

24/158

DETERMINACION DE NIVELES DE
ANTICUERPOS EN BOVINOS VACUNADOS
CONTRA CLOSTRIDIUM CHAUVOEI Y CLOSTRIDIUM
SEPTICUM MEDIANTE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION
PASIVA

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por
Ambrosio Martínez Cebreros
Asesor(es) M.V.Z. Aurora Velázquez E.
M.V.Z. Moisés Fraire C.
México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION...	3
MATERIAL Y METODOS.....	11
RESULTADOS.....	15
DISCUSION.....	18
CONCLUSION.....	22
LITERATURA CITADA.....	23

RESUMEN

MARTINEZ CEBREROS AMBROSIO. DETERMINACION DE ANTICUERPOS EN BOVINOS VACUNADOS CONTRA CLOSTRIDIUM CHAUVOEI Y CLOSTRIDIUM SEPTICUM MEDIANTE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION PASIVA (bajo la dirección de: M.V.Z. Aurora Velázquez E. y M.V.Z. Moisés Fraire C.)

Se efectuó la prueba de Hemoaglutinación pasiva (HAP) para determinar los niveles de anticuerpos contra Clostridium chauvoei y Clostridium septicum en 100 sueros de bovinos procedentes de una explotación ganadera ubicada en Tantoyuca, Ver. en la que se inmuniza con regularidad contra carbón sintomático y edema maligno y en 20 sueros de bovinos que no fueron inmunizados.

En los sueros de los animales controles se encontró que el 95% y el 80% reaccionaron en forma inespecífica con títulos inferiores a 1:20 contra los antígenos de Cl. chauvoei y Cl. septicum respectivamente.

Los sueros de los bovinos inmunizados mostraron una amplia variación en los niveles de inmunoglobulinas, títulos inferiores a 1:20 se encontraron contra Cl. chauvoei en el 14% y contra Cl. septicum el 49% de los sueros, se consideran que estas inmunoglobulinas son de ori--

gen inespecífico inducidos de igual forma que en los animales sin inmunizar.

El 86% y el 51% de los sueros tuvieron títulos superiores a 1:40 contra Cl. chauvoei y Cl. septicum respectivamente. Se considera que los títulos entre 1:40 y 1:160 proceden de animales que han recibido el primer estímulo vacunal y los títulos de 1:320 a 1:640 a una respuesta anamnésica.

Se considera que la prueba de HAP es útil para detectar anticuerpos producidos por la inmunización con bacterinas comerciales contra Cl. chauvoei y Cl. septicum.

DETERMINACION DE NIVELES DE ANTICUERPOS
EN BOVINOS VACUNADOS CONTRA CLOSTRIDIUM
CHAUVOEI Y CLOSTRIDIUM SEPTICUM MEDIAN-
TE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION PASIVA.

INTRODUCCION.-

Las Clostridiasis se agrupan bajo la denominación general de gangrena gaseosa, son causadas por un grupo de gérmenes del género Clostridium que existen como habitantes normales en el intestino grueso del hombre y de los animales. Sus esporas se encuentran en el suelo, polvo y aire, son estrictamente anaerobias y no pueden crecer en tejido sanos, pero crecen rápidamente cuando el tejido se desvitaliza a causa de un traumatismo o herida y reúne condiciones anaeróbicas. Si el microorganismo se multiplica, fermenta los carbohidratos presentes en el tejido produciendo gas. La distensión interfiere con el suministro de sangre y las toxinas producidas favorece la diseminación de la infección a través de los diferentes planos del tejido (13,18).

Los cuerpos extraños también actúan como causa determinante de la implantación y desarrollo de los gérmenes en el tejido, entendiéndose como cuerpo extraño, partículas que son muy grandes para ser fagocitadas y que actúan presumiblemente por interferencia en el suministro sanguíneo, creando condiciones de anaerobiosis e impidien-

do la llegada de fagocitos y otros elementos antimicrobianos a la zona de infección (4,6).

El carbón sintomático producido por Clostridium chauvoei, se origina cuando el germen invade el organismo a partir del tracto digestivo y produce una septicemia, luego se instala en las grandes masas musculares que son los sitios de elección, en donde se reproducen y sus toxinas dan origen a la lesión característica (1,11,12,14,16,17,19). En bovinos susceptibles, los signos clínicos que se presentan son: fiebre de 41°C , inflamación, edema y enfisema de las masas musculares y tejidos subcutáneos de la parte superior de las extremidades, lo que ocasiona dificultad en la marcha. Posteriormente, toxemia grave y mortalidad elevada.

En el edema maligno cuya etiología es de origen múltiple, intervienen diferentes especies de clostridia, principalmente el Clostridium septicum que penetra al organismo a través de alguna herida producida por una lesión y mediante las toxinas que elabora, produce destrucción del tejido y de allí se difunden a los tejidos adyacentes (1,11,12,13,14,16,17). La signología se caracteriza por fiebre de 41 a 42°C la presentación de una lesión local en el punto de entrada que consiste en una zona de inflamación, edema, enfisema y temblor muscular, dificultad en la marcha toxemia grave y mortalidad elevada. Sue-

se presentaron en los meses de Diciembre y Enero con un máximo de 84.9% y la mínima en Junio y Julio con 15.1% (26).

Para proteger a los animales cuando están establecidos en zonas enzoóticas los ganaderos inmunizan mediante la aplicación de bacterinas. Las más comunmente empleadas son: bacterina doble elaborada con Cl. chauvoei 50% y Cl. septicum 50% ó con bacterina triple que tiene la fórmula anterior más en porcentaje que los serotipos de Pasteurella multocida (20).

A pesar de la aplicación de las bacterinas, existen un grupo de animales que no quedan inmunizados, esto hace posible la persistencia de las clostridiasis y la presentación periódica de brotes de estas enfermedades en el hato (21).

En el laboratorio de Inmunología se hacen pruebas de control de calidad a las bacterinas comerciales inoculando animales de experimentación y efectuando pruebas serológicas a los sueros de animales inmunizados, para detectar anticuerpos contra clostridia y sus toxoides, mediante las pruebas de: aglutinación, precipitación, floculación, fijación de complemento, hemoaglutinación pasiva (2,5,7,8,9,24). Sin embargo no existen reportes de que estas pruebas se hagan en el suero de los animales en hatos vacunados, por lo que en el campo, no es posible tener la certeza de que quedaron adecuadamente protegidos.

le ser una enfermedad aguda en la que los animales mueren a partir del comienzo de los primeros signos (1,11,12,14,-16,17,18,19).

El ganado bovino joven tiene inmunidad pasiva transmitida a través del calostro y dura 4 a 6 meses. Algunos animales adultos, posiblemente debido a que en alguna etapa de su vida han tenido contacto con los gérmenes y padecido una infección subclínica son resistentes a la infección (25).

En México, se consideraba a las clostridiasis como un problema esporádico que mantenía su incidencia ligeramente ascendente (26), pero en un análisis epizootiológico presentado en la VI Reunión Anual de Sanidad Animal sobre brotes reportados desde 1972 hasta 1977, se observa un aumento paulatino de estas enfermedades durante los años de 1974 a 1975 y en el año de 1976 se presenta un incremento agudo en su incidencia, alcanzando hasta un 261% el carbón sintomático y un 13.6% el edema maligno, con respecto al año de 1975. (23,26)

Este mismo reporte muestra que los Estados de la República en que el ganado es más afectado por estas enfermedades son: Veracruz con 45% de los casos reportados, Puebla con 27%, San Luis Potosí con 14%, Chiapas con 9% y Yucatán con 5%. Se indica también que la mayor incidencia

Dentro de mis actividades en el departamento de Inmunología y Virología de esta Facultad, durante el desempeño del servicio social, tuve la oportunidad de efectuar las pruebas de control a una serie de productos biológicos y nos dimos cuenta de las frecuentes quejas de los ganaderos por la poca protección que las bacterias confieran a su ganado, por lo que decidimos hacer pruebas en los sueros de bovinos de un rancho en el que desde hace años se vacuna al ganado con regularidad.

En las pruebas serológicas de este trabajo se empleo la hemoaglutinación pasiva (HAP), por que existe una gama de antígenos solubacterianos (polisacaridos - lipoposacaridos y proteínas), que pueden absorverse o acoplarse químicamente a los eritrocitos y reaccionan específicamente con los anticuerpos homólogos. Fue utilizada originalmente por Middlebruk y Dubos en 1948 (15) para estudiar anticuerpos contra tuberculosis, sensibilizando eritrocitos de carnero tratados con ácido tánico, con proteínas de Mycobacterium tuberculosis sucesivamente después la emplearon Boyden en 1951 y Kwapinski en 1956 (15) para la determinación de la toxina de Pasteurella Pestis, Neter y colaboradores en 1956 (15) contra anticuerpos a los antígenos solubles de E. coli, Boyden en 1951 para detectar anticuerpos contra toxinas de Corynebacterium difteria. Stavitki en 1954 (15) contra toxoide de Cl. tetani y alfalecitas de Cl. perfringes.

Tomando en cuenta que Veracruz, es el estado de la República con mayor incidencia de las gangrenas gaseosas, las muestras para este estudio se obtuvieron de una zona ganadera situada en el Municipio de Tantoyucan, Ver. en la que año con año se presentan estos problemas a pesar de la vacunación. El rancho ganadero está localizado en el Km. 26 de la carretera Tantoyuca-Chicontepepec, Ver. situada en las coordenadas: $21^{\circ}21'$ latitud Norte y $98^{\circ}14'$ de longitud Oeste, con una altura de 217 metros sobre el nivel del mar (22). El clima de la región está clasificado como *Aw2** (e) con temperatura media anual de 24°C y un promedio de precipitación pluvial anual de 1,500 mm (10,22)

Esta explotación está dedicada en un 75% a la producción de ganado de abasto, los animales son una cruce de las razas suizo y cebú adquiridas en su mayoría de otras explotaciones, el 25% restante proviene de pie de cría del propio rancho, que además está dedicado a la producción láctea.

El calendario de vacunación que se lleva a cabo contra carbón sintomático y edema maligno (bacterina doble), es el siguiente: los animales nacidos en el rancho son vacunados entre los 3 y los 6 meses sin tener precisa la edad debido a que no se lleva un registro de fechas de

*AW.- El más húmedo de los cálidos con lluvias en verano
 ** (e) El extremoso, oscilación entre 7 y 140°C .

nacimiento. Los animales provenientes de otras explotaciones, generalmente son heterogeneos en edad y peso. Se vacunan al llegar al rancho, aprovechando el manejo para desparasitar, administrar vitaminas A.D.E. y el baño de inmersión contra la garrapata; el mismo día son enviados a los potreros de engorda.

El Objetivo de este trabajo fue determinar mediante la prueba de Hemoaglutinación Pasiva (HAP) en microplaca, niveles de anticuerpos que puedan relacionarse con la inmunidad conferida por las bacterias contra Clostridium chauvoei y Clostridium septicum.

MATERIAL Y METODOS.-

* Método para la producción de toxoides.

Antígenos: Se elaboraron a partir de cepas de Cl. chauvoei y Cl. septicum, se sembraron en medio de caldo de hígado de res, se incubaron durante 6 días a 37°C -- rectificándose el pH a 7.4 y agregando 10 ml de solución -- estéril de glucosa al 1% cada 24 horas. Se agrego al cultivo formaol al 40% hasta alcanzar una concentración de -- 0.5% en el medio y se incubo a 37°C durante 72 horas para su inactivación, para clarificar el cultivo, se paso por un filtro de gasa y así eliminar las partes gruesas, se cen-- trifugo posteriormente a 2,500 r.p.m. durante 10 minutos - desechando la mayor parte de los cuerpos bacterianos, este líquido se empleo antígeno para sensibilizar los eritrocitos.

Preparación de los sueros hiperinmunes en conejos:

El esquema de inmunización que se efectuó para la producción de los sueros hiperinmunes fue el siguiente:

A 2 conejos machos raza Nueva Zelanda, clínicamente sanos, con un peso aproximado de 1.6 Kg. el día cero se les aplicó 1 ml. de la bacterina toxoide contra Cl.

*Técnica de producción de toxoide tetánico del Instituto de Higiene de la S.S.A. modificado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.N.A.M.

chauvoei por vía subcútanea, los días 7 y 14 se repitió la aplicación. El día 25 se exanguinaron en forma aséptica por punción cardica.

El suero hiperinmune contra Cl. septicum se preparó siguiendo el esquema anterior. Estos sueros se titularon para conocer su nivel de anticuerpos y se emplearon como controles positivos en la prueba.

Sueros Problema.-

Se obtuvieron al azar 100 muestras de sueros-sanguíneos de bovinos vacunados contra carbón sintomático y edema maligno en un rancho del Municipio de Tantoyuca, Ver., a los 90 días después de la vacunación.

20 sueros de bovinos clínicamente sanos y sin antecedentes de inmunización, proporcionados por la clínica de grandes especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Las muestras de suero de los animales vacunados y los sueros controles, se obtuvieron ascépticamente por punción de la vena yugular y se colectaron en tubos Vacutainer previamente identificados, se dejaron 2 horas a temperatura ambiente para que se formara el coágulo, el suero sobrenadante se decantó en frascos que se refrigera-

ron para trasladarse al laboratorio, en donde se centrifugaron para eliminar los glóbulos rojos, se envasaron y se congelaron a -18°C hasta su uso.

*La absorción de aglutininas inespecíficas de los sueros que se emplearon en la prueba, se realizó empleando la técnica descrita por Kwapinski (15).

Técnica de HAP en Microplaca.-

En 7 pozos de las placas de microtitulación se pusieron con una micropipeta 2 gotas de 25 microlitros de la solución PBS pH 7.2.

Con una asa microdiluidoras se transfirieron 50 microlitros de la dilución original 1:5 del suero al primer pozo de las microplacas y se mezcló quedando una dilución de 1:10.

A partir de la dilución 1:10 se hicieron diluciones dobles hasta el séptimo pozo eliminando los 50 microlitros de excedente, quedando en este pozo la dilución de suero 1:640; los microdiluidores que se usaron para efectuar las diluciones fueron lavados con agua destilada, alcohol y flameados para ser utilizados en la siguiente muestra de suero.

Realizadas las diluciones, con la ayuda de -

una micropipeta se agregaron a cada dilución de suero 50-- microlitros de glóbulos rojos sensibilizados.

Finalmente se mezclaron con el agitador vibratorio 2 minutos y se dejó la microplaca en reposo a temperatura ambiente para que se efectúe la reacción.

La lectura de la prueba se hizo en diferentes lapsos para determinar el tiempo óptimo en que se presentó la hemoaglutinación.

* Con los sueros hiperinmunes y los sueros de los animales no inmunizados se efectuaron diluciones como en las muestras anteriores y la aglutinación que se observó se tomó como un patrón para interpretar los resultados.

Control de Glóbulos Rojos.-

Se pusieron 50 microlitros de la solución de PBS pH 7.2 a 10 pozos de la microplaca y se le agregaron 50 microlitros de la suspensión de los glóbulos rojos sensibilizados.

Las pruebas se hicieron por duplicado para cada muestra de suero y así determinar errores en la dilución.

RESULTADOS:

Los resultados de las pruebas de hemoaglutinación pasiva efectuadas en los sueros de los diferentes grupos de animales, se anotan en los cuadros 1, 2 y 3.

CUADRO No. 1

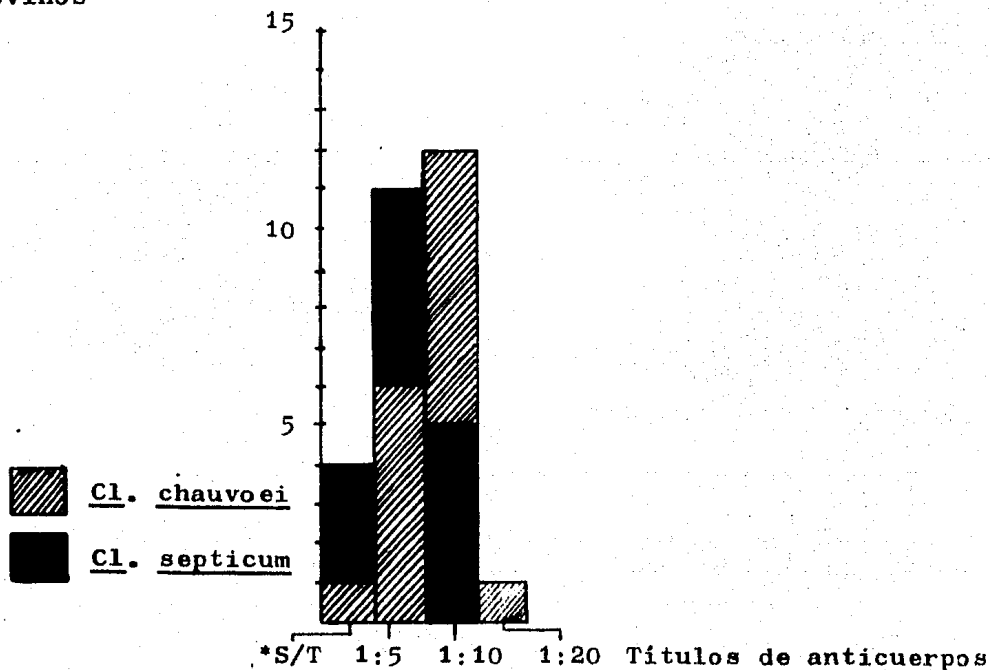
Sueros de conejos inmunizados con bacterina - toxoide:

	Antígeno <u>Cl. chauvoei</u>	Antígeno <u>Cl. septicum</u>
Suero anti <u>Cl. chauvoei</u>	1:640	1:20
Suero anti <u>Cl. septicum</u>	1:10	1:320

CUADRO No 2

Sueros de bovinos no inmunizados

Título de Ac.	Con antígeno de <u>Cl. chauvoei</u>		Con antígeno de <u>Cl. septicum</u>	
	No. de animales	%	No. de animales	%
S/título*	1	5%	4	20%
1:5	6	30%	11	55%
1:10	12	55%	5	25%
1:20	5	5%	0	0%

Titulación de anticuerpos en
sueros de bovinos no inmunizadosNo. de
Bovinos

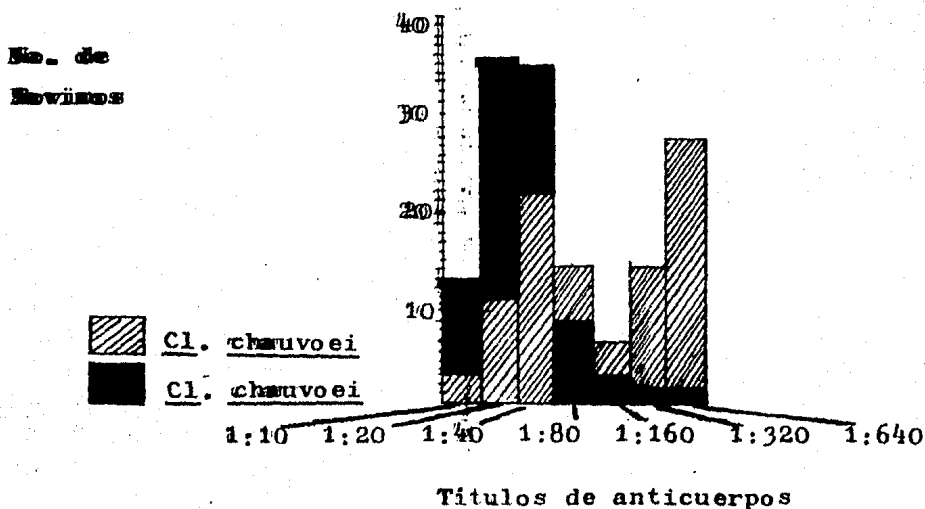
CUARDO No. 3

Suero de Animales Inmunizados:

No. de animales con títulos de Ig. conten Cl. Chauvoei y Cl. septicum.

Título de Ac.	Con Antígeno de <u>Cl. chauvoei</u>		Con Antígeno de <u>Cl. septicum</u>	
	No. de animales	%	No. de animales	%
1:10	3	3%	13	13%
1:20	11	11%	36	36%
1:40	22	22%	35	35%
1:80	14	14%	9	9%
1:160	7	7%	3	3%
1:320	14	14%	2	2%
1:640	29	29%	2	2%

Titulación de anticuerpos en sueros
de bovinos inmunizados.



DISCUSION.-

En los sueros de los conejos inmunizados con bacterina toxoide de Cl. chauvoei ó Cl. septicum, se determinaron mediante la prueba HAP niveles elevados de anticuerpos contra los antígenos homólogos, observándose reacciones inespecíficas hasta la dilución 1:20, debido a la presencia de determinantes antigénicos comunes en ambas clostridias.

En los sueros de los bovinos controles, sin inmunizar se encontró que el 95% y el 80% reaccionaron en forma inespecífica, con títulos inferiores a 1:20, contra los antígenos de Cl. chauvoei y Cl. septicum respectivamente, debido a que posiblemente han estado en contacto con los antígenos bacterianos de la flora normal del intestino y vías respiratorias, que comparten algún determinante antigénico con los clostridios, el resto de los animales 5 y 20% respectivamente no presentaron títulos detectables por esta prueba.

Los sueros de los bovinos inmunizados, mostraron una amplia variación en los niveles de anticuerpos contra antígenos de Cl. chauvoei; que van desde 1:10 el 3% hasta 1:640 el 29%. El 14% de estos mismos animales reveló títulos inferiores a 1:20, semejantes a los sueros de los animales sin inmunizar, esta situación puede deberse a

que el estímulo vacunal no fué efectivo y los anticuerpos detectados son de origen inespecífico.

Por otra parte, el 86% de los sueros mostraron títulos que varían desde 1:40 hasta 1:640. Lo que puede interpretarse como una buena respuesta de los bovinos a la inmunización, sin embargo, como los animales permanecen en el campo y no se efectúa un control de las inmunizaciones que se les aplican es posible que el grupo de animales que muestran títulos 1:40 a 1:160 hayan recibido una sola aplicación representando el 43%, las muestras que presentan títulos de 1:320 y 1:640 probablemente recibieron más de una inmunización produciendo respuesta anamnésica contra el antígeno, representando el 43% de los sueros restantes.

En los mismos sueros se encontró que los niveles de anticuerpos contra Cl. septicum tienen un patrón diferente. En el 49% de las muestras los títulos fueron inferiores a 1:20, esto puede deberse a que el producto inmunizante no contenga suficiente cantidad de elementos básicos para inducir una buena respuesta inmunológica que revele títulos altos mediante la prueba de HAP. El 51% de los sueros restantes presentaron títulos mayores de 1:40 a 1:160 probablemente provengan de animales que han recibido el primer estímulo vacunal. El 4% de las muestras restantes presentaron títulos de 1:320 y 1:640 que posiblemente-

En otros países en donde se han percatado del problema, se emplean como productos inmunizantes contra el carbón sintomático y edema maligno fundamentalmente bacterina toxoide (5)

En lo que concierne a la prueba de hemoaglutinación pasiva, se pudo llevar a cabo fácilmente, presentó una buena sensibilidad y aceptable especificidad. Esta -- prueba detectó anticuerpos que reaccionan contra antígenos solubles absorbidos o acoplados químicamente a los eritrocitos. En este trabajo los antígenos corresponden a las -- toxinas de los clostridias, ya que se eliminaron los cuerpos bacterianos y la sensibilización de glóbulos rojos tannados, se efectuó con los productos del metabolismo bacteriano presentes en la fase líquida del medio de cultivo. -- Esto hace pensar que las inmunoglobulinas detectadas corresponden a anticuerpos contra las toxinas de los gérmenes. Los resultados indican que la gran mayoría de los -- animales vacunados presentaron niveles muy bajos de este -- tipo de inmunoglobulinas, por lo tanto los productos inmunizantes comerciales inducen una baja respuesta inmune humoral.

correspondan a animales con una doble vacunación.

Estudios realizados en el Laboratorio de Serología del Depto. de Virología e Inmunología de esta Facultad, para comprobar la potencia de las bacterinas han demostrado que algunas de ellas confieren una baja inmunidad a los animales inoculados experimentalmente.*

En virtud de que el muestreo de los sueros se hizo en una población heterogénea de animales desde el punto de vista de edades y condiciones nutricionales, es posible que el sistema inmune de estos animales no responda -- adecuadamente, ya que cuando se aplica la bacterina generalmente han sido trasladado de los potreros a los corrales de manejo que se encuentran a grandes distancias; haciéndose en días calurosos e introduciéndose inmediatamente a la manga, sin considerar que se encuentran agitados, nerviosos y fatigados.

Las inmunoglobulinas que inducen una bacterina no protegen contra las infecciones naturales, por lo -- que es necesario entonces elaborar y aplicar una bacterina toxoide como producto inmunogénico que contenga una mayor proporción de toxoides, que estimule la producción de anticuerpos que neutralicen la acción de las toxinas responsables de la muerte de los animales.

*Comunicación personal Dra. Aurora Velázquez E.

CONCLUSION:

La prueba de hemoaglutinación pasiva fue útil para detectar inmunoglobulinas producidas por la inoculación de bacterinas comerciales.

En los sueros de los animales vacunados con productos comerciales y tomados al azar se encontró que hubo un 43% y 4% con títulos elevados de inmunoglobulinas -- contra Cl. chauvoei y Cl. septicum respectivamente.

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Blood, D.C. y Henderson, J.A.:
Medicina Veterinaria 4a. ed. español, pág. 339-344
Nueva Editorial Interamericana, Méx. 1975.
- 2.- Bowen, E.H. and Wyman L.:
The Flocculation Reaction
of Rabbit Antibody. J. Immunol 71:86-91 (1953)
- 3.- Boyden, S.V.: Fixation of Bacterial productos by erythrocytes treated with tannic acid and subsequent Hemoagglutination by antiprotein sero. J. Exper med. 93: 107. (1951)
- 4.- Carter, G.R.: Outline of Veterinary Bacteriology and Micology 28-30. 1973
- 5.- Claus, D.K. and Macheak, M.E.:
Preparation of a Clostridium chauvoei antigen and determination of productive immunity by Plate Agglutination test.
Amer. J. Vet. Res. 33:1045-1052. (1972)
- 6.- Cottral, G.E.: Manual of Standardised methods for Veterinary Microbiology
Cornell University Pres. 509-525. 1978
- 7.- Curso de Actualización en Inmunoparasitología Veterinaria.
Memorias. Ciudad Universitaria. 1980
- 8.- Fudenberg, H.H. Stiles, P.D.
Caldwell, L.J. y Wells, V.J.:
Inmunología Clínica 3a. Ed.
Editorial El Manual Moderno
382-383. 1982
- 9.- Fudenberg, H.H. Stites, P.D.
Caldwell, L.J. and Wells V.J.:
Basic & Clinical Immunology
Los Altos, California 94022
Lange Medical Publications
2a. Ed. 367-368. 1978

- 10.- García, E.: **Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Koppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana).** Carta de Climas. Pachuca. UNAM. México. 1973
- 11.- Hagan, W.A., Bruner, D.W., Gillespie, J.H. and Timoney, F.J.: **Infectious Diseases of Domestic Animals.** Cornell University Press USA. 216-219. 1981
- 12.- Hutyra, F., Marek, J. y Manniger, R.: **Patología y Terapéutica Especiales de los animales domésticos.** Tomo I, 3a. Ed. Editorial Labor 24-32. 1973
- 13.- Jawetz, E., Melnick, L.J. y Adelberg, A.E.: **Manual de Microbiología Médica** 8a. Ed. Editorial El Manual Moderno 224-226. 1979
- 14.- Jensen, R. and Mackey, D.R.: **Diseases of Leedlot Cattle** Lea and Lebigier Philadelphia USA. 118-123. 1979
- 15.- Kwapinski, J.B.: **Methods of Serological Research** John Willey and Sons New York, London, Sydney 205-220. 1965
- 16.- Martínez, Conde, J.M.: **Guía del inspector Veterinario Titular** 2- **Epizootiología y Zoonosis** 1a. Ed. Editorial Aedos. 157-161. 1975.
- 17.- Merchant, I.A. y Rocker R.A.: **Bacteriología y Virología** 3a. ed. española Ed. Acribia. 411-416. 1975
- 18.- Mims, C.A.: **The patogenesis of infectious disease** Academic Press Harcourt Brace Janoich. London 167-169. 1982
- 19.- N. Acha. Pedro and Szyfres, B.: **Zoornoses and Communicable**

Diseases Common to man and animals
Pan American Health Organization
54-56. 1980

- 20.- Prontuario de especialidades
Veterinarias 7a. edición.
Centro Profesional de Publicaciones,
S.A. México, D.F. 1982
- 21.- Secretaría de Agricultura y Recursos
Hidráulicos. Requerimientos Mínimos
de Calidad que deberan llenar los --
productos biológicos para uso veterinario.
Subsecretaría de Ganadería. Departamento
de Control de Medicamentos. 1977
- 22.- Secretaría de Programación y Presupuesto
DETENAL. Instructivo para la interpreta
ción y uso de las Cartas de Climas.
34-36. 1978
- 23.- Seminario de Clostridiosis
México, D.F. 1978
- 24.- Stavistky, B.A.: Hemagglutination
with tannic acid treatte (Tanned)
Erythrocytes in: Methods in Immunology
and Immunochemistry.
Ed. C.A. Williams y M.W. Chose Vol. IV
30-41. 1977
- 25.- Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria
2a. Edición en Español.
Ed. Interamericana
211-213. 1984
- 26.- Vargas, L.J.: Análisis Epizootiológico
de las Gangrenas Gaseosas en México VI
Reunión de Sanidad Animal.
Dir. Gral. de Sanidad Animal. 1977.