



Cultivos Celulares como Sistema Diferencial de Cepas de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* Aisladas en el Noreste de México

A. WONG GONZÁLEZ Y F. ROTH *

Institute for Crop and Animal Production in the Tropics. Session Animal Health. Kellnerweg 6. D-37077 Georg-August-University, Göttingen, Germany

*Autora para la correspondencia: Tel. +49-551-399637. Fax +49-551-393408. E mail froth@gwdg.de

ABSTRACT. *Clostridium chauvoei* and *C. septicum* have similar characteristics as far as results from biochemical methods and gas chromatography (GC) are concerned. A total of 267 samples collected from sick or dead animals in the fields from Northeast Mexico, were bacteriologically analysed and differentiated by the GC technique. From these strains, 16 belong to the group of *C. chauvoei/C. septicum*. Studies on the effect of toxin on cell cultures of the lines EBL, 3T3, BHK21-BSR/PK5/88, CHO-K1 and MDCK were performed. The objective was to obtain further data for identification, as the results from GC do not allow exact differentiation between *C. chauvoei* and *C. septicum* species. The results were obtained in tests with BHK21-BSR/PK5/88 cells as this had proved to be the most sensitive cell line, closely followed by 3T3 and CHO-K1 cells. MDCK cells were of little sensitivity. Results of the cytotoxin test of the 16 strains were reproducible and suggested a differentiation between *C. chauvoei* and *C. septicum* other than indicated by GC. The cytotoxin test is a highly specific system that provides also an additional method to distinguish between *C. chauvoei* and *C. septicum* strains.

Key words: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, toxin, cell cultures.

RESUMEN. *Clostridium chauvoei* y *C. septicum* presentan patrones muy similares en la caracterización bioquímica y en el análisis de cromatografía de gases (CG) de ácidos grasos volátiles. De un total de 267 muestras colectadas de animales enfermos ó muertos en los campos del Noreste de México, fueron analizadas bacteriológicamente y diferenciadas por la técnica de CG. De esas cepas, 16 pertenecen a el grupo de *C. chauvoei/C. septicum*. Los estudios de los efectos de las toxinas fueron realizados en las líneas celulares EBL, 3T3, BHK21-BSR/PK5/88, CHO-K1 y MDCK. El objetivo fue obtener datos adicionales para la identificación, debido a que los resultados de CG no permiten una diferenciación exacta entre las especies de *C. chauvoei* and *C. septicum*. Los resultados obtenidos en las pruebas mostraron que la línea celular BHK21-BSR/PK5/88 ser la más sensible estrechamente seguida por las células 3T3 y CHO-K1. Las células MDCK fueron las menos sensibles. Los resultados de la prueba de citotoxicidad de las 16 cepas fueron reproducibles y sugieren una diferenciación entre *C. chauvoei* and *C. septicum* diferente a la indicada por CG. La prueba de citotoxicidad es un sistema altamente específico que provee también un método adicional para distinguir las cepas de *C. chauvoei* y *C. septicum*.

Palabras clave: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, toxina, cultivos celulares.

INTRODUCCIÓN

Clostridium septicum, el agente etiológico del Edema Maligno en animales domésticos y de la Gangrena Gaseosa en humanos, está estrechamente relacionado con *C. chauvoei*, el cual causa la enfermedad denominada Pierna Negra en bovinos y ovinos. Estas dos especies presentan patrones muy similares en la caracterización bioquímica y en el análisis de cromatografía de gases (CG) de ácidos grasos volátiles.¹¹ Asimismo, poseen antígenos comunes, los cuales han sido detectados por inmunofluorescencia¹⁶ y ELISA.⁸

Una característica diferencial ampliamente aceptada es

la fermentación de la sacarosa, la cual es positiva para *C. chauvoei* y negativa para *C. septicum*, aunque Al-Khatib¹ ha publicado que esta diferencia no es real, así como también cuestionó el que *C. septicum* como medio de diferenciación entre estos Clostridia, forme largas cadenas de filamentos en las cavidades serosas y en la superficie del hígado de animales infectados.¹⁰

Los patrones de toxinas de *C. septicum* denominados alfa toxina (letal, citotóxica, necrótica y hemolítica), beta toxina (desoxiribonucleasa), gamma toxina (hialuronidasa) y delta toxina (hemolisina sensible al oxígeno), son casi idénticos a los producidas por *C. chauvoei*. La neuroaminidasa es sólo producida por *C. septicum*.²¹ La diferencia de



la toxina alfa de *C. chauvoei* y *C. septicum* es que la toxina alfa de *C. chauvoei* es débil letal, necrótica y hemolítica pero no citotóxica.²²

El desarrollo de pruebas en cultivos celulares comprobó el efecto citotóxico y citopático de las toxinas de algunas especies del género *Clostridium* y mostró ser un método más sensible para la detección de toxinas en comparación con el uso de pruebas intravenosas en ratones o intramuscular en cobayos.^{3,5,13,14}

Durante un estudio de enfermedades telúricas en el Noroeste de México, fueron colectadas 267 muestras de cadáveres o tejido muscular de bovinos enfermos con signos clínicos compatibles a Clostridiasis. Del total de las muestras tomadas, 67 se identificaron por métodos bacteriológicos tradicionales y diferenciados por cromatografía de gases (CG) como cepas pertenecientes al género *Clostridium*, de las cuales dieciséis cepas fueron clasificadas en el grupo *C. chauvoei/C. septicum*.^{7,20}

El objetivo de este trabajo fue obtener datos adicionales para la diferenciación entre las especies de *C. chauvoei* y *C. septicum* y seleccionar la línea celular más sensible para el desarrollo de la prueba de citotoxicidad, debido a que los resultados obtenidos por CG no lograron una diferenciación exacta entre estas especies.^{7,20}

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum*. Cepas de referencia de *C. chauvoei* 1023 (NCTC), 1076 (ATCC 10092) y 1271 (IRP 206), y de *C. septicum* 42 (19344 Atlanta USA) y 1026 (ATCC 12464). Las cepas del grupo *C. chauvoei* y *C. septicum*: 802, 809, 853, 892, 924, 945, 955, 958, 970, 974, 996, 1178, 1182, 1183, 1199, 1200, 1241 y 1242 aisladas de animales enfermos de pie negro en el Noroeste de México.

Caracterización bacteriológica de las cepas. La identificación bacteriológica de las cepas en este estudio contempló las características celulares y de cultivo. Las cepas fueron sembradas en Agar Sangre e incubadas en condiciones atmosféricas de anaerobiosis a 37 °C por 24 h y, además, se analizaron las reacciones bioquímicas de la fermentación de los carbohidratos celobiosa, trealosa y sacarosa entre estos microorganismos. El resultado de la fermentación es un cambio del color del medio PYG.

Inmunofluorescencia. La detección inmunológica fue realizada con base en anticuerpos fluorescentes específicos contra *C. chauvoei* y *C. septicum*. Las muestras fueron fijadas con acetona-metanol (75/25) por 20 min. Subsecuentemente, se agregó 75 µl del conjugado de suero hiperinmune (VMRD, Inc.) y se incubó por 30 min en cámara húmeda. Los frotis después fueron lavados con regulador FA, pH 9.0 y examinados en el microscopio fluorescente.

Cromatografía de gases. Las cepas de los clostridia fueron procesadas para su identificación y posterior diferenciación de acuerdo con el contenido de ácidos grasos de

las cadenas ligeras y pesadas de la pared celular por medio de cromatografía de gases en el cromatógrafo de gases modelo Sigma 200 (PerkinElmer). De un cultivo de 48 h en 20 ml de medio reforzado para clostridia, incubados a 37° C en condiciones de anaerobiosis y después de lavadas las células con solución 0.85 % NaCl, se obtuvieron 100 mg de masa celular. Para la saponificación se agregó 1 ml de la solución compuesta por 45 g NaOH, 150 ml Metanol y 150 ml agua destilada, se tuvo en baño María a 100°C durante 30 min y fue enfriado en agua helada por 10 min. A la suspensión orgánica de ácidos grasos metilados se le agregaron 1.25 ml de una solución de hexano y eterélico (1:1), se homogenizó y después fue centrifugada a 1600 g por 5 min y se retiró la fase inferior de la solución. El proceso alcalino de lavado se llevó a cabo agregando 3 ml de NaOH 10.8 g en 900 ml agua destilada, se homogenizó la muestra para luego centrifugarla a 1600 g por 5 min y después se almacenó la muestra a -20°C. Después de congelar, 250 µl de la fase orgánica se utilizaron para cargar el cromatógrafo de gases. Finalmente los resultados fueron analizados con el método de identificación numérica con el Programa "BIS" (Bacterial Identification System).¹¹

Producción de toxinas. Las bacterias en estudio fueron inoculadas en 20 ml de medio de cultivo infusión cerebro corazón e incubadas a una temperatura de 37°C, bajo condiciones atmosféricas de anaerobiosis. Después, se centrifugaron a 900 x g durante 30 min y se colectó el sobrenadante para almacenarlo en viales de 1 ml a temperatura de -30°C.

Líneas celulares. Cinco líneas de células CHO-K1, EBL, MDCK, y 3T3 (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células, Braunschweig, Alemania) y BHK21-BSR/PK5/88 (Banco de Células para líneas celulares en Medicina Veterinaria, Insel Riems, Alemania) fueron cultivadas para determinar la cantidad de citotoxina de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos.

Examen de citotoxina. El examen de citotoxina fue realizado en microplacas con noventa y seis pozos para cultivo de células "tipo F" (flat bottom) (Sarsted GmbH). Para cada una de las cepas en estudio se agregaron 50 µl de medio de cultivo y en cada uno de los hoyos de la línea B a la G y de la columna 2 a la 11. En la columna 2 se agregaron 50 µl de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos diluidos geoméricamente hasta la columna 10 y se desecharon 50 µl de esta última dilución. La columna 11 se dejó como control positivo de crecimiento celular. Seguidamente, se agregaron 50 µl de cultivo de las líneas celulares en una concentración de 1 x 10⁵. Finalmente se agregaron 50 µl del medio de cultivo de células y se colocó su tapa. Durante 72 h la placa se incubó a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5 % CO₂. Posteriormente, en cada uno de los hoyos previamente inoculados, se agregaron 25 µl de la solución MTT (5 mg/ml disuelto en PBS) y nuevamente fue incubado por 3 h. Transcurrido ese tiempo se invirtió la microplaca, desechando las soluciones. Después, se agregaron 20 µl de solución SDS 3% y 100 µl de



HCl 0.04 N eluido en isopropanol y fueron mezcladas hasta que no quedaran restos de células. Para leer la microplaca se usó el fotómetro Scan Reader (ASYS Hitech GmbH) a 570 nm con el Programa DigiWin Software V 2.0 (Mikrotek). Finalmente se calculó en unidades citotóxicas por mililitro (UC/ml) el resultado de la lectura a 570 nm y número recíproco de la dilución del 50 % de las células viables.

RESULTADOS

Bacteriología. Con el empleo de la tinción de Gram, se encontró que los cultivos bacterianos jóvenes presentaban una reacción positiva. No obstante, en cultivos de más de 48 h de incubación, mostraron una reacción débil positiva. La morfología predominante fue la de células pleomorfas aunque en algunos casos se presentó la forma específica de bacilos cortos o largos. La disposición de la espora fue central-terminal y de forma oval. En la prueba de movilidad el resultado fue negativo. El tipo bacteriológico de hemólisis mostró ser beta, con excepción de las cepas 853 y 924 con un tipo de hemólisis gamma y hemólisis alfa

para la cepa 802 (Tabla 1). Las pruebas bioquímicas de fosfatasa y catalasa resultaron ser negativas para todas las cepas en estudio. En la determinación de reacción a los azúcares celobiosa, sacarosa y trealosa se obtuvo un resultado muy variable.

En el examen de inmunofluorescencia se encontró, que las cepas 802, 970, 1242 reaccionaron positivamente frente a los anticuerpos específicos contra *C. chauvoei* y la 892, 924, 955, 958, 996, 1199 y 1241 contra los de *C. septicum*. En las cepas restantes el resultado fue negativo (Tabla 1).

Identificación por cromatografía de gases. Las cepas mexicanas 974, 996, 1178, 1199, 1200, 1241 y 1242 tuvieron mayor coeficiente de correlación de acuerdo con el perfil de ácidos grasos volátiles, según la cromatografía de gases, en comparación con las cepas de referencia de *C. chauvoei*. Las cepas 802, 853, 892, 924, 955, 958 y 970 tuvieron mayor porcentaje de similitud con las cepas de referencia de *C. septicum*. Las cepas 809 y 945 se clasificaron como *C. spp.* (Tabla 1).

Prueba de citotoxicidad. Las cepas de referencia *C. chauvoei* 1023, 1076 y 1271, las cepas 974 y 1200 clasificadas como *C. chauvoei*, asimismo las cepas 802, 853, 945 y 970 clasificadas como *C. septicum* y las cepas classifica-

Tabla 1. Resultados de las características bacteriológicas de las cepas de *C. chauvoei* y *C. septicum* aisladas en el Noreste de México.

Cepa	Características celulares					Inmunofluorescencia		CG *	
	Gram	morfología	disposición	hemólisis	movilidad	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. septicum</i>
853	pos.	polimorfás	aisladas	γ	neg.	neg.	neg.	0.991	0.992
892	pos.	polimorfás	cadena	β	neg.	neg.	pos.	0.949	0.984
924	pos.	bacilo corto	cadena	β	neg.	neg.	pos.	0.973	0.976
945	pos.	bacilo largo	cadena	β	neg.	neg.	neg.	<i>C. spp.</i>	<i>C. spp.</i>
802	pos.	bacilo largo	cadena	α	neg.	pos.	neg.	0.980	0.981
955	pos.	bacilo corto	cadena	β	neg.	neg.	pos.	0.991	0.992
958	pos.	polimorfás	cadena	β	neg.	neg.	pos.	0.964	0.990
970	pos.	polimorfás	aisladas	β	neg.	pos.	neg.	0.976	0.990
974	pos.	polimorfás	aisladas	β	neg.	neg.	neg.	0.987	0.974
996	pos.	polimorfás	aisladas	β	neg.	neg.	pos.	0.984	0.960
1178	pos.	polimorfás	aisladas	β	neg.	neg.	neg.	0.982	0.962
1199	pos.	polimorfás	aisladas	β	neg.	neg.	pos.	0.976	0.968
1241	pos.	polimorfás	aisladas	β	neg.	neg.	pos.	0.991	0.978
1242	pos.	polimorfás	aisladas	β	neg.	neg.	neg.	0.982	0.979
809	pos.	bacilo largo	cadena	β	neg.	neg.	neg.	<i>C. spp.</i>	<i>C. spp.</i>
1200	pos.	polimorfás	cadena	γ	neg.	pos.	neg.	0.992	0.990

* Correlación lineal de la Cromatografía de Gases con las cepas de referencia 1023, 1271 y 1076 de *C. chauvoei*

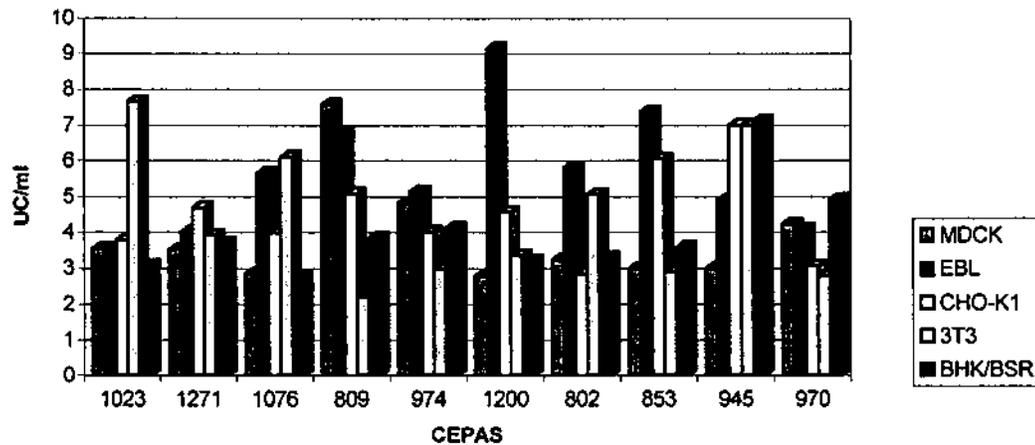


Fig. 1. Citotoxicidad de las cepas mexicanas relacionadas con las cepas de referencia No. 1023, 1271 y 1076 de *C. chauvoei* en diferentes líneas celulares.

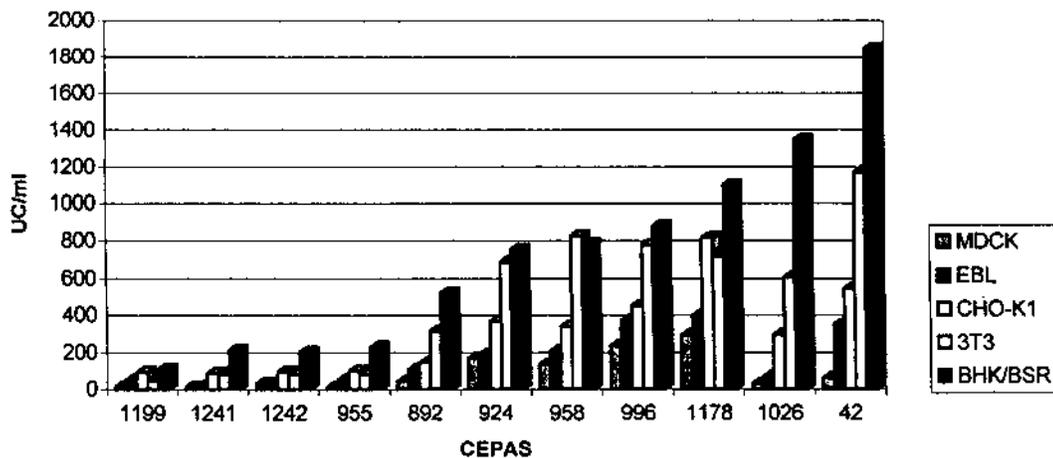


Fig. 2. Citotoxicidad de las cepas mexicanas relacionadas con las cepas de referencia No. 1026 y 42 de *C. septicum* en diferentes líneas celulares.

das como de campo mexicanas 809 y 945 por medio de CG, presentaron menos de 10 unidades citotóxicas por ml (UC/ml) en las líneas celulares BHK21-BSR/PK5/88, CHO-K1, EBL, MDCK y 3T3 (Fig. 1).

La fig. 2 muestra los niveles más altos de citotoxicidad, alrededor de 1800 CU/ml alcanzados por las cepas de referencia 42 y 1026 de *C. septicum*. Las cepa 996 y 1178, clasificadas como *C. chauvoei*, alcanzaron hasta 877 UC/ml la primera y 1100 UC/ml la segunda. Las cepas 892, 924 y 958 identificadas como *C. septicum* obtuvieron 518, 750 y 783 UC/ml respectivamente. El componente tóxico de las cepas 1199, 1241, 1242 clasificadas como *C. chauvoei* y el de la cepa 955 clasificada como un *C. septicum* mostró valores entre 108 y 229 UC/ml en la línea celular BHK21-BSR/PK5/88 y, en las líneas celulares 3T3 y CHO-K1 va-

lores alrededor de 80 UC/ml. En la línea celular MDCK los títulos más constantes fueron de alrededor de 12 UC/ml (Fig. 2).

Las cepas mexicanas No. Lab. 802, 853, 970, 974, y 1200 se clasificaron como *C. chauvoei* por medio de la prueba de citotoxicidad. En el examen de inmunofluorescencia con los anticuerpos de *C. chauvoei* tres de las cinco cepas mexicanas (802, 970, y 1200) son positivas. En CG no hay diferencias entre las cepas 802, 853 y 1200. La cepa No. Lab. 970 es identificada como *C. septicum* y la 974 como *C. chauvoei*.

Las cepas mexicanas No. Lab. 892, 924, 955, 958, 996, 1178, 1199, 1241 y 1242 tienen un título muy alto de citotoxina y por eso son clasificadas como *C. septicum*. Cinco de las nueve cepas son positivas en el examen de immuno-

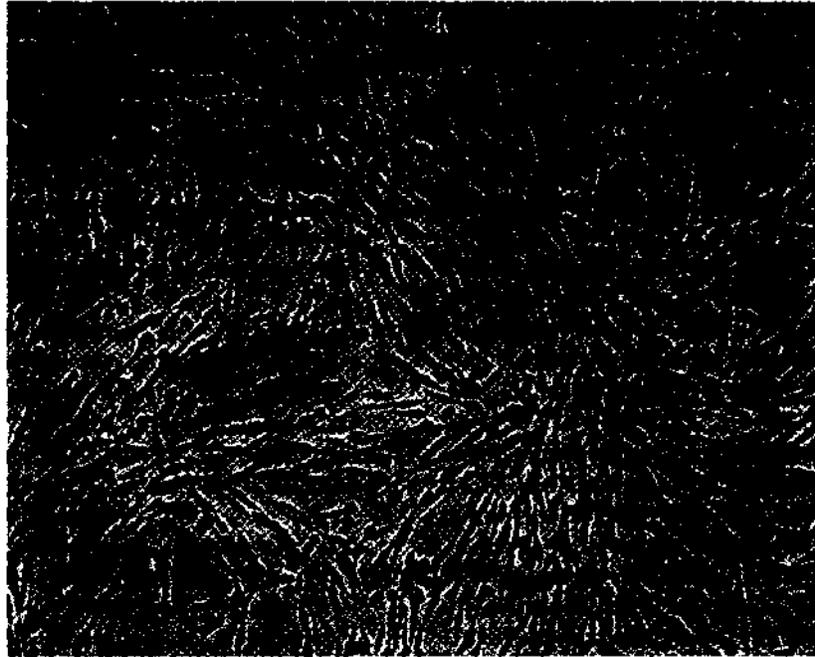


Fig. 3. Efecto citotóxico del sobrenadante de la cepa de referencia *C. septicum* 1026 después de tres días de incubación sobre la línea celular BHK21-BSR/PK5/88 con menor crecimiento y células redondas y muertas.

fluorescencia con los anticuerpos de *C. septicum*. Los resultados de CG fueron muy variables. Las cepas 946 y 1242 son negativas a la inmunofluorescencia con los dos anticuerpos *C. chauvoei* y *C. septicum* y por GG son clasificadas como *C. chauvoei*. Estas dos cepas producen una alta cantidad de citotoxina en comparación con las cepas *C. chauvoei*.

DISCUSIÓN

C. chauvoei y *C. septicum* son organismos similares; algunos autores consideran que son miembros de la misma especie.¹⁰ Aparentemente, el único medio para diferenciar estos microorganismos es mediante las características serológicas, patológicas y toxicológicas.¹⁴

La diferenciación entre las especies de *C. chauvoei* y *C. septicum* aisladas en el Noreste de México, basada en las características celulares, de cultivo y patrones bioquímicos mostró resultados muy análogos.

En los estudios de morfología celular no se encontró un patrón característico. Cato⁴ menciona, acerca de la morfología celular de *C. Chauvoei*, que esta puede ser pleomórfica y que las cepas de *C. septicum* son bacilos que presentan morfología recta o curva con disposición aislada o en pares. En relación, a las características de las cepas en estudio, éstas mostraron diferentes formas en el margen perfil de las colonias. El color predominante fue ante y el tipo de hemólisis β . Similares resultados de variación morfológica han sido reportados por Gomes Lima.⁶ El encontró 8

tipos morfológicos de bacterias y solamente el 10.17 % de 59 colonias examinadas presentó la forma característica reportada por Cato.⁴

Muchos problemas han sido reportados asociados con el uso de pruebas bioquímicas para la identificación de clostridia. Las pruebas bioquímicas pueden dar resultados dudosos, falso positivos, o falso negativos.¹⁷

La detección inmunológica usando anticuerpos fluorescentes esta bien establecida pero tiene algunas limitaciones.¹⁶ En este estudio de inmunofluorescencia de las cepas de *C. chauvoei* y *C. septicum* no se observó reacciones cruzadas entre ellas como se ha reportado por otros autores.^{2,9,12} Algunas cepas sólo se tiñeron en los márgenes de las células como lo describe Hamaoka.⁹

El análisis de CG para distinguir entre las dos especies de este estudio resultó en patrones de correlación lineal muy parecidos. Otros investigadores han reportado la dificultad de distinguir las especies de *C. chauvoei* y *C. septicum* por CG.^{7,11,15,18}

El examen de citotoxina ha sido empleado para pruebas de calidad en la producción de vacunas.^{22,23} La diferencia de la potencia letal entre las alfa toxinas de las especies de *C. chauvoei* y *C. septicum* sobre cultivos celulares es una característica útil para distinguir entre estas dos especies. Los resultados del efecto citotóxico de las cepas de referencia, junto con las dieciséis cepas del grupo *C. chauvoei*/*C. septicum* en las líneas celulares EBL, 3T3, BHK21-BSR/PK5/88, CHO-K1 y MDCK sugieren una diferenciación entre estas dos especies que anteriormente no se podía establecer mediante los resultados obtenidos por CG.

La línea celular BHK21-BSR/PK5/88 resultó ser la



más sensible estrechamente seguida por las células 3T3 y CHO-K1 y los cultivos de MDCK y EBL, para todas las cepas agrupadas como *C. septicum*. Los resultados de citotoxicidad de las cepas de *C. chauvoei* fueron variables en las diferentes líneas celulares. Para los exámenes de citotoxicidad se seleccionó la línea celular BHK21-BSR/PK5/88 porque mostró una desviación estándar muy estrecha.

Las cepas de referencia de *C. septicum* No. Lab. 1026 y 42, y las cepas mexicanas No. Lab. 892, 924, 955, 958, 996, 1178, 1199, 1241 y 1242 mostraron mayor citotoxicidad que las cepas de referencia de *C. chauvoei* No. Lab. 1023 y 1076, 1271, y las cepas mexicanas No. Lab. 809, 853, 945, 970, 974 y 1200.

Schallehn reportó que un concentrado de sobrenadante de un cultivo de *C. chauvoei* y *C. septicum* tiene efecto citotóxico sobre la línea celular de fibroblastos de pulmón embrionario de humanos. En este trabajo se observó que *C. chauvoei* produce una cantidad mínima de citotoxina.¹⁹ El efecto tóxico de las cepas de referencia de *C. chauvoei* y de las cepas mexicanas que presentaron menos de 10 UC/ml puede ser debido al efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de las líneas de células. Ese efecto citotóxico de *C. chauvoei* no es suficiente para decir que *C. chauvoei* produce citotoxina como *C. septicum*.

Este sistema de cultivos celulares puede ser usado como herramienta adicional para distinguir las especies de *C. chauvoei* y *C. septicum* después de que estas especies hayan sido analizadas con pruebas bacteriológicas tradicionales o CG.

REFERENCIAS

- Al-Khatib, G. 1968. Beiträge zur Clostridiendifferenzierung. IV Zur Differenzierung von *Cl. septicum* und *Cl. chauvoei*. Arch. Exp. Vet. Med. 23: 963-970.
- Batty, I. y P. D. Walker. 1963. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by use of fluorescent labeled antibodies. J. Path. Bact. 85:517-521.
- Borrmann, E. y F. Schulze. 1998. Nachweis von *Clostridium novyi*-typ B alpha-Toxin mittels Zellkulturen. Altex Suppl. 15:53-56.
- Cato, E. P., W. L. George y S. M. Finegold. 1986: Genus *Clostridium*. Prazmowski 1880, p. 1141-1200. In Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The Williams y Wilkins Co., Baltimore.
- Ebert, E., V. Öppling, E. Werner y K. Cußler. 1998. Entwicklung und Prävalidierung von Alternativmethoden zur Wirksamkeitsprüfung von *Clostridium perfringens*-Impfstoffen. Altex Suppl. 15:59-61.
- Gomes Lima, F. 1992. Tipos de colonias e características bioquímicas de culturas de *Clostridium chauvoei* isoladas de bovinos no Brasil. Pesq. vet. Bras. 12:65-69.
- González Salinas, J. 1995. Untersuchungen zur Identifizierung von Clostridia-Feldstämmen von Wiederkäuern aus dem Nordosten Mexikos mittels gaschromatographischer Methoden. Diss. FB Agrarwiss, University of Göttingen, Germany.
- Hamaoka, T., Y. Mori, N. Terakado y S. Nakamura. 1993. Similarity in the EDTA-soluble antigens of *C. chauvoei* and *C. septicum*. J. Gen. Microb. 139:617-622.
- Hamaoka, T. y N. Terakado. 1994. Demonstration of common antigens on cell surface of *Clostridium chauvoei* and *C. septicum* by Indirect-Immunofluorescence. J. vet. Med. Sci. 56:371-373.
- Hatheway, Ch. L. 1990. Toxigenic Clostridia. Clinical Microbiology. Reviews. 1:66-98.
- Heitefuß, S. 1991. Untersuchungen zur Identifizierung von aeroben, anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien mit gaschromatographischen Methoden. Gött. Beitr. Land-Forstwirtschaft. Trop-Subtrop. 57.
- Hiramune, T., Y. Kobayashi, M. Nakazawa, H. Watase y K. Hashimoto. 1979. Fluorescent antibody technique on the diagnosis of blackleg. Bull. Natl. Inst. Anim. Health Jap. 78:15-18.
- Jansen, K., F. Roth y S. Petzke. 1998. Entwicklung eines Zytotoxinhemmungstests zum Nachweis von Antikörpern gegen das α -Toxin von *Clostridium septicum* in Seren. Altex Suppl. 15:56-59.
- Knight, P. A., J. H. Tilleray y J. Queminet. 1990. In Vitro Test for measurement of veterinary clostridial toxins, toxoids and antisera. I. Titration of *Clostridium septicum* toxins and antitoxins in cell culture. Biologicals 18:181-189.
- Kita, M., T. Hamaoka y H. Minato. 1987. Rapid presumptive diagnosis clostridial infections by gas chromatography. J. Jap. Vet. Sci. 49:1053-1057.
- Kuhnert, P., M. Krampe, S.E. Capaul, J. Frey y J. Nicolet. 1997. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. Vet. Microbiol. 51:291-298.
- Nakashio, S., S. Nakamura y S. Nishida 1982. Variable sugar fermentation by clostridia. Microbiol. Immunol. 26:877-844.
- Rieke, K. 1981. Differenzierung von Clostridia mit Hilfe der gaschromatographischen Analyse metabolisch gebildeter Fettsäuren. Diss. sci. agr., Göttingen.
- Schallehn, G. y M. H. Wolff. 1988. Morphologische Veränderungen humaner embryonaler Lungenfibroblasten durch Citotoxine verschiedener Clostridium-Spezies. Zbl. Bakt. Hyg. 267:367-378.
- Seifert, H. S. H., K. Bader, J. Cyplik, J. González Salinas, F. Roth, J. A. Salinas-Melendez y U. Sukop. 1996. Environment, incidence, aetiology, epizootiology and immunoprophylaxis of soil-borne diseases in North-east Mexico. J. Vet. Med.43: 593-606.
- Seifert H.S.H. 1998. Sanidad Animal en los Trópicos.



- Editorial Hemisferio Sur, S.A. Buenos Aires, Argentina.
22. Smith, L.D. y B.L. Williams 1984. The pathogenic anaerobic bacteria, 3 ed. Thomas, Springfield.
23. Wood, K.R. 1991. An alternative to the toxin neutrali-

zation assay in mice for the potency testing of the *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Type B and *Clostridium perfringens* Type D epsilon components of multivalent sheep vaccines. *Biologicals* 19:281-286.