglutinación en placa (Claus y Macheak, 1972).

#### Procedimientos:

Se depositaron en la placa por medio de una pipeta de Bang 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml de suero, después se colocó sobre cada una de las diferentes cantidades de suero, 0.03 ml de antígeno homólogo de Clostridium; de esta forma se obtuvieron las diluciones de 1:25 en 0.08 ml de suero, 1:50 en 0.04 ml de suero, 1:100 en 0.02 ml de suero, 1:200 en 0.01 ml de suero y 1:400 en 0.005 ml de suero. Posteriormente se homogenizó con

un palillo la mezcla suero-antígeno comenzando por la dilución más alta y terminando en la más baja; se dejó reposar la placa durante 8 minutos y después se efectuó la lectura.

Los resultados en la lectura fueron : Cuando los conglomerados de antígeno aglutinado estaban separados por líquido claro transparente e incoloro fue leído como positivo o aglutinación completa (+); cuando hubo una aglutinación manifiesta aunque en diferentes grados, sin clarificación completa del líquido esta se leyó como incompleta (+) y cuando no existió ningún signo de aglutinación la reacción se consideró negativa (-).

#### CONJUGACION DE ANTICUERPOS CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA.

##### Parte I: Fraccionamiento del suero.

###### Procedimiento:

Por cada 30 ml de suero hiperinmune, en un vaso de precipitados en baño de hielo y agitación constante, se le agregó 15 ml de una solución saturada de sulfato de amonio en el espacio de 15 minutos, se dejó en agitación constante a 4°C durante 24 horas y después se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, posteriormente se decantó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 15 ml de agua destilada, a esta última solución se le agregó 15 ml de una solución saturada de sulfato de amonio en el espacio de 15 min, y después se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante y se procedió a disolver el precipitado en 10 ml de agua destilada; este precipitado disuelto se transfirió a un tubo de dialisis.

Se dializó en una solución de NaCl al 0.85% (pH 8.0) en refrigeración (4°C), cambiando la solución salina frecuentemente (por lo menos se efectuaron 3 cambios, uno cada 12 horas). Se determinó si el dializado contenía residuos de sulfato de amonio cada 2 ó 3 horas después de un cambio de solución salina, esto se efectuó de la siguiente forma:

A una pequeña cantidad del dializado se le añadió un volumen igual de cloruro de bario saturado, cuando apareció un precipitado se continuó la diálisis y cuando no apareció precipitado, se consideró que la fracción era satisfactoria para la determinación de proteína y la conjugación.

Finalmente se retiró la globulina del tubo de diálisis y se centrifugó a 7,000 rpm durante 15 min a 4°C desechando el sedimento.

## Parte II: Determinación de proteína.

### Procedimiento:

Se hizo una dilución 1:50 de globulina en solución salina y se lee en el espectrofotómetro\* a 280 nm y utilizando como blanco solución salina. La determinación de la proteína se hizo de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\text{mg de proteína/ml} = \frac{\text{Densidad Óptica (D.O)} \times \text{Dilución}}{1.5} \quad (15)$$

\*Hitachi Modelo 100-20

### Parte III: Conjugación.

#### Procedimiento:

Se ajustaron las globulinas (proteínas) a una concentración de 10 mg/ml; esto se efectuó con solución amortiguadora de carbonatos (pH 9.5-9.8) y solución salina fisiológica siguiendo la relación que se muestra en la tabla IV poder efectuar la conjugación. Se adicionaron de 0.025 a 0.033 mg de isotiocianato de fluoresceína\*/mg de globulina. Después se procedió a efectuar la conjugación (se hizo a temperatura ambiente, aproximadamente 20°C). Se dejó en agitación constante y lenta durante 2 horas y después se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min a 4°C y se eliminó el precipitado. Posteriormente se pasó el conjugado a través de una columna de Sephadex G-25 eluido en PBS pH 7.2 se recomienda que el conjugado pase en el espacio de 1 1/2 a 2 - horas). El conjugado recolectó en varios tubos de ensayo y se eliminó el más diluido, por simple atracción visual. Posteriormente el conjugado se dializó en PBS pH 7.2 en refrigeración - (4°C) por espacio de 48 horas, haciendo 2 cambios; uno cada 24 horas, después se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min a 4°C - para eliminar bacterias y grumos. Se agregó merthilate para lograr una concentración final de 1:10,000. El conjugado ya dializado se envaso en alícuotas de 0.3 ml y se congelaron estas a -70°C

#### Titulación del conjugado:

Se hicieron diluciones dobles en PBS pH 7.2. El antígeno

---

\*E. Merck, Darmsta D.T.

fue teñido con cada dilución y se observó en un microscopio de fluorescencia. Se dan grados de fluorescencia de +, ++ y +++ dependiendo de la intensidad de la misma. Se considera el título del conjugado la última dilución que da una brillantez de +++.

Por último se determinaron las posibles reacciones cruzadas que podrían tener los conjugados, eso se realizó probando contra antígenos de cepas identificadas, de esta forma se determinó la especificidad que el conjugado poseía.

RESULTADOS.

Los resultados de las pruebas efectuadas a cada una de las cepas donadas, para la verificación del género y especie, se encuentran resumidos en la TABLA V.

Se obtuvieron concentrados de los antígenos "O" (Somáticos) con un mínimo de 80% de células vegetativas. A partir de estos concentrados, se prepararon 20 ml de antígeno a una concentración de  $9 \times 10^8$  bacterias y posteriormente se inocularon a los conejos por vía intravenosa para la obtención de los sueros hiperinmunes.

Los sueros hiperinmunes obtenidos al 12vo día de inoculación presentaron un título promedio superior a 1:400 en la prueba de aglutinación, por lo cual se procedió a sangrar en blanco a los conejos al 14vo día de iniciada la inoculación.

Los resultados del fraccionamiento del suero obtenido (purificación de  $\gamma$ -Globulinas) y la determinación de la concentración de proteínas, se muestran en la TABLA VI.

Para realizar la conjugación se ajustaron las proteínas ( $\gamma$ -Globulinas) a una concentración de 10 mg/ml, así mismo se utilizó una concentración de 0.028 mg de isotiocianato de fluoresceína/mg de  $\gamma$ -Globulinas. Los cálculos efectuados para la conjugación se muestran en la TABLA IV.

Para determinar la especificidad de los conjugados obtenidos, se confrontaron estos con antígenos de cepas ya identifi-

cadas (pruebas cruzadas). Los resultados de estas pruebas se muestran en la TABLA VII.

TABLA IV. CALCULOS EFECTUADOS PARA LA CONJUGACION DE  $\gamma$ -GLOBULINAS (OBTENIDAS A PARTIR DE LOS ANTIGENOS DE Clostridium chauvoei, Clostridium septicum, Clostridium novyi tipo B y Clostridium sordellii) CON EL ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEINA

	Total de proteínas ( $\gamma$ -Globulinas) obtenidas, y concentraciones correspondientes	Volumen de aforo para obtener las $\gamma$ -Globulinas al 10%	Relación de: -Proteínas ( $\gamma$ -Globulinas). -Solución amortiguadora de carbonatos* -Solución Salina Fisiológica (SSF). Adicionados para obtener las $\gamma$ -Globulinas al 10%	mg de isotocianato de fluoresceína usados en la conjugación**
Cl. chauvoei	422.65 mg en 28.5 ml (14.28 mg/ml)	42.26 ml	28.5 ml de proteína 4.2 ml de Sol.amortiguadora 9.56 ml de S.S.F.	11.83 mg
Cl. septicum	163.28 mg en 13.0 ml (12.56 mg/ml)	16.32 ml	13.0 ml de proteína 4.2 ml de Sol.amortiguadora 1.7 ml de S.S.F.	4.56 mg
Cl. novyi tipo B	93 mg en 10 ml (9.3 mg/ml)	9.3 ml ***en este, se aforó a 11.0 ml	10.0 ml de proteína 1.0 ml de Sol.amortiguadora	2.60 mg
Cl. sordellii	171.9 mg en 15 ml (11.46 mg/ml)	16.32 ml	15.0 ml de proteína 1.7 ml de Sol.amortiguadora	4.81 mg

\*Solución Amortiguadora de Carbonatos (pH 9.5-9.8).

\*\*Para la conjugación se usó 0.028 mg de isotiocianato de fluoresceína/mg de proteína.



TABLA V.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS.

	Moti- lidad.	Glu- cosa.	Mal- tosa.	Lac- tosa.	Sucro- sa.	Sali- cin.	Mani- tol.	In- dol.	Hemo- lisis.	Yema de huevo Opale- cencia	Capa per- lada.	Patog. en Animales de Laboratorio
Cl. chauvoei IRP 206	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Cl. septicum cepa escocesa.	+	+	+	D	+	-	-	-	-	-	-	+
Cl. novyi tipo B IRP 190	+	+	D	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Cl. sordellii IRP 233	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+

\* D = dudoso.

NOTA: Se considera que la bacteria utiliza el carbohidrato, si esta disminuye la escala de pH 0.8 o más

TABLA VI. RESULTADOS OBTENIDOS DEL FRACCIONAMIENTO DEL SUERO Y DETERMINACION DE PROTEINAS.

	Volumen de $\gamma$ -Globulinas obtenidas a partir del suero hiperinmune.	Absorbancia*	** Concentración de proteínas (mg/ml)	Total de proteínas ( $\gamma$ -Globulinas) obtenidas.
Cl. chauvoei	28.5 ml	0.445	14.83	422.65 mg en 28.5 ml
Cl. septicum	13 ml	0.377	12.56	163.28 mg en 13.0 ml
Cl. novyi tipo B	10 ml	0.279	9.3	93.0 mg en 10.0 ml
Cl. sordellii	15 ml	0.344	11.46	171.9 mg en 15.0 ml

\* Absorbancia obtenida a 280 nm en un espectrofotometro Hitachi 100-20.

\*\*Estos valores se obtuvieron por la siguiente fórmula:

$$\text{mg de proteína/ml} = \frac{\text{Densidad óptica (DO)} \times \text{dilución}}{1.5} \quad (\text{Morilla, G.A. 1979}).$$

1.5

nm = nanómetros.

mg = miligramos.

ml = mililitros.

TABLA VII. DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS CONJUGADOS OBTENIDOS ("PRUEBAS CRUZADAS").

CONJUGADO DE:	*ANTIGENO DE C. chauvoei.	*ANTIGENO DE C. septicum.	*ANTIGENO DE C. novyi tipo B	*ANTIGENO DE C. sordellii
C. chauvoei	+	-	-	-
C. septicum	-	+	-	+
C. novyi tipo B	-	-	+	-
C. sordellii	-	+	-	+

\*Estos antígenos se obtuvieron a partir de improntas de tejido muscular (desparafinados) de cuyes previamente infectados con las cenas tipo para desafío de Clostridium chauvoei, Clostridium septicum, Clostridium novyi tipo B y Clostridium sordellii. Estos animales fueron inoculados por vía intramuscular con una mezcla (1:1) de crecimiento bacteriano (24 horas de incubación) y cloruro de calcio (5%).

DISCUSION.-

Los procedimientos para el aislamiento e identificación de anaerobios son difíciles y poco conocidos, ya que existe una gran variabilidad en las pruebas bioquímicas que caracterizan a estos.

Para diferenciar a los anaerobios positivos, se requiere generalmente de pruebas con antitoxinas y pruebas de fermentación de carbohidratos, ya que las pruebas serológicas no juegan un papel importante en el reconocimiento o subdivisión de estos organismos (13). Sin embargo, la identificación de cultivos por pruebas de fermentación de carbohidratos se debe manejar con mucho cuidado, debido a la variación que existe entre las mismas especies del género.

Los resultados de las pruebas de fermentación de carbohidratos realizadas a las cepas de desafío (C. chauvoei, C. sordellii, C. novyi tipo B) muestran concordancia, no siendo así para la cepa de C. septicum, para la cual la mayoría de los autores estipulan que la fermentación de sucrosa es negativa, sin embargo, Smith, - L.D. (16), menciona que existen algunos serotipos de C. septicum que fermentan la sucrosa. Algo similar ocurre para la fermentación de salicin, ya que los resultados obtenidos para la fermentación de este carbohidrato son negativos, no siendo así para la mayoría de los autores. La explicación de este último resultado puede ser que debido a que el medio base es muy rico en nutrientes y el salicin tiene una estructura compleja, la bacteria desdobla primero las moléculas más simples y por lo tanto no alcanza a degra

dar el carbohidrato en las primeras 24 horas de incubación.

Existen otras pruebas diferentes a la fermentación de carbohidratos, tales como la neutralización de toxinas, cromatografía de gases, etc que son de gran utilidad para confirmar diagnósticos bacteriológicos de anaerobios, pero ninguna de ellas proporciona la rápida identificación de los gérmenes patógenos específicos, ya que todas ellas requieren del cultivo del microorganismo. La aplicación de las técnicas de tinción inmunofluorescentes tiene grandes ventajas sobre estas pruebas; por estos métodos los organismos pueden identificarse no solamente en frotis de cultivos puros y mixtos, sino que también en frotis de material patológico y en secciones de tejidos, por lo tanto el diagnóstico se puede hacer rápidamente. Mediante el uso de sueros específicos marcados se pueden identificar varias especies de Clostridium. Esta técnica puede proveer igual valor en la diferenciación de miembros proteolíticos como en Clostridium botulinum de Clostridium sporogenes (Batty y Walker, 1964,1965; Boothroyd y Georgala, 1964). La fluorescencia de anticuerpos marcados también actúa específicamente para Clostridium oedematiens, Clostridium tetani, Clostridium septicum y Clostridium chauvoei (Batty y Walker 1963 a,b; 1965). La aplicación con éxito de las técnicas de inmunofluorescencia depende del fraccionamiento de las porciones antigénicas de varias cepas de las especies particulares para obtener al menos un antígeno en común que no pertenece a ningún otra especie (13).

De acuerdo a la experiencia obtenida por varios autores (17, 19,23) son los antígenos somáticos los que brindan la mejor espe-

cificidad de los conjugados no solo depende de la calidad de los antígenos, sino que también depende del período de inoculación. Se ha observado que cuando el período de inoculación se continua por más de 14 días, aparecen entonces los anticuerpos contra los flagelos de las células, los cuales presentan pruebas cruzadas entre las diferentes especies del género *Clostridium* y por lo tanto ocasionan una disminución de la especificidad del conjugado (19).

Los resultados de las pruebas cruzadas realizadas nos muestran que los conjugados de *C. chauvoei* y *C. novyi* tipo B son específicos, no siendo igual para los conjugados de *C. septicum* y *C. sordellii*, los cuales cruzan entre sí; esto puede deberse a la presencia de un determinante antigénico que es común para ambas especies, por lo cual para diferenciar entre estas dos especies, es necesario recurrir a pruebas de identificación bacteriológicas.

CONCLUSIONES:

Los antígenos obtenidos de acuerdo a la técnica recomendada por Claus y Macheak (5) presentaron mínimo un 80% de células vegetativas (antígenos "O" vegetativos); así mismo, el Medio Smith y Holdeman (19) demostró ser adecuado para la producción de estos antígenos.

Las pruebas bioquímicas tradicionales usadas en la diferenciación de los anaerobios positivos (fermentación de carbohidratos) pueden presentar resultados falsos.

El esquema de inoculación en conejos utilizado con los antígenos "O" vegetativos proporcionó buenos títulos de anticuerpos. El título de los anticuerpos obtenidos pueden ser medidos por prueba de aglutinación en placa, aunque existen pruebas más específicas que esta.

Se obtuvieron anticuerpos "O" vegetativos marcados con isotiocianato de fluoresceína de las cepas de:

- C. chauvoei IRP 206
- C. novyi tipo B IRP 190
- C. sordellii IRP 233
- C. septicum (cepa escocesa)

Los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína (Conjugados) de las cepas de C. chauvoei y C. novyi tipo B muestran especificidad en las pruebas cruzadas realizadas desde la dilución 1:40, no siendo así para las de las cepas de C. septicum y C. sordellii.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bagadi, H.O. (1977). Production and counting of spores of Clostridium chauvoei. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 33, - No. 6; 1287-1288.
- 2.- Beeson, P.B.; Mc. Dermont, W. (1972). Tratado de Medicina Interna Vol. 1, 13va. edición. Editado por la Nueva Editorial Interamericana. Pags. 586-596.
- 3.- Berkhoff, G.A. and Redenbarger, J.L. (1977). Isolation and Identification of anaerobes in the Veterinary diagnostic - laboratory. Am. Vet. Res., Vol. 38, No. 7, 1069-1074.
- 4.- Blood, D.C. and Henderson, J.A. (1960). Veterinary Medicine. 401-412 Bailliere, Tindall and Cox. London.
- 5.- Claus, K.D. and Macheak, M.E. (1972). Preparation of a -- Clostridium chauvoei antigen and determination of protective immunity by plate agglutination test. Am. J. Vet. Res., Vol. 33 No. 5, 1045-1052.
- 6.- Coles, E.H. (1967). Veterinary Clinical Pathology 270-272; 283-284: W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.
- 7.- Frerichs, G.N. and Gray, A.K. (1975). The relation between the rabbit potency test and the response of sheep Clostridial Vaccines. Research in Vet. Science. 18, 70-75.
- 8.- Holdeman, L.V.; Cato, E.P. and Moore W.E.C. (1967). Fermentation Pathways of Anaerobic Bacteria. Bull. OII Int Epiz., Vol. 67, No. 9-10, 1239-1248.
- 9.- Jasmin, A.M. (1975). Diagnostic methods in anaerobic bacteriology. Vet. Med.; Small Anim. Clin., 718-722.
- 10.- Kolbe, D.F.; Claus, K.D. and Nerving, R.M. (1981). A method



- for the production of Clostridium haemolyticum spores on solid medium. J. of Biological Standardization. 9, 115-119
- 11.- Bautista, G.C. y Morilla G.A. (1979). Manual de laboratorio del Curso de Actualización de Inmunología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (S.A.R.H.) Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C.
  - 12.- Merchant, I.A. and Packer, R.A. (1967). Veterinary Bacteriology and Virology. Chapter 31. Seventh edition. Composed and Printed by the Iowa State University Press..
  - 13.- Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (1969). Methods in Microbiology. Vol. 3 B, Chapter III, 79-112. Academic Press Inc. London.
  - 14.- Osbaldiston, G.W. and Stone, E.C. (1971). The cultivation and identification of anaerobic bacteria in the Veterinary diagnostic laboratory. Can. Vet. Jour. Vol. 12, No. 2, 45-52
  - 15.- Seminario de Clostridium (1978). Laboratorios Cutter de México, S.A., de C.V.
  - 16.- Smith, L.D. (1975). The pathogenic anaerobic bacteria. Chapter 6-18 Second edition. Charles C. Thomas Publisher.
  - 17.- Smith, L.D. and Holdeman, L.V. (1968). The pathogenic anaerobic Bacteria. Chapter 2.9-21. Charles C. Thomas Publisher.
  - 18.- Stableforth, A.W. and Galluway, I.A. (1959). Diseases due to bacteria. Vol. 1. Chapter 4, 160-223. Butterworth Scientific Publications London.
  - 19.- Sterne, M. and Batty, I. (1975). Pathogenic Clostridia. First. edition Butterworth & Co. (Publishers).
  - 20.- Stevenson, J.R. and Stronger, K.A. (1980). Protective cellular antigen of Clostridium chauvoei. Am. J. Vet. Res., Vol.

41,

No. 4 650.653.

- 21.- Thorn, G.W.; Adams, R.D.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; Petersdorf, R.G. (1981). *Medicina Interna. Harrison. Tomo I. Caps. 156,157,158. 5a. edición La Prensa Médica Mexicana*
- 22.- Torres, A.M.J; Riemann, H.P. and Cruz, A. (1978). *Inmunofluorescence monitoring of Clostridium perfringens sporulation and Formation of Spore entero-toxins. Rev. Latinoam. Microbiol. Vol. 20, No. 1, 25-30*
- 23.- Willis, A.T. (1977). *Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. Third edition. Butterworth and Co. (publishers).*