

01672
16
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION
BACTERIOLOGICA DE CLOSTRIDIOS
PRODUCTORES DE MIOSITIS EN EL
NORESTE DE MEXICO**

T E S I S

PRESENTADA PARA LA OBTENCION
DEL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

P R E S E N T A :

CARLOS RAMIREZ PFEIFFER



Asesores: M.V.Z. MC. PhD. Francisco Suárez Güemez
M.V.Z. Cip. Bact. PhD. Ricardo Flores Castro

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DICIEMBRE 1990



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.

LISTA DE CONTENIDO

		<u>página</u>
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA A INVESTIGAR ..	1
1.2	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
1.2.1	GENERALIDADES	4
1.2.2	CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS DE ACUERDO A SU REQUERIMIENTO DE OXÍGENO ...	6
1.2.3	MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS DE ESTUDIO DE LAS MIOSITIS CLOSTRIDIALES	8
1.2.3.1	Sistemas de cultivo anaeróbicos	8
1.2.3.2	Agentes reductores	10
1.2.3.3	Medios de cultivo	12
1.2.3.4	Aditivos para medios de cultivo	12
1.2.3.5	Agentes selectivos	13
1.2.4	MORFOLOGÍA, CARACTERÍSTICAS TINTORIALES Y DE CULTIVO	15
1.2.5	NATURALEZA Y ACTIVIDAD DE LAS TOXINAS DE LOS CLOSTRIDIOS PRODUCTORES DE MIOSITIS .	19
1.2.5.1	Características de las toxinas	19
1.2.5.2	Antígenos somáticos, flagelares y actividad antigénica de las toxinas	21
1.2.6	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LAS MIOSITIS CLOSTRIDIALES	30
1.2.6.1	Habitat	30
1.2.6.2	Distribución de las miositis clostridiales en México	36
1.2.7	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y LESIONES DE LAS MIOSITIS CLOSTRIDIALES	39

1.2.8	DIAGNÓSTICO POR MEDIOS BACTERIOLÓGICOS, INMUNOFLORESCENCIA Y CROMATOGRFÍA DE GASES	47
1.2.8.1	Colección y transporte de la muestra	47
1.2.8.2	Diagnóstico bacteriológico	49
1.2.8.3	Diagnóstico por inmunofluorescencia.....	51
1.2.8.4	Diagnóstico por medio de cromatografía de gases	52
1.2.9	CONTROL DE LAS MIOSITIS CLOSTRIDIALES ...	53
2	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	56
2.1	PREPARACIÓN DEL CUADRO DE IDENTIFICACIÓN.	56
2.2	ESPACIO Y TIEMPO MUESTRALES	57
2.3	MATERIAL Y MÉTODOS	57
2.3.1	REQUERIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS	58
2.3.2	REQUERIMIENTOS INSTRUMENTALES	58
2.4	METODOLOGÍA	59
2.4.1	OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS	59
2.4.2	TÉCNICA DE CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLOSTRIDIOS PRODUCTORES DE MIOSITIS	60
2.4.2.1	Técnicas de cultivo y aislamiento de Clostridios	60
2.4.2.2	Pruebas bioquímicas para la determinación de especies	61
2.4.2.3	Lectura de las pruebas bioquímicas	61
2.4.2.3	Interpretación de las pruebas bioquímicas	63
3.0	RESULTADOS	64
3.1	RESULTADOS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS	64

3.2	RESULTADOS DE LOS EXAMENES BACTERIOLÓGICOS	67
3.2.1	MUESTRAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN	71
3.2.2	MUESTRAS DEL ESTADO DE COAHUILA	74
3.2.3	MUESTRAS DEL ESTADO DE TAMAULIPAS	75
3.3.4	MUESTRAS SIN CLASIFICACION GEOGRÁFICA....	76
4	DISCUSIÓN	78
4.1	DISCUSIÓN SOBRE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS .	78
4.2	DISCUSIÓN SOBRE LA COLECCIÓN, ENVÍO Y PROCESO DE LAS MUESTRAS.....	82
4.3	DISCUSIÓN SOBRE LOS AISLAMIENTOS	84
5	CONCLUSIONES	89
6	APÉNDICE	91
6.1	MEDIOS DE CULTIVO	91
6.2	COMPONENTES REACTIVOS Y SUSTRATOS	93
7	LITERATURA CITADA	97

LISTA DE CUADROS

<u>Quadro</u>		<u>página</u>
1.1	Clasificación de las Clostridiasis	5
1.2	Modo de Producción de las Toxinas Letales de Algunos Clostridios Patógenos	19
1.3	Toxinas Letales Clostridiales Según su Actividad al ser Producidas	20
1.4	Toxinas Producidas por <u>Clostridium chauvoei</u> y su Relación Antigénica con otras Toxinas	23
1.5	Toxinas Producidas por <u>Clostridium septicum</u> y su Relación Antigénica con otras Toxinas	25
1.6	Toxinas Producidas por <u>Clostridium sordellii</u>	26
1.7	Toxinas Producidas por <u>Clostridium novyi</u>	27
1.8	Propiedades de las Toxinas de <u>Clostridium histolyticum</u>	29
1.9	Prevalencia de Clostridios Patógenos en Suelos (%).....	30
1.10	Presentación de Clostridios Patógenos en Miositis	36
1.11	Clostridios Patógenos Aislados en México (1975-1977)	37
1.12	Enfermedades Producidas por Clostridios Productores de Miositis	39
3.1	Identificación de Clostridios Productores de Miositis	66
3.2	Origen de las Muestras Negativas y No Procesadas	67
3.3	Origen de los Aislamientos	68
3.4	Significancia Nosológica de Aislamientos de <u>Clostridium</u>	69

3.5	Frecuencia y Origen de los Aislamientos de los "Clostridios Productores de Miositis" ...	69
3.6	Frecuencia de Aislamientos de "Clostridios No Productores de Miositis".....	70
3.7	Frecuencia de Cultivos y Mixtos de Clostridios	70
3.8	Frecuencia de Aislamientos Diferentes a <u>Clostridium</u>	71
3.9	Origen de las Muestras Recibidas de Nuevo León	72
3.10	Origen de los Aislamientos de Clostridios "Productores de Miositis" de Nuevo León ...	72
3.11	Origen de los Aislamientos de Clostridios "No Productores de Miositis" de Nuevo León	73
3.12	Origen de los Aislamientos Diferentes a <u>Clostridium</u> del Estado de Nuevo León	73
3.13	Origen de las Muestras No Procesadas y "Negativas" del Estado de Nuevo León	74
3.14	Origen y Significancia Nosológica de los Aislamientos de Clostridios de Coahuila ...	74
3.15	Origen de las Muestras de Tamaulipas	75
3.16	Origen y Significancia Nosológica de los Clostridios de Tamaulipas	76
3.17	Aislamientos de Clostridios de las Muestras Sin Clasificación y su Significancia Nosológica	77

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

Los brotes de enfermedades del complejo de las miositis clostridiales afectan con cierta periodicidad a bovinos, caprinos y ocasionalmente a ovinos, infligiendo pérdidas económicas severas a la ganadería mundial, lo cual repercute en el rendimiento de las explotaciones pecuarias.

En México, Vargas (67) calculó las pérdidas producidas por estas enfermedades en 480,000 dolares americanos anuales de 1972 a 1977. Más tarde, un estudio realizado por el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP), y la Dirección General de Sanidad Animal (68), señala que las enfermedades que afectaban con mayor frecuencia a la ganadería productora de carne en México en 1985, eran brucelosis, pasteurelisis bovina, carbón sintomático, antrax, abortos y rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR); mientras que la ganadería productora de leche era afectada con mayor frecuencia por brucelosis, carbón sintomático, pasteurelisis, abortos, IBR, tricomoniasis y vibriosis, y menciona que la mastitis y la pododermatitis tenían alta incidencia.

De acuerdo a la literatura (59), las clostridiasis pueden ser prevenidas eficazmente por algún tipo de inmunógeno, siempre que cumplan los requisitos de control de calidad mínimos necesarios para todo biológico, así como una buena conservación y que su aplicación sea contra los gérmenes presentes en la región, lo que implica que debe

existir un diagnóstico etiológico.

La información que se tiene sobre la distribución de las especies de Clostridium productoras de miositis en México es escasa. En el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, desde hace años se sabe que a pesar realizarse vacunaciones cada 4 o 5 meses en algunas explotaciones éstas no son efectivas y si aumentan el costo de producción en las ganaderías afectadas, ya que las pérdidas ocasionadas por estas enfermedades en las explotaciones ganaderas persisten.

Por otro lado, Seifert y col. (51), mencionan que en el Noreste de México, a pesar de que se realizan inmunizaciones repetidas con vacunas introducidas ilegalmente de los Estados Unidos, no se logra una inmunización efectiva.

El propósito principal de este trabajo fue identificar por medios bacteriológicos las especies de clostridios "productores de miositis" presentes en el Noreste de la República Mexicana, considerando como "clostridios productores de miositis" a los siguientes (60):

C. chauvoei

C. septicum

C. sordellii

C. novyi tipos A y B

C. histolyticum

Así mismo dada la disparidad encontrada en el criterio de diferentes autores respecto a la identificación

de los clostridios productores de miositis por medio de pruebas bioquímicas, un objetivo secundario de este trabajo fue integrar el criterio de dichos autores en un Cuadro de Identificación, que permitiera identificarlos.

1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.2.1 GENERALIDADES

De acuerdo con Sterne y Batty (59), los animales domésticos, aun cuando se encuentren en las mejores condiciones posibles, viven constantemente expuestos tanto a microorganismos del suelo, como a los de sus propias excretas, a un grado que el hombre sólo experimenta cuando la guerra o algún desastre han roto la organización social. Entre esos microorganismos se incluyen los clostridios patógenos, cuyo habitat es el suelo y la excreta de los animales y el hombre, por lo que al estar en contacto con ellos, los animales pueden sufrir con más frecuencia de enfermedades producidas por diferentes especies de clostridios patógenos como, enterotoxemias, hepatitis necrótica, hemoglobinuria bacilar, tétanos, botulismo y miositis clostridiales.

En general, las clostridiasis debido a la ubicuidad de sus agentes etiológicos, a las peculiaridades de esa ubicuidad y a la necesidad de la intervención de algunos factores predisponentes para su aparición, tienen tres caracteres epizootiológicos comunes (57):

- a) diseminación universal
- b) no transmisibilidad por contacto y,
- c) incidencia esporádica.

Sterne (60) divide a las clostridiasis en tres grupos de acuerdo a las principales manifestaciones y órganos afectados, como se ve en el Cuadro No. 1.1, el grupo de las

enterotoxemias comprende a las condiciones que afectan el tracto intestinal y órganos parenquimatosos. El grupo de las intoxicaciones neurotrópicas incluye a las enfermedades en que se involucra principalmente el sistema nervioso. Y el de las miositis clostridiales, a aquellas enfermedades en que predomina la mionecrosis, con toxemia y formación de gas.

Cuadro No. 1.1	
Clasificación de las Clostridiasis*	
Grupo	clostridios involucrados
Enterotoxemias	<u>C. perfringens</u> tipos A, B, C, D
	<u>C. novyi</u> tipo B, D
	<u>C. septicum</u>
	<u>C. sordellii</u>
Intoxicaciones neurotrópicas	<u>C. botulinum</u> tipos A, B, C, D, E, F, G
	<u>C. tetani</u>
Miositis o Gangrenas gaseosas	<u>C. chauvoei</u>
	<u>C. septicum</u>
	<u>C. sordellii</u>
	<u>C. novyi</u> tipo B
	<u>C. perfringens</u> tipo A
	<u>C. histolyticum</u>

* Tomado y modificado de Sterne, M. I. Br. Vet. J. 137,5:443-453, (1981).

1.2.2 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS DE ACUERDO A SU REQUERIMIENTO DE OXÍGENO

Smith (53), describe lo siguiente: "Al principio, todo el mundo era anaeróbico, hace unos 5,000 millones de años cuando el mundo se había enfriado, las rocas al solidificarse producían gases similares a los que actualmente se obtienen de los volcanes... No existía oxígeno libre, la atmósfera era reducida, al igual que la superficie de la tierra. Además carecía de capa de ozono que absorviera las ondas ultravioletas cortas del sol... La combinación de ondas cortas, radiación de alta energía y una atmósfera rica en dióxido de carbono, amonio y vapores de agua, produjo compuestos orgánicos simples, los aldehidos y las cetonas, y posteriormente al polimerizarse, la primera forma viviente... Después, hace unos 3,000 millones de años, en algún mar, los elementos hidrógeno, oxígeno y nitrógeno se expresaron lentamente, y el ozono comenzó a acumularse en las capas altas de la atmósfera, lo que permitió aproximadamente 1,000 años después la evolución de plantas fotosintéticas y algas, así como algunas criaturas unicelulares que utilizaban el oxígeno como aceptor final de electrones".

Actualmente, las bacterias se dividen con base a su necesidad o sensibilidad al oxígeno en varios grupos (36), en:

a) "aerobios obligados", como las micobacterias y otros organismos que tienen el oxígeno gaseoso como un requerimiento absoluto y no crecen en su ausencia, ya que el oxígeno es el aceptor final de electrones de su metabolismo.

b) "microaerofilicos: como Brucella abortus y Campylobacter, los cuales crecen en medios de cultivo con baja tensión de oxígeno, o bien bajo la superficie de medios líquidos.

c) "facultativos", por ejemplo: Escherichia coli, la cual crece en presencia o ausencia de oxígeno.

d) "aerotolerantes", como Clostridium tertium y algunos peptoestreptococos, son esencialmente anaerobios que crecen lentamente en la superficie de medios de cultivo sólidos recién preparados, como agar sangre, pero que lo hacen más rápido y mejor en forma anaeróbica.

e) "anaerobios obligados" o simplemente "anaerobios", organismos que no pueden crecer en presencia de oxígeno.

Aunque la mayoría de las bacterias se ajustan a esta clasificación (55), existen excepciones, como algunos peptoestreptococos, que crecen en primoaislamiento en forma anaeróbica pero en subcultivos pueden crecer aeróbicamente. Por otro lado, el Clostridium perfringens, así como otros anaerobios tienen un metabolismo vigoroso que les permite reducir la columna completa de medios líquidos que se han agitado cuando su crecimiento se ha iniciado y crecen en la superficie de medios líquidos que se han agitado, pero no pueden hacerlo en la superficie de medios sólidos expuestos al oxígeno.

1.2.3 MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS DE ESTUDIO DE LAS MIOSITIS CLOSTRIDIALES.

1.2.3.1 Sistemas de cultivo anaeróbicos

La mayoría de las jarras anaeróbicas son modificaciones a la diseñada por MacIntosh y Fildes en 1916 (37). Son básicamente recipientes cilíndricos cerrados herméticamente, en uno de los cuales el aire puede ser evacuado mecánicamente y reemplazado por otro gas o una mezcla de ellos, esta operación se repite tres veces para asegurar el intercambio de gases. Mientras que en el otro sistema el oxígeno se elimina en forma química, por medio de sobres generadores de hidrógeno y bioxido de carbono como los desarrollados por Brewer y col (7). En ambos casos, por último se remueven los vestigios de oxígeno que hayan quedado con ayuda de un catalizador situado dentro de la jarra. El catalizador ayuda en la reacción del oxígeno que se encuentra dentro de la jarra con el hidrógeno que se introduce, de la siguiente forma:

$$H_2 + O_2 \rightarrow H_2O$$
, y al no quedar oxígeno libre la atmósfera se vuelve anaeróbica (7).

Los gases que se emplean comúnmente son hidrógeno, nitrógeno y bioxido de carbono, o bien una mezcla de ellos, como 10% de bioxido de carbono, 10% hidrógeno y 80% nitrógeno (59). Los catalizadores que se emplean actualmente son de tipo frío y no requieren de corriente eléctrica para activarse, consisten en pequeñas barras de aluminio cubiertas de paladio, que están contenidas en una malla de alambre

sujeta a la parte inferior de la tapa de la jarra.

Los catalizadores se inactivan al ser expuestos a gases como cloro, bióxido de sulfuro, monóxido de carbono y sulfuro de hidrógeno, siendo este último especialmente problemático ya que muchos gérmenes anaeróbicos liberan cantidades importantes de él, especialmente a partir de medios líquidos (55). Así mismo se inactivan por aceites, vapores orgánicos y ácidos fuertes, así como por humedad, la cual es muy alta dentro de la jarra, debido a lo cual deben reactivarse antes de reutilizarse, para esto se calientan en un horno a 160 - 170 C, durante 2 horas (28, 73) y se almacenan en tubos cerrados herméticamente, en lugares secos y calientes.

Para todos los tipos de jarras anaeróbicas es una práctica común incluir dentro del sistema indicadores de anaerobiosis que permiten verificar el desarrollo y mantenimiento de las condiciones anaeróbicas. El azul de metileno se considera en general útil para esto, ya que al ser colocado dentro de una jarra se reduce, cambia de su forma coloreada azul a un compuesto químicamente leuco, incoloro (73), sin embargo, debido a que no es un indicador absoluto de anaerobiosis, es necesario reducirlo por medio de calentamiento antes de utilizarlo, de otra forma es posible que se vuelvan incoloros, aunque las condiciones de anaerobiosis dentro de la jarra no sean las adecuadas (28). El indicador de anaerobiosis que se utiliza en forma generalizada consiste una solución de azul de metileno con hidroximetil amino metano y dextrosa (TRIS), que es posible

obtenerla comercialmente en forma reducida contenida en una bolsa de teflón permeable al oxígeno.

1.2.3.2 Agentes reductores

Los agentes reductores son empleados en la bacteriología de anaerobios para obtener medios de cultivo que tengan las condiciones para permitir el crecimiento satisfactorio de gérmenes anaerobios estrictos y no porque les sean necesarios. Entre ellos está el ácido tioglicólico o su sal de sodio, que se utilizan en concentración de 0.01 a 0.2 %, tiene la desventaja de inhibir el crecimiento de varios clostridios y de volverse gradualmente tóxico a una variedad de anaerobios durante su crecimiento (67).

Otro agente reductor empleado es la glucosa, la cual se incorpora al medio de cultivo en proporción de 0.5 a 1.0 %, es un buen reductor, no es tóxico y sirve como nutriente adicional para el crecimiento de bacterias; sin embargo, Sterne y Batty (59) mencionan que no se debe emplear en cultivos que se vayan a mantener por más de 2 semanas, ya que si fermentan la glucosa, se acidifica el medio y se puede lograr una esterilización del mismo.

El ácido ascórbico se puede emplear en concentración de 0.1 %, en lugar del tioglicolato de sodio al realizar cultivos de bacterias por el método "deep pour" (72), el cual era empleado como medio de cultivo anaeróbico antes del desarrollo de las jarras anaeróbicas.

La cisteína es un agente reductor, se utiliza en

concentraciones no mayores de 0.05 % en medios de cultivo sólidos o líquidos (73), se considera mejor que el tioglicolato de sodio (27). Moore (38), demostró la naturaleza esencial de la cisteína-L, para lograr el crecimiento de C. novyi tipo B en la superficie de medios sólidos, y puso atención a la importancia de la protección que otorga la cisteína contra la oxidación atmosférica.

El hierro metálico puede ser empleado como agente reductor en medios líquidos (59) y sólidos. Les provee condiciones de adecuadas para favorecer y lograr el crecimiento de anaerobios estrictos (10). Hayward y Miles (25), mencionan el uso de tachuelas o clavos pequeños esterilizados en flama antes de ser añadidos a los medios de cultivo estériles. Al ser espolvoreado sobre inóculos de C. novyi tipos B, C o D, se observa que crecen alrededor de las partículas de hierro en forma de satélites (10), aunque parece ser que este efecto está restringido a estos organismos (69).

El medio carne cocida, o medio de Robertson, fue desarrollado en 1915-1916 (44), es ampliamente utilizado para cultivos de anaerobios debido a que los tejidos musculares tienen sustancias reductoras, especialmente glutatión, que permiten el crecimiento de anaerobios estrictos, sin la aplicación de otros métodos anaeróbicos (73).

En la producción de vacunas y esporas de diferentes especies de clostridios para ser utilizadas como cepas desafío, así como en la producción de biológicos se utilizan medios suplementados con hígado o con sus extractos, cisteína

y carne (2, 24, 31). Aunque se ha visto que las bacterinas producidas agregando además carne al medio son más eficaces (35).

1.2.3.3 Medios de cultivo

La preparación de medios de cultivo para anaerobiosis, tanto sólidos como líquidos, es similar a la de medios de cultivo de uso general, pero se deben evitar aereaciones innecesarias, tanto durante la preparación, como durante el mantenimiento previo a la inoculación, por lo que éste debe ser lo más corto posible. Los medios sólidos se pueden almacenar en refrigeración dentro de jarras de contención con atmósfera anaeróbica ("holding jar"), mientras que los líquidos en tubos tapados herméticamente a temperatura ambiente sin luz directa.

En el caso de medios líquidos, es conveniente utilizar agar en concentración de 0.1 a 0.5 %, para disminuir la convección del medio y ayudar a mantener el medio en condiciones óptimas.

1.2.3.4 Aditivos para medios de cultivo

a.- Indicadores de pH.- En general, se utiliza el azul de bromotimol como indicador de pH para hacer las lecturas de las pruebas de fermentación, aunque para esto es posible hacer uso de potenciómetros. Deben ser agregados al medio después del periodo de incubación, ya que la mayoría son reducidos, bajo condiciones de anaerobiosis, a la forma leuco incolora (73).

B.- Indicadores de anaerobiosis.- La rezasurina, se utiliza en forma rutinaria para medios de cultivo líquidos, ya que en condiciones de anaerobiosis es incolora, y torna a rosa en presencia de trazas de oxígeno.

C.- Sangre.- Para preparar gelosa sangre o gelosa chocolate, se recomienda el uso de sangre de bovino, oveja o conejo, en concentraciones de 5 % aproximadamente. La sangre de caballo no es útil para observar la hemólisis producida por C. chauvoei, ya que sus eritrocitos no son atacados por su hemolisina (3). Sin embargo, la adición de cloruro de calcio en concentraciones finales de 0.5 % aumenta el desarrollo de la hemólisis producida por cepas de C. perfringens (73).

D.- Yema de huevo.- Se usa para preparar el agar yema de huevo, medio que es útil para observar reacciones debidas a la producción de lecitinasa y de lipasa, y para realizar la prueba de ureasa y la de catalasa sobre las colonias que hayan crecido después de la incubación (73).

1.2.3.5 Agentes selectivos

Los agentes selectivos se utilizan para facilitar el aislamiento de bacterias (59) deseadas a partir de muestras en que existe una combinación con otras indeseadas, algunos son más útiles que otros, pero ninguno es ideal, por lo que nunca se recomienda utilizarlos en sustitución de los métodos de rutina. Dentro de los más utilizados estan:

-La azida de sodio (0.02%), se recomienda

utilizarlo junto con sulfato de neomicina (150 mg/ml), para el cultivo selectivo de clostridios histotóxicos en medios sólidos (18).

- La neomicina, para el aislamiento de clostridios (72).

- El sulfato de estreptomina, también ha sido utilizado para el aislamiento de clostridios (71).

1.2.4 MORFOLOGÍA, CARACTERÍSTICAS TINTORIALES Y DE CULTIVO

El género Clostridium reúne a aquellos bastones anaerobios, gram positivos, formadores de endosporas, catalasa negativos (12, 28, 54).

Las características morfológicas de los clostridios, como son la forma y localización de la espora, a menudo han sido utilizadas como elementos importantes para ayudar a diferenciar entre especies de clostridios, sin embargo, ésto se debe tomar con cuidado, ya que en algunos cultivos se pueden observar tanto cepas con esporas subterminales como realmente terminales (53). Se considera (55) que para su observación las tinciones especiales de esporas son solamente poco mejores que la tinción de gram y que la microscopía de contraste de fases es excelente cuando las esporas se encuentran maduras, pero cuando son inmaduras y poco refractantes, la tinción de gram es mejor.

Algunas cepas no forman esporas en forma apreciable, a menos que se utilicen medios especiales, ésto sucede con el C. perfringens y C. paraperfringens (54), mientras que otras las forman lentamente y para lograrlo requieren ser estimuladas por medio de "choques" térmicos, calentando los cultivos de 70 a 80 C por 10 minutos e incubándolas a 30 C en una atmósfera de 10% de bióxido de carbono. Este proceso se sigue también para recuperar cepas de clostridios a partir de cultivos viejos (55).

Clostridium perfringens (C. welchi)

Este germen mide de 1 a 1.8 micras de ancho por 4 a 10 de largo, aunque puede presentar formas cocoides o elongadas (12). Sus esporas son rara vez observadas en cultivos, aproximadamente tres cuartas partes de las cepas tienen esporas demostrables con tinta china (59). Cuando ocurren son de forma oval y de posición subterminal, aunque en ocasiones se observan en posición central. Se han descrito medios especiales para lograr su esporulación, sin embargo, estas esporas, así como las cepas recuperadas a partir de muestras clínicas, pasan rápidamente a la forma vegetativa en 4 a 6 horas al ponerse en cultivos a 37 C, característica que se aprovecha para lograr su aislamiento. De hecho, este clostridio es probablemente el anaerobio más fácil de aislar (59) y de más rápido crecimiento, ya que tiene un tiempo de generación de 10 minutos a 45 C, en un pH 7.0 (55, 73).

Las características morfológicas de las colonias de este microorganismo después de una incubación de 12 a 18 horas en agar sangre son: colonias de uno a tres milímetros de diámetro, bajas, convexas, semiopacas o brillantes, con bordes enteros, muestran una doble zona de hemólisis, una completa debida a la toxina theta y una más extensa ocasionada por la toxina alfa (55).

Clostridium chauvoei (C. fesi)

Esta bacteria es un bastón gram positivo, que en la fase logarítmica de crecimiento es marcadamente pleomórfico, mide de 3 a 8 micras de longitud por 0.6 a 0.8

de ancho. Forma esporas ovales, con posición central o subterminal (12). Las colonias que produce en agar sangre son, de muy pequeñas a 3 mm de diámetro, redondas, crateriformes, de color gris neutro y generalmente muestran una zona de hemólisis completa (55).

Clostridium septicum

Las bacterias que conforman esta especie son bastones gram positivos en la fase logarítmica de crecimiento, pleomórficos, pueden volverse filamentosos si se encuentran factores inhibidores en el medio. Las esporas que forman son ovales y subterminales. Las colonias en agar sangre con 14 a 16 horas de incubación son grisáceas, irregulares, con crecimiento en oleadas ("swarm"), y pueden mostrar una zona de hemólisis de hasta 4 mm de diámetro (12).

Clostridium novyi tipos A y B

Esta especie comprende a bastones de 4 a 8 micras de longitud por una de ancho, son gram positivos en cultivos jóvenes, forman esporas ovales y subterminales. Después de 24 horas de incubación, las colonias casi nunca son aparentes, a las 48 horas, miden de 2 a 4 mm de diámetro son elevadas, irregulares, con bordes enteros, con una zona de hemólisis incompleta de aproximadamente 8 mm de diámetro (12).

Clostridium histolyticum

Este germen mide de 4 a 8 micras de longitud, por 1 de ancho, es gram positivo en cultivos jóvenes, forman

esporas ovales y subterminales rápidamente. Se observa pleomórfico en cultivo, pero no en impronta de tejido afectado. Muestra dos tipos de colonias, unas lisas y traslúcidas de 0.1 a 1 mm de diámetro, incoloras o blanquecinas, y otras rugosas, muy similares a las del C. sporogenes (55).

Clostridium sordellii

Esta bacteria tiene las puntas redondeadas, mide de 2 a 4 micras de largo por 1 de ancho, forma esporas ovales centrales o subterminales (55). Sus colonias miden de 2 a 5 mm y muestran ramificaciones que se extienden sobre la estria del asa, su apariencia variable, se observan desde semiopacas y grisaseas, a blancas y opacas mientras avanza la esporulación (12).

1.2.5 NATURALEZA Y ACTIVIDAD DE LAS TOXINAS DE LOS CLOSTRIDIOS PRODUCTORES DE MIOSITIS

1.2.5.1 Características de las toxinas

Todos los clostridios patógenos producen toxinas, pero no todas de la misma forma, se puede decir que todas son exotoxinas, ya que se producen en el interior de la célula y no forman parte de la pared celular, como las endotoxinas. Algunas, llamadas "toxinas exocelulares", difunden a través de la pared celular y se encuentran en mayor cantidad al final del periodo logarítmico de crecimiento. Y otras, que no difunden a través de la pared celular y son liberadas al producirse la lisis de la célula, son llamadas "toxinas protoplasmáticas" (53). En el Cuadro 1.2, se puede observar el modo de producción de toxinas letales de algunos clostridios patógenos.

Cuadro No 1.2			
Modo de Producción de Toxinas Letales de Algunos Clostridios Patógenos*			
toxinas exocelulares		toxinas protoplasmáticas	
especie	toxinas	especie	toxinas
<u>C. perfringens</u>	alfa, beta, épsilon, iota	<u>C. botulinum</u>	todas
<u>C. septicum</u>	alfa	<u>C. tetani</u>	todas
<u>C. novyi</u>	beta, gamma	<u>C. novyi</u>	alfa
<u>C. haemolyticum</u>	beta		
<u>C. chauvoei</u>	todas		
<u>C. sordellii</u>	todas		
<u>C. histolyticum</u>	alfa, beta		

* Adaptado de Smith, L. DS., Holdeman, L. V. 1968, pp 194

Por otro lado, como se observa en el Cuadro No. 1.3, las toxinas pueden ser sintetizadas por la célula en forma activa o inactiva, siendo éstas las que requieren de enzimas proteolíticas para su activación, y para ser demostradas se añaden enzimas, como la tripsina, al medio de cultivo; aunque en ocasiones no es necesario agregarlas, debido a que el mismo organismo las produce y la activación se lleva a cabo, aunque sea en forma parcial (53).

Por tal motivo, para probar la toxicidad de cepas desconocidas y activar las prototoxinas que pudieran estar presentes, se utilizan cultivos con 8 o 12 horas y con 3 a 5 días de incubación a los que se les agrega tripsina. Siendo este tiempo de incubación y la concentración de tripsina factores importantes para la realización de la prueba, ya que las toxinas también pueden ser inactivadas por enzimas proteolíticas (53).

Cuadro No 1.3			
Toxinas Letales Clostridiales Según su Actividad al ser Producidas*			
Totalmente activas		prototoxinas	
especie	toxinas	especie	toxinas
<u>C. perfringens</u>	alfa, beta	<u>C. perfringens</u>	épsilon, iota
<u>C. novyi</u>	alfa, beta	<u>C. botulinum</u>	todas
<u>C. haemolyticum</u>	beta	<u>C. tetani</u>	
<u>C. septicum</u>	alfa		
<u>C. histolyticum</u>	alfa, beta		
<u>C. sordellii</u>	?		

* Adaptado y modificado de Smith, L. DS., Holdeman, L. V. 1968, pp 194.

La mayoría de las toxinas producidas por diferentes especies de clostridios, son específicas para sus antitoxinas

(53) ó antisueros, sin embargo, existe neutralización de la toxina del C. chauvoei, por antisueros del C. septicum, además de la producida por antisueros del mismo C. chauvoei. Asimismo la antitoxina alfa del C. septicum y la del C. histolyticum se relacionan antigénicamente.

1.2.5.2 Antigenos somáticos, flagelares y actividad antigénica de las toxinas.

Clostridium perfringens (C. welchi)

El C. perfringens, se clasifica para su estudio en cinco serogrupos de acuerdo a las toxinas más importantes que produce (53, 59, 73), mismas que se denominan alfa, beta, épsilon e iota. Actualmente se consideran los tipos A, B, C, D y E. Un sexto tipo F se sugirió, pero no se aceptó, debido a que es similar al tipo C y porque existe un acuerdo entre los bacteriólogos especialistas en anaerobios, de que la multiplicación de los tipos de C. perfringens, con base a la producción de toxinas menos importantes pudiera no ser útil, y consecuentemente, su número ha permanecido suficientemente pequeño como para ser útil (55).

Las toxinas principales que se emplean en el estudio y clasificación del C. perfringens, son la alfa, beta, épsilon e iota, las que son producidas hiperinmunizando conejos con los tipos A, C, D, y E.

Las toxinas beta, épsilon e iota solo se reconocen en tejidos vivos in vitro o in vivo, mientras que la toxina alfa, también puede ser reconocida in vitro debido a la acción que tiene sobre la lecitina.

Clostridium chauvoei (C. fesceri)

Las características de C. chauvoei y de C. septicum, fueron estudiadas por Moussa (39), quien representó a los antígenos de la espora con letras romanas mayúsculas, los somáticos con números arábigos y los flagelares con letras romanas minúsculas. Así la mayoría de las cepas de C. chauvoei comparten antígenos somáticos y de la espora, siendo su fórmula antigénica A:3:f, o bien A:3:g, ya que existen dos tipos de antígenos flagelares.

El antígeno de la espora, es compartido por el C. septicum y es aparentemente el responsable de la aglutinación cruzada que existe entre las dos especies, lo cual ocurre al prepararse antisueros con cultivos relativamente viejos, en etapa de esporulación. En las pruebas de protección o de neutralización de toxinas, se observa que existe neutralización de la toxina A de la espora de C. chauvoei, con antitoxinas del C. septicum, sin embargo esto no sucede en forma contraria (55).

Asimismo, como se observa en el Cuadro No. 1.4, se han descrito cuatro toxinas del C. chauvoei (55), la toxina alfa es letal, necrozante y hemolítica; la toxina beta es una desoxirribonucleasa; la gamma es una hialuronidasa, y la delta es hemolítica y se relaciona antigénicamente con la estreptolisina O, con la toxina delta del C. novyi, así como con hemolisinas oxígeno lábiles del C. sporogenes, C. histolyticum, de otros clostridios y del neumococo.

Cuadro No 1.4

Toxinas Producidas por Clostridium chauvoei
y su Relación Antigénica con otras Toxinas

Toxina	Características	Relación Antigénica
alfa	letal, necrozante hemolítica	toxina alfa <u>C. septicum</u>
beta	desoxirribonucleasa	-
gamma	hialuronidasa	-
delta	hemolisina oxígeno-lábil	antiestreptolisina D, hemolisinas de otras bacterias, tetha <u>C. perfringens</u> , tetanolisina, delta <u>C. novyi</u> , hemolisina oxígeno-lábil. Otros clostridios

Tomado parcialmente de Smith, L. DS. 1975.

Resultados de pruebas inmunológicas realizadas en Estados Unidos e Inglaterra con cepas de C. chauvoei, han mostrado que son muy similares entre sí (12), lo cual se confirma con el hecho de que las pruebas de control de calidad que se realizan en Estados Unidos a biológicos que tienen en su fórmula a este agente, utilizan una sola cepa de desafío (Maloy, S. E., Com. pers., 1983).

Sin embargo las cepas sí tienen diferencias en su capacidad inductora de inmunidad (39). Así, para la producción de biológicos se considera que los antígenos somáticos desarrollan un papel primordial en el desarrollo de la inmunidad (12, 15, 25, 61), mientras que la capacidad antigénica de los antígenos solubles es menor, pero sí contribuye en la producción de biológicos potentes (12, 26), y la actividad inmunogénica de los flagelos aparentemente es

escasa en comparación con los otros componentes (14), debido a ésto, se producen comercialmente bacterinas de cultivos enteros formalizados.

Clostridium septicum

Este clostridio es menos complejo que la mayoría de los clostridios, Moussa (39) estudió 39 cepas en 1959 y determinó seis grupos antigénicos con base en los antígenos celulares, cinco de éstos son antígenos flagelares (a, b, c, d y e), dos son somáticas (1 y 2) y uno llamado "A" común de la espora es compartido con C. chauvoei.

En el Cuadro No. 1.5, se observan las toxinas producidas por C. septicum. La toxina alfa es letal, necrozante, hemolítica y muy similar, tanto en su acción, como antigénicamente, a la toxina alfa del C. histolyticum, la que es inactivada por anticuerpos producidos contra la toxina alfa de C. septicum (58). Esta toxina alfa es la causante de la hemólisis de eritrocitos en diferentes especies animales (55). Su acción in vitro es compleja, aparentemente estimula una vasoconstricción periférica que aumenta la presión arterial y posteriormente tiene efecto directo sobre el músculo cardíaco, ocasiona también contracción del músculo liso y liberación de histamina en el pulmón.

La toxina delta es oxígeno sensible, hemolítica y similar a la producida por el C. chauvoei.

Este clostridio también forma otros factores (55), uno similar a la agresina del C. perfringens. Una hemoaglutinina asociada a la pared celular. Y una

neuraminidasa diferente a la hemoaglutinina, que posiblemente ayuda a la diseminación del organismo en tejidos o bien interfiere en la función de la membrana celular de los tejidos afectados.

Resultados de estudios (9, 39) han mostrado la heterogenicidad de las cepas de C. septicum, ya que no poseen un antígeno común, y que la inmunidad conferida por los antígenos somáticos es más importante que la estimulada por otros antígenos. Además, el que la inmunidad estimulada sea de corta duración hace suponer que la resistencia estimulada por exposición natural a este agente es más importante que el tratamiento con bacterinas-toxoides (9).

Cuadro No 1.5

Toxinas Producidas por Clostridium septicum y su Relación Antigénica con otras Toxinas

Toxina	Características	Relación Antigénica *
alfa	letal, necrozante hemolítica	toxina alfa <u>C. histolyticum</u>
beta	desoxirribonucleasa	desoxirribonucleasa de <u>C. chauvoei</u>
gamma	hialuronidasa	
delta	hemolisina oxígeno-lábil	similar a delta <u>C. chauvoei</u> antiestreptolisina O, hemolisinas de otras bacterias

* Según Smith. L. DS. y Holdeman (55)

Clostridium sordellii

Como se aprecia en el Cuadro No. 1.6, este microorganismo produce varias sustancias biológicamente

activas (55), la toxina letal principal parece ser un "factor productor de edema", llamado antígeno beta, que también es dermonecrótico. Otro antígeno es el gamma o "factor hemorrágico", cuya acción hidrolítica se asemeja a la de la fosfolipasa A del C. perfringens. Su acción in vivo se manifiesta principalmente sobre los mastocitos (55). Así mismo produce una fosfolipasa C, llamada antígeno alfa, que aparentemente no se encuentra en relación con el "factor productor de edema", es hemolítico, pero de poca importancia debido a su pobre producción.

Otras dos enzimas que produce este microorganismo son una neuraminidasa y una desoxirribonucleasa (55, 73); la primera tiene poca acción biológica y la segunda es aparentemente responsable de los cambios degenerativos en los núcleos de las células de los tejidos afectados, pero tiene poca acción in vivo.

Cuadro No 1.6		
Toxinas Producidas por <u>Clostridium sordellii</u> *		
Factor	Toxina	Actividad biológica
Productor de edema	beta	letal, dermonecrótico
Hemorrágico	gamma	fosfolipasa, similar a la toxina alfa de <u>C. perfringens</u>
Fosfolipasa C	alfa	poca
Lisolecitinasa	--	?
Hemolisina oxígeno-lábil	--	hemolítica
Neuraminidasa	--	poca
Desoxirribonucleasa	--	aparentemente nula

* Según Smith, L. DS (55)

En el caso de C. sordellii, no se ha generalizado el uso de letras griegas para designar toxinas.

La causa de la muerte de los animales afectados aparentemente es debida a la acción de la toxina letal, mientras que la fosfolipasa A es responsable de la aparición de la grasa en el área afectada (55). Se ha visto que los animales inmunizados contra C. haemolyticum desarrollan una inmunidad sólida, la que sin embargo, en infecciones mixtas con C. sordellii, puede ser insuficiente (55).

Clostridium novyi (C. oedematiens)

Dentro de las toxinas que produce esta especie se encuentra la toxina alfa, que es considerada como la principal. En el Cuadro 1.7, se presentan otras toxinas que produce este microorganismo, su actividad y la distribución por tipos.

Existen cepas de C. novyi que son más resistentes al calor y a los desinfectantes que los demás clostridios, sin embargo, se ha visto que las cepas con estas características son menos toxigénicas (41).

Cuadro No. 1.7						
Toxinas Producidas por <u>Clostridium novyi</u> *						
Toxina	Actividad	Tipo que la produce				
		A	B	C	D**	
alfa	necrozante, letal	++	++	--	--	
beta	necrozante, letal, hemolítica, lecitinolítica	--	--	--	++	
gamma	necrozante, hemolítica	+	--	--	--	
delta	hemolisina, termolábil	+	--	--	--	
épsilon	lipolítica	+	-	-	-	
zeta	tropomiosinasa	--	+	--	--	
theta	lipasa	--	tr	-	+	

* Tomado de Smith, L. DS. 1975.

** C. haemolyticum

+ = producido; ++ producido en cantidad letal; - = no producido; tr = trazas

La inmunización de animales domésticos contra C. novyi, se realiza comúnmente mediante toxoides comerciales preparados con la toxina alfa del tipo A, así como con toxinas de otros clostridios y antígenos de C. chauvoei (57). Sin embargo, se recomienda que contengan toxoides de los tipos A y B, ya que a pesar de que el efecto letal de ambos sea la toxina alfa (55), ambas producen efectos diferentes (33).

Clostridium histolyticum

Este microorganismo tiene una estructura antigénica relativamente simple, todas sus cepas tienen un antígeno O en común, que aparentemente es un polisacárido compuesto de cinco azúcares. Este antígeno es activo en reacciones de fijación de complemento y precipitación, así mismo es una hemoaglutinina activa. Se sabe que tiene otros antígenos somáticos en su estructura, pero no han sido determinados (55). Para su estudio se divide en dos grupos conforme a sus antígenos 13 y 14, que son termolábiles (55). Comparte un antígeno (IV) con C. sporogenes, C. tetani y cepas proteolíticas de C. botulinum, tipos A, B y F.

Como se aprecia en el Cuadro No. 1.8, produce varias sustancias exocelulares, dos de ellas, la alfa y la beta son relativamente importantes en la producción de cambios patológicos. La toxina alfa se considera como la principal, es letal y se sintetiza en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano. La toxina beta está compuesta por lo

menos por dos enzimas similares, tanto antigénicamente como bioquímicamente, actúa digiriendo la colágena en forma considerable (55).

Otras toxinas de este microorganismo son: la gamma, proteinasa que se activa por la cistina, afecta a la colágena previamente alterada por la toxina alfa (55), aparentemente no tiene importancia en infecciones. La toxina delta, es una de las cuatro elastasas que produce, se inactiva por la cisteína (55), y la toxina épsilon, hemolisina termolábil, relacionada con la toxina theta de *C. perfringens*, la estreptolisina D, la toxina delta de *C. novyi*, y otras toxinas termolábiles. Los eritrocitos de la mayoría de las especies son susceptibles a su acción.

Cuadro No 1.8		
Propiedades de las Toxinas de <i>Clostridium histolyticum</i> *		
Toxina	Actividad	Relación con
alfa	letal, necrozante	toxina alfa de <i>C. septicum</i>
beta	colagenasa, letal, necrozante	otras colagenasas
gamma	proteinasa	--
delta	proteinasa	--
épsilon	hemolisina	otras hemolisinas

*Tomado de Smith L. DS. y Holdeman (55).

1.2.6 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LAS MIOSITIS CLOSTRIDIALES

1.2.6.1. Habitat

Los Clostridium son gérmenes con distribución mundial, cuyo habitat principal es el contenido intestinal de los animales y el suelo (53, 55, 59), en el cuadro No. 1.9, se encuentran los resultados de estudios realizados para conocer la distribución de clostridios patógenos en diferentes tipos de suelo (54). Se puede observar que el C. perfringens se encontró en todos los tipos de suelo, con un 100% de aislamientos, mientras que el C. botulinum, el C. tetani y el C. novyi, no se aislaron con tanta frecuencia, ni en todos los suelos, y que el C. septicum tuvo mayor porcentaje de aislamientos que éstos, a partir de tres de los cuatro suelos estudiados, pero tampoco se logró aislar a partir de suelo virgen.

Cuadro No. 1.9					
Prevalencia de Clostridios Patógenos en Suelos (%)*					
Tipo de suelo	C l o s t r i d i u m				
	botulinum	tetani	novyi	perfringens	septicum
Virgen **	0	0	0	100	0
Con pastizal	4	8	16	100	8
Cultivado ***	10	13	12	100	20
Con bovinos productores de leche	9	5	48	100	28

* Tomando y modificando parcialmente de Smith, L.D.S., Holdeman L.V., (36) p. 258, 1968.

** Suelo virgen = nunca cultivado con pastizal.

*** Suelo cultivado = usado para cultivar alfalfa o trigo.

Esta distribución de los clostridios nos indica, que si bien los microorganismos no se encuentran en algunos suelos, pueden llegar a ellos por la introducción de animales que eliminen los microorganismos por el excremento.

Se ha observado también, que existe una relación con el tipo de suelo que llegan a contaminar y su supervivencia en él, por el tipo de suelo y su humedad, ya que son características que les pueden ser favorables o detrimentales (53). Por otro lado, en algunos suelos, se ha visto que la presencia de otros determinantes, como son larvas de parásitos, también están relacionados con la presentación de algunas clostridiasis.

De acuerdo a Sterne (60), las especies de Clostridium que se encuentran relacionadas en infecciones de heridas y con infecciones de origen hepático y gangrenas gaseosas, son las siguientes:

Clostridium perfringens (C. welchii)

Esta bacteria es una de las más ampliamente difundidas. Su habitat es el suelo y el contenido intestinal de animales y el hombre (59). Princewell y col. (42), lo encontraron como la especie de clostridio más prevalente en el contenido intestinal, siguiéndole en frecuencia C. bifermentans. Así mismo, Ricke, y col. (45) detectaron su toxina en el suero de todos los animales que estudiaron.

De sus tipos, sólo el tipo A se encuentra como parte de la microflora del suelo, mientras que los demás

aparentemente no logran multiplicarse ni sobrevivir por periodos largos en él.

Generalmente, Clostridium perfringens se describe asociado a la presentación de enterotoxemias en diversas especies. Se considera que los tipos A y C ocurren en el humano, mientras que el tipo D rara vez lo afecta. No hay evidencias que confirmen sea productor de miositis en animales (70), y aunque el tipo A se encuentra en ocasiones involucrado en infecciones mixtas en heridas su aislamiento a partir de material patológico es de poca importancia (59).

Clostridium chauvoei (C. fesceri)

Desde que el Clostridium chauvoei fue descubierto por Arloing, Corvein y Thomas en 1897 (1), se ha reconocido como el clostridio más importante, desde el punto de vista económico, ya que su distribución es mundial, y se ha recuperado de casi todas las partes donde se encuentra ganadería causando pérdidas económicas elevadas. Produce la enfermedad llamada "carbón sintomático", es enzoótica en determinadas áreas, especialmente las sujetas a inundaciones (5a).

Se considera parásito obligado (53), debido a que su habitat es el contenido intestinal y a que a diferencia de otros clostridios el tipo de suelo tiene un papel importante en la presentación de la enfermedad porque determina su estancia en él, por ello no se le recupera con frecuencia del mismo. Se ha aislado de contenido intestinal, rifones e hígado de ovinos y de bovinos aparentemente sanos (29).

Los animales ungulados son los animales más susceptibles a infecciones por C. chauvoei (53), los bovinos principalmente, seguidos por los ovinos, mientras que los caprinos y porcinos, se afectan menos frecuentemente.

No se encuentra asociado a infecciones en humanos (58, 73), y aunque según Sterne (60), el equino es completamente resistente existen reportes de su aislamiento a partir de casos clínicos (23, 37, 66).

Los cadáveres de animales muertos por pierna negra son ingeridos por animales de carroña, como perros, coyotes, gatos, zorras y aves, con aparentemente resistencia (53).

De las especies de laboratorio, los cuyos, hamster y ratón son susceptibles, sobre todo al emplearse cloruro de calcio 10%, o algún otro debilitante muscular que produzca necrosis y disminuya la tensión de oxígeno, facilitando así la germinación y diseminación de las bacterias (53).

Clostridium septicum

Su distribución es mundial y se le ha logrado recuperar incluso a partir de muestras de suelo del Desierto del Sahara (55). Aparentemente, este clostridio se encuentra en mayor cantidad en los suelos más fértiles y es un habitante constante del tracto intestinal de humanos y animales (55).

El nombre de la enfermedad que produce el C. septicum es "edema maligno", en México se le conoce también

como "matlazáhuatl" en algunas regiones de Veracruz (20), afecta con más frecuencia a bovinos y en menor, a ovinos y cerdo. El hombre también es afectado. Según Rebhun y col. (43), en los equinos aparentemente existe un incremento en la prevalencia de la enfermedad, debido supuestamente más a la aplicación de inyecciones con agujas contaminadas, que a la contaminación de heridas.

Nervig, R. M. y Col. (40) consideran que el C. septicum, es un patógeno primario, ya que de acuerdo a una encuesta realizada durante 1977 y 1978, recibieron información de 644 casos de infecciones producidas por este clostridio, de estos casos se detectaron infecciones puras en 29.2% de los casos y junto con otros clostridios en 41.6% de los casos; sin embargo, en 188 casos no se pudo determinar si era el único organismo aislado. De esta información se observó también que los bovinos productores de carne eran afectados por esta bacteria entre los 6 y 12 meses de edad. Su importancia económica como productor de miositis se refleja en el hecho de que en 1975, en los Estados Unidos se prepararon y vendieron mas de 16 millones de dosis de bacterinas que contenían sus componentes (11).

Clostridium novyi tipo A y Tipo B

El Clostridium novyi existe como parte de la microflora del suelo, sedimento marino y en el cuerpo animal. Smith, y col. (55), mencionan que de los tipos A y B, sólo el tipo A se ha aislado del suelo, pero que no se sabe si el

tipo B es un parásito obligado o si los métodos de aislamiento utilizados por varios investigadores han sido inadecuados. Ambos tipos se han recuperado a partir de hígado de animales aparentemente sanos (17, 63, 74).

Clostridium sordellii

Se considera que el suelo es el habitat del C. sordellii, ya que no se le encuentra en forma normal en el contenido intestinal del hombre ni de animales. Aparentemente ocurre sólo en ciertas regiones del mundo, generalmente las más áridas (55) y depende de las características del suelo mismo. Su recuperación, aun en los lugares donde se le considera común, es sólo en áreas pequeñas.

Su importancia es debida principalmente a que es un germen enterotoxigénico (62), produce enteritis asociadas al síndrome de muerte súbita en bovinos en sistemas de engorda en corral (55), debido a ellas es considerado el tercer clostridio en importancia económica en los Estados Unidos (Scanlan com. pers. 1988). Además se asocia a infecciones de heridas (12).

Clostridium histolyticum

Aunque no se conoce bien cual es su habitat principal (58), se le encuentra ampliamente pero no abundantemente en el suelo y probablemente en contenido intestinal de animales (73) y de humanos (58).

Considerando que forma parte de la microflora del suelo, las enfermedades causadas por este germen son menos

frecuentes que lo que podría esperarse; la mayoría de los casos fundamentados son en humanos, durante confrontamientos armados (53), en los que se ha visto que su vía de entrada al organismo es a través de heridas, todos los casos en que esta bacteria estaba en forma pura o bien asociada logró sobrevivir.

En el Cuadro No. 1.9, se encuentran los resultados de hallazgos presentados por Williams, B. J. (70), en 173 casos de miositis clostridiales en ganado.

Cuadro No. 1.9		
Presentación de Clostridios Patógenos en Miositis*		
Especie	c a s o s	%
<u>C. chauvoei</u>	75	43
<u>C. chauvoei</u> - <u>C. septicum</u>	22	13
<u>C. novyi</u>	53	31
<u>C. novyi</u> - <u>C. septicum</u>	9	5
<u>C. septicum</u>	11	6
<u>C. sordellii</u>	3	1.7

*Tomado de Williams, B. M. Vet. Rec. 100, 5:90-91(1977).

1.2.6.2 Distribución de las miositis clostridiales en México.

En nuestro país, se desconoce en general cuáles son los clostridios involucrados en problemas de campo y cuál es su distribución. De 1975 a 1977 (64), se presentó un brote, cuya distribución geográfica cubrió los Estados de Veracruz, Puebla, San Luis Potosí, Chiapas y Yucatán, en él aumentaron

13.5% los casos registrados, en comparación para los años anteriores.

En el Cuadro No. 1.11 se encuentran los resultados de la identificación de clostridios realizados por el Laboratorio Central de Diagnóstico de la S. A. R. H., de 1975 a Marzo de 1977, de acuerdo a Torres y col (64).

Como consecuencia de ese brote, Labranderoy y col. (32) realizaron un estudio que mostró que ninguno de cinco biológicos comerciales probados, conferían la protección exigida por la Dirección General de Sanidad Animal (46).

Cuadro No. 1.11			
Clostridios Patógenos Aislados en México (1975-1977)*			
Especie	Estado	Frecuencia	%
<u>C. chauvoei</u>	Veracruz, Puebla, Estado de México	9	47.4
<u>C. novyi</u>	México, Tabasco, Tamaulipas (Ciudad Victoria)	4	21.1
<u>C. septicum</u>	Veracruz (Pánuco), Hidalgo, Coahuila (Sabinas)	4	19.6
<u>C. perfringens</u>	Baja California Norte, Puebla	2	10.5
	total	19	100.0

* Adaptado de Torres, B. J. I, y Aguilar, D. P. Actualidad Veterinaria, 2,8:11-18(1979)

Por otro lado, Bojorques y col. (5b), en 1979 reportan el aislamiento de C. perfringens tipo A, a partir de un brote de enterotoxemia en caballos en el Distrito Federal.

En 1984, Seifert, H. S. H. y col. (51) mencionan que de acuerdo a sus observaciones, las vacunaciones

efectuadas con biológicos introducidos ilegalmente al país de los Estados Unidos, no protegen contra lo que el denomina "complejo epidémico" producido por clostridios.

1.2.7 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y LESIONES DE LAS MIOSITIS CLOSTRIDIALES

En el Cuadro No. 1. 12 se observan las enfermedades producidas por clostridios productores de miositis, así como algunas de sus sinonimias con que se conocen en nuestro país.

Cuadro No. 1.12	
Enfermedades Producidas por Clostridios Productores de miositis	
Organismo	Enfermedad (sinonimias *)
<u>C. chauvoei</u> (<u>C. fesceri</u>)	Carbón sintomático (mal de paleta, pierna negra, carbonco bacteridiano, matlazáhuatl)
<u>C. septicum</u>	Gangrena gaseosa (matlazáhuatl) Carbón sintomático, en cerdos raro.
<u>C. novyi</u> tipo A	"big head"
<u>C. pedematiens</u> A	Gangrena gaseosa
<u>C. novyi</u> tipo B	Gangrena gaseosa
<u>C. perfringens</u> tipo A	Ocasionalmente en infecciones de heridas en humanos, produce gangrena gaseosa
<u>C. sordellii</u>	pierna negra, raro edema maligno
<u>C. histolyticum</u>	gangrena gaseosa

* Tomadas de Frappe M. R. C.: Manual de Infectología Veterinaria. Francisco Méndez Oteo, México D.F. 1982.

Debido a que los clostridios productores de gangrenas gaseosas o de miositis, producen enfermedades de curso agudo y sobreagudo, los animales son encontrados generalmente muertos y en estado de descomposición, ya que los animales afectados mueren en un lapso de 24 a 48 horas

después de haberse iniciado los primeros signos, y éstos son observados o informados con poca frecuencia. Es también por estas razones que la mayoría de los autores que mencionan los signos clínicos se basan en infecciones experimentales.

Williams (70), describe los siguientes hallazgos patológicos macroscópicos encontrados en 173 casos de miositis en bovinos de acuerdo al o los organismos demostrados en las lesiones:

- C. chauvoei, C. chauvoei y C. septicum: Area negruzca, seca, esponjosa, con olor rancio. Presencia de líquido amarillo pálido que rodea el músculo afectado y después se tinte de sangre.

- C. novyi, C. novyi y C. septicum: Edema gelatinoso muy abundante en tejido subcutáneo y tejido conectivo intermuscular, claro al principio, después se tinte de sangre.

- C. septicum: Edema teñido con sangre abundante, con numerosas burbujas de gas. Músculo de color rojo oscuro.

- C. sordellii: Parecido a las infecciones por C. novyi, excepto que el edema es más teñido de rojo y un olor más fétido.

Sterne y col. (59) mencionan que en el caso de animales que hayan muerto de una enfermedad en que se sospeche de clostridiasis, se debe realizar la necropsia, enfocándose principalmente a piel y musculatura, vejiga y órganos parenquimatosos, y a la cavidad torácica, incluyendo el corazón y sus cubiertas.

Dentro de las características clínicas y las lesiones encontradas a los animales con infecciones de musculares causadas por clostridios se encuentran:

Clostridium perfringens (C. welchii)

La mayoría de las cepas de C. perfringens aisladas de infecciones de heridas en humanos, pertenecen al tipo A y en menor parte al tipo B. En él producen infecciones que se pueden dividir en tres tipos (73):

a) Infecciones de tipo simple, que causan a menudo sólo una infección pequeña y localizada, limitada a la superficie de la herida, sin causar efectos mayores.

b) Celulitis anaeróbica, infecciones más severas, en la que planos anatómicos más profundos se afectan, pero sin involucrar al músculo, y en ellos es donde aparentemente se producen las toxinas. Su presentación es más dramática y seria, pero al ser tratada quirúrgicamente la mortalidad es baja.

c) Gangrenas gaseosas o mionecrosis clostridiales, en humanos tienen una presentación clínica aguda y fatal, con mortalidad apreciable. El tejido muscular si se afecta, se vuelve suave y pulposo por la acción de la toxina kappa. En el edema se pueden observar gotas de grasa tal vez por la acción de la lecitinasa sobre complejos lipoprotéicos.

En animales, según Williams (70), no se ha establecido firmemente si C. perfringens es causante de

gangrena gaseosa en animales, aunque de acuerdo a Taylor y col. (62) si se encuentra en ellas, pero no menciona específicamente si estas infecciones son en animales.

Clostridium chauvoei (C. fesceri)

Debido a que no se logran observar lesiones en piel que expliquen la entrada del organismo a los animales afectados, se considera (53) que la mayor parte de los casos de carbón sintomático son de origen endógeno.

La patogénesis de las miositis clostridiales de origen endógeno, en general, no se encuentra del todo bien estudiada, en el caso de Carbón Sintomático, en el que los animales que más lo sufren tienen de 6 meses a 3 años de edad y se encuentran en las mejores condiciones de carne (12, 59), se han visto patrones de comportamiento que se atribuyen a cambios climáticos, por la repercusión que tienen sobre el tipo de ingesta, ocasionando indirectamente cambios en la flora ruminal, que aunados a factores estresantes, llevan al animal a un estado tal en que los gérmenes o sus esporas pueden llegar a sangre después de atravesar la pared intestinal, y de ahí a músculos, donde un trauma posiblemente sea el factor desencadenante del proceso patológico, ya que se crearía un microambiente anaeróbico con un potencial redox suficientemente bajo para que las esporas germinen, produciéndose entonces el cuadro clínico.

Otros autores (50) mantienen la teoría de que en las épocas de sequía, los forrajes secos contaminados con

esporas laceran la mucosa oral y las inoculan, llegando al torrente circulatorio que las transporta a músculos donde se depositan y esperan las condiciones similares a las del caso anterior para germinar.

Los animales afectados por este microorganismo y que llegan a observarse vivos, muestran una toxemia grave, con crepitación del miembro afectado por el gas producido. En algunos casos se llega a observar relación con sitios de vacunaciones u otros traumas, en esos casos se observa mayor presentación de gas y un edema predominante, con diseminación rápida, la muerte se presenta de 24 a 48 horas después de la presentación del trauma. La elevación de la temperatura y la inflamación del sitio afectado son los primeros signos. Al final de la enfermedad, se presenta una bacteremia (53).

La lesión principal generalmente se encuentra en los músculos grandes de la espalda, pierna o cuello, pero se puede presentar en lengua y confundirse con actinobacilosis (52). En el animal recién muerto se observan los músculos afectados de un color rojo negruzco a casi negro, de aspecto seco y esponjoso debido a la gran cantidad de burbujas de gas que se encuentran en los tejidos. Estos músculos se encuentran rodeados de grasa amarillenta, edema y exudado sanguinolento, emiten un olor rancio, dulzón, muy característico de las infecciones por C. chauvoei y C. septicum (53, 59). Los órganos internos se encuentran relativamente sin cambios, a diferencia de la gangrena gaseosa, producida por C. septicum o C. novyi. El bazo

muestra un tamaño normal, a diferencia de la esplenomegalia que se presenta en casos de antrax (52).

Malone y col. (34), reportan haber encontrado de 29 casos de bovinos con miositis producida por C. chauvoei, 14 que tenían lesiones de miositis únicamente, 8 tenían miositis y pericarditis fibrinosa y seis presentaban únicamente pericarditis fibrinosa y uno presentaba meningitis purulenta.

En ovinos, la enfermedad por contaminación perineal posparto, presenta inflamación y edema de la zona, la que avanza hacia la pierna (59). En ovinos también se ha observado miocarditis necrótica y hemorrágica (21).

Clostridium septicum

La vía de entrada de este organismo es generalmente a través de heridas, aunque en bovinos, también se ha descrito en casos de infecciones endógenas similares al carbón sintomático causado por el C. chauvoei.

El edema maligno producido por C. septicum, es secuela de heridas tales como castraciones, esquila o partos mal atendidos (59). La infección es de curso agudo, en forma de muerte súbita (40), Inicia con inflamación dolorosa de la parte afectada, después, se presenta edema, pero disminuye el dolor y la hipertermia de la zona afectada. A la necropsia se observa edema y hemorragias frecuentemente con presencia de algunas burbujas de gas. A menudo existe septicemia y las hemorragias se observan en todo el cuerpo, también puede notarse la presencia de exudado seroso sanguinolento en el peritoneo (52).

Clostridium novyi (C. oedematiens)

La infección por C. novyi tipo A ocurre en carneros que al pelear se laceran la cabeza y contaminan las heridas con este clostridio, produciéndose la enfermedad llamada "big head", se presenta con poco gas, el músculo no se obscurece, se produce un edema incoloro abundante, por el cual inicialmente se llamó a este agente C. oedematiens, mismo que todavía es utilizado en la literatura europea. En humanos produce gangrena gaseosa rara vez (60). Mientras que el tipo B causa un tipo de carbón sintomático en bovinos con poca producción de gas, el músculo se presenta en color claro y olor diferente al producido por el C. chauvoei y el C. septicum (53).

Los casos de antrax subagudos que se presentan ocasionalmente, sobre todo en animales inmunizados, pueden dar lugar a confusiones en el diagnóstico, debido a ello es necesario realizar tinciones como Giemsa y Wright, para excluir esta posibilidad (59).

Clostridium sordellii

Las infecciones causadas por este germen, son originadas principalmente en heridas, su sintomatología es similar a la producida por el C. novyi, o sea presencia de edema abundante, pero de color rojizo, teñido de sangre, en vez del casi incoloro que presenta en casos de las infecciones por C. novyi. Las parasitosis hepáticas producidas por Fasciola hepatica asociadas a las lesiones

de Clostridium sordellii se pueden confundir con las de C. novyi tipo D y sólo el examen bacteriológico las puede diferenciar (53). Puede haber asociación de Clostridium sordellii con C. haemolyticum, con lo que se puede vencer a la inmunidad inducida por bacterinas contra hemoglobinuria bacilar (55).

Clostridium histolyticum

Como en otras infecciones clostridiales los la mayoría de los reportes existentes son debido a inoculaciones experimentales de animales (53). Al inocularse éste organismo en los músculos grandes de la pierna, en 12 horas se observa en el sitio de inoculación desarrollo de edema que se disemina hacia el abdomen. Los músculos inoculados comienzan a ser digeridos por las enzimas del clostridio, la piel se ulcera y en 24 horas el hueso es denudado de los tejidos blandos. Puede ocurrir amputación de la pierna como resultado de la digestión de los ligamentos y cápsula de la articulación de la cadera (53, 73).

1.2.8 DIAGNÓSTICO POR MEDIOS BACTERIOLÓGICOS, INMUNOFLUORESCENCIA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES

1.2.8.1 Colección y transporte de la muestra

En general se considera que la eficacia de los métodos de cultivo de anaerobios depende del método de colección y de transporte de los especímenes, de la prontitud del cultivo y de un método de cultivo adecuado. Se considera también como limitante, el tiempo de exposición de los organismos de la muestra al oxígeno ambiental, que les ocasiona pérdida de viabilidad. Para evitar esto último se han estudiado diferentes métodos de colección y transporte.

Sterne y Batty (59), discuten sobre las diferentes técnicas de mantenimiento de muestras, tomadas de animales en que se sospeche una clostridiasis, refiriendo que idealmente, se deben enviar en congelación, o en su defecto refrigeradas; pero dicen que si esto no es posible y el transporte excederá de un día o si bien las temperaturas a que se someterá a la muestra van a ser elevadas, entonces se debe hacer uso de agentes químicos o físicos, que no permitan la multiplicación bacteriana y no lastimen a los patógenos cuya presencia es deseada para elaborar un diagnóstico. Dentro de los agentes físicos mencionan los siguientes:

a.- Hipertonidad, inhibe el crecimiento bacteriano y de esta forma mantiene a las bacterias de la muestra en el estado que se encuentran al ser tomadas e incluidas en concentraciones elevadas de sal o de glicerina.

b.- Deshidratación, es un método útil donde los medios de comunicación son difíciles, tiene la desventaja que los números de las bacterias presentes se alteran y que el viento puede incorporarle bacterias del suelo; sin embargo aclaran que en ocasiones es el único método disponible, útil sólo donde es necesario establecer que un microorganismo en particular se encuentra en un área, y cuando la muestra no puede ser transportada rápidamente al laboratorio.

Los mismos autores (59) mencionan, que dentro de los agentes químicos utilizados para el mantenimiento de la muestra, los fenoles, cresoles y el formaldehído son demasiado activos (tóxicos) para ser utilizados para este fin, mientras que desinfectantes más débiles como el timerosal o el nitrato-fenil-mercúrico y compuestos similares son virtualmente inefectivos en presencia de compuestos orgánicos, pero que existen microorganismos (clostridios) que son altamente sensibles a ellos.

Sobre el uso de antibióticos mencionan que la neomicina es útil en concentraciones de 100 a 250 microgramos por mililitro y que favorece el crecimiento del C. perfringens.

Por otro lado, Berkhoff y Redenberger (4), en un estudio que realizaron con el objeto de determinar diferentes especies de clostridios a partir de muestras de campo utilizaron tubos estériles con atmósfera de bióxido de carbono, inoculados con jeringas con las que previamente se habían succionado fluidos tisulares que constituían la

muestra, y para el transporte de muestras sólidas emplearon bolsas de plástico.

Seifert y Col (50), por otro lado, describen un método de transporte de muestras sencillo, económico y que evita el uso de aditivos y/o refrigeración, consiste en utilizar una aguja que tiene ensartados un tapón de hule y varios círculos de papel filtro de 6 mm de diámetro, que se esterilizan dentro de un tubo de ensayo. Al momento de tomar la muestra, se impregnan los papeles filtros con la médula ósea de un hueso largo, colocándose de nuevo en el tubo para su transporte al laboratorio. El mismo autor (com. pers. 1985), recomienda el uso de hisopos de algodón en lugar del papel filtro.

Por otro lado, para el diagnóstico inmunológico por medio de pruebas de neutralización de toxinas con anticuerpos específicos, las muestras pueden ser tomadas, ya sea de tejidos sólidos, contenido intestinal, fluidos tisulares o exudados serosos (59).

1.2.8.2 Diagnóstico bacteriológico

Como se vió anteriormente, existen métodos bacteriológicos enfocados a realizar tanto el aislamiento e identificación de clostridios productores de miositis. Sin embargo, en la literatura se encuentran diferentes manuales y artículos (8, 12, 13, 16, 28, 53, 54, 56, 59, 73) que contienen cuadros de identificación de clostridios por medio de pruebas bioquímicas, mismas que en ocasiones se

contraponen en el resultado de algunas pruebas bioquímicas de algunas especies. Tal vez estas diferencias sean por motivos de falta de unificación de criterios para la preparación de los diversos medios y/o sustratos utilizados por los diferentes autores, o bien posiblemente porque el período de incubación empleado sea diferente o menor de 10 días, lo que puede invalidar la identificación (16).

Además, la interpretación de los resultados tanto de bacteriología, como inmunofluorescencia y cromatografía de gases, para emitir un diagnóstico debe ser con cierta reserva (59), debido a:

a) las características del habitat de los clostridios, C. chauvoei y el C. novyi, que son francamente patógenos han sido recuperados en pequeñas cantidades de hígado de ovinos sanos (17, 63, 73); mientras que C. septicum y C. perfringens invaden casi la totalidad de los tejidos pocas horas después de muerto el animal y aunque no hayan sido la causa de la muerte es posible realizar su aislamiento y debido a su rápido crecimiento pueden enmascarar la presencia del agente etiológico (55, 59).

b) su forma de presentación, así debido a las lesiones, el diagnóstico clínico del carbón sintomático es, a diferencia de otras miositis clostridiales, el más fácil de realizar con los datos obtenidos en la necropsia y a partir de la historia clínica, pero existen reportes de casos clínicos con lesiones iguales a esta enfermedad en los que se ha logrado el aislamiento de C. septicum, pero no se ha logrado demostrar la presencia de C. chauvoei (55). Además,

en los animales con varias horas de haber muerto y que presentan gas, es difícil diferenciar los cambios post mortem, de los producidos por las miositis clostridiales (59).

y c) su amplia distribución, que permite se presenten con facilidad como contaminantes de la muestra (59).

Sin embargo, como son agentes patógenos potenciales, su hallazgo debe considerarse importante para estudios epidemiológicos y se aceptan muestras que para otro tipo de estudios no podrían considerarse en condiciones adecuadas (4).

1.2.8.3 Diagnóstico por inmunofluorescencia

De acuerdo a Sterne y Batty (59), la técnica de anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico de clostridiasis, depende de la demostración de antígenos de la pared celular de los clostridios, utilizado para ello anticuerpos específicos teñidos con un colorante fluorescente, mencionan que la técnica tiene las siguientes ventajas: ofrece un diagnóstico rápido y económico, en el cual las muestras se pueden tomar directamente del sujeto en el campo, no se deteriora durante el transporte, ni los números relativos de las bacterias varía y su eficiencia no depende de los microorganismos de la muestra que se encuentren vivos, por lo que es posible emplearla después de un tratamiento terapéutico. Tiene alta sensibilidad y los clostridios patógenos se pueden detectar en presencia de un alto contenido de microorganismos contaminantes.

Actualmente, en el mercado internacional se dispone de conjugados* para la identificación de C. botulinum, C. chauvoei, C. novyi, C. perfringens tipos A, C y D, C. septicum y C. tetani.

1.2.8.4 Diagnóstico por medio de cromatografía de gases.

Además de la determinación de especies por medio de sus características culturales, es muy útil hacer uso de la cromatografía de gases, ya que sirve como ayuda para una identificación rápida de una cepa determinada y es usualmente útil para confirmar resultados de otras pruebas (55).

En este método, se analizan los alcoholes y ácidos volátiles, producto del metabolismo bacteriano de cultivos puros, los que después de ser acidificados y tratados con éter para su extracción, son registrados en cromatogramas que se comparan con patrones ya establecidos.

El método de cromatografía de gases empleado directamente en la muestra, de acuerdo a Finegold (19), no da mejores datos que los obtenidos por un frotis teñido con la tinción de Gram.

* Wellcome Research Laboratories.

1.2.9 CONTROL DE LAS MIOSITIS CLOSTRIDIALES.

De acuerdo a Brander y Ellis (6), en la mayoría de los casos el control de enfermedades, puede ser llevado a cabo por un buen entendimiento de los métodos de diseminación de la enfermedad, la importancia del ambiente, y la relación entre el hombre y el animal en la situación de la enfermedad.

El control de las enfermedades causadas por clostridios, difiere de cualquier otro tipo de enfermedad, en que pueden ser prevenidas por algún tipo de inmunógeno, vacunas o antisueros, o una combinación de ambos (59, 60). Sin embargo, por defectos de control de calidad, muchos de ellos ni siquiera son algo útiles, además en la práctica pueden "fallar" porque se empleó uno no adecuado para las condiciones clostridiales específicas en su región, debido a un diagnóstico erróneo, o bien porque se haya empleado uno en el cual la cadena fría se haya roto.

Así, en México, Labrandero y Hernández en 1979 (32), al evaluar la efectividad de cinco bacterinas comerciales contra carbón sintomático, de acuerdo a las Normas Oficiales establecidas por la Dirección General de Sanidad Animal de la S.A.R.H. (46), encontraron que un producto protegió únicamente 23% de los cuyes inmunizados en dos ocasiones y desafiados con una cepa de desafío, y los biológicos restantes no confirieron ninguna protección.

Es necesario recordar la importancia que tiene la necesidad de realizar un diagnóstico etiológico, para lograr

controlar estas enfermedades, ya que como se mencionó anteriormente, aunque generalmente el agente causal de la gangrena gaseosa es el *C. septicum*, puede haber otros agentes involucrados, como el *C. histolyticum*; el *C. novyi*, tipos A, B; el *C. chauvoei*; el *C. perfringens* tipo A; el *C. sordellii*; o bien una combinación de uno o más de ellos y clínicamente es difícil diferenciarlas. Por lo que, una vez determinado el agente etiológico relacionado con el brote, se debe realizar una selección adecuada de los biológicos, para que esté de acuerdo a los tipos de bacterias presentes en la región donde se van a emplear, teniendo cuidado tanto en la conservación como durante la aplicación de los biológicos para obtener una inmunidad duradera.

Knott y col. (30), en un estudio de campo en el cual utilizaron un solo lote de 9448 bovinos en sistema de engorda en corral, aplicaron a la mitad bacterinas-toxoides polivalentes, observaron que en los animales vacunados hubo 322 muertes, 47.3% menos, en comparación con los no vacunados (611 muertes), independientemente de la causa de muerte. Y de acuerdo a ellos, los clostridios fueron el factor que contribuyó más a las muertes de los animales no vacunados, tuvieron un ahorro solo por mortalidad de \$104.040 dolares americanos en ese estudio.

En Inglaterra se ha visto (22), que las fórmulas polivalentes utilizadas no tienen efectos adversos en bovinos, sin embargo, en caprinos y menos en ovinos se puede presentar inflamación prolongada en la zona de aplicación,

además en los caprinos el efecto inmunizante de estos biológicos polivalentes es menor que en los ovinos.

En los Estados Unidos, dentro de las diferentes presentaciones que existen en el mercado (65), hay una bacterina toxoide con antígenos de los siguientes organismos: C. chauvoei; C. septicum; C. haemolyticum; C. novyi; C. sordellii; C. perfringens tipos C y D; Leptospira pomona; Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida.

En México, en general las bacterinas comerciales son dirigidas a proteger contra infecciones de:

- C. chauvoei; C. septicum en las llamadas "bacterinas dobles"

- C. chauvoei; C. septicum y Pasteurella multocida en las llamadas "bacterinas triples".

Y sólo una bacterina toxoide presenta a C. chauvoei; C. septicum y C. sordellii; Pasteurella multocida.

Todas son anacultivos formolizados, con adyuvantes de hidróxido de aluminio, oleosos o bien, registrados bajo un nombre comercial.

Debido a las tres características epidemiológicas comunes de las clostridiasis (57) (diseminación universal, no transmisibilidad por contacto e incidencia esporádica), la cuarentena no es una medida práctica para su control. Esto es porque en general el suelo y el contenido intestinal de los animales y el hombre son el habitat de los agentes etiológicos. Lo que aunado a su alta distribución, las características de esporulación de los gérmenes hacen que estas enfermedades sean resistentes a este medio de control.

2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PREPARACIÓN DEL CUADRO DE IDENTIFICACIÓN

Para alcanzar el objetivo principal de este trabajo y definir las pruebas bacteriológicas a las que se sometieron las muestras, se realizó uno secundario, que consistió en integrar un Cuadro de Identificación de Clostridios Productores de Miositis (ver Cuadro No. 3.1, página 66).

Dicho Cuadro de Identificación se preparó ponderando el criterio de los siguientes autores:

Carter, G. R. (8), Cottral, E. G. (12); Cowan, S. T. y Steel, K. J. (13); Dowell, V. R. y Hawkings, T. M. (16); Holdeman, L. V., Cato, E. P. y Moore, W. E. C. (28); Smith L. DS. y Holdeman, L. V. (53); Smith, L. DS, Hobbs, G. (54); Smith, L. DS. (56); Sterne, M. y Batty, I. (59); y Willis, A. T. (73).

El Cuadro incluye a las siguientes especies de clostridios:

- productoras de miositis:
 - C. chauvoei,
 - C. septicum,
 - C. sordellii,
 - C. novyi tipos A y B, y
 - C. histolyticum,
- no productoras de miositis:
 - otras especies que de acuerdo a la literatura se encuentran comúnmente en muestras clínicas.

Las pruebas bioquímicas mencionadas en este Cuadro, se prepararon de acuerdo a lo descrito por el "Anaerobe Laboratory Manual" del Instituto Politécnico de Virginia (28), en aquellos casos en los que los resultados no permitían la identificación de las cepas, se usaron las del mismo Manual.

Las fórmulas de los medios de cultivo, reactivos y sustratos empleados, se encuentran en el Apéndice.

2.2 ESPACIO Y TIEMPO MUESTRALES

Para identificar las especies de clostridios asociados a cuadros clínicos sugestivos de miositis clostridiales en el Noreste del país, se colectaron muestras de animales sospechosos de tales procesos en ganaderías pertenecientes a los Estados de Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.

El tiempo de colección de las muestras fue de dos años y medio, desde 1985 a mediados de 1987.

2.3 MATERIAL Y MÉTODOS

El C. perfringens no se consideró en este trabajo como productor de miositis en animales, debido a:

- su amplia distribución en suelos y contenido intestinal
- su aislamiento junto con otras bacterias a partir de muestras clínicas, y

- que a pesar de que en humanos si es causa de gangrena gaseosa, en animales no existen evidencias que lo confirmen como productor de gangrena gaseosa.

2.3.1 REQUERIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

Para la realización del trabajo de laboratorio, se utilizaron cepas de Clostridium que sirvieron como patrones de comportamiento de las diferentes pruebas bioquímicas que se practicaron.

Dichas cepas fueron obtenidas de:

- C. chauvoei.- Universidad de Texas A & M.
- C. chauvoei y C. septicum.- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.
- C. novyi IRP-190 y C. sordellii IRP-233.- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

2.3.2 REQUERIMIENTOS INSTRUMENTALES

El equipo especializado necesario para la realización de este trabajo incluyó: jarras de cultivo anaeróbico, generadores de hidrógeno y dióxido de carbono, indicadores de anaerobiosis, microscopio de fluorescencia y anticuerpos conjugados contra C. chauvoei y C. septicum. Así como equipo de bacteriología general, v.g. estufa de cultivo, mechero, pipetas, asas, etc.

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras fueron obtenidas de acuerdo al método descrito por Seifert y Col. (50) y modificados por el mismo (Comunicación personal, 1985), siguiendo el siguiente criterio:

1.- Si al momento de tomar las muestras el animal estaba vivo o con menos de 6 horas de haber muerto, la muestra se tomaba del lugar de la lesión, con hisopos estériles.

2.- Si el animal tenía más de 6 horas de haber muerto, se exponía un hueso largo del cadáver, el cual se fracturaba evitando al máximo contaminar la médula ósea y con el hisopo estéril se tomaba la muestra.

3.- Las muestras se colocaron en tubos con tapón de rosca y se identificaron en número progresivo y de acuerdo a su procedencia conforme a la distribución municipal dada por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (47, 48, 49).

4.- Las muestras se transportaron al laboratorio de bacteriología de anaerobios.

5.- Las muestras eran mantenidas en refrigeración hasta el momento de ser procesadas.

2.4.2 TÉCNICA DE CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLOSTRIDIOS PRODUCTORES DE MIOSITIS

2.4.2.1 Técnica de cultivo y aislamiento de clostridios.

El cultivo de los aislamientos se realizó a 37 C en el Sistema de anaerobiosis Gas Pak*, que consta de jarra de cultivo, indicador de anaerobiosis, catalizadores de aluminio-paladio y sobres generadores de hidrógeno y bióxido de carbono **,.

Se practicó la siguiente técnica de cultivo:

A.- Los hisopos se introdujeron en un tubo con medio caldo carne cocida y se incubaron por 24 horas, después, para determinar el tipo, morfología y proporciones de las bacterias presentes, se practicó la observación microscópica de un frotis del cultivo.

Si la observación demostraba:

A.- presencia de bacterias esporuladas gram positivas con morfología sugerente de ser clostridios y que no existía o había solo un número escaso de otras bacterias, para determinar si se trataba de bacterias anaerobias y purificar las colonias, la muestra se resembró en medio sólido y se incubó en anaerobiosis y aerobiosis.

B.- que en el tubo había bacterias sugerentes de ser clostridios mezclados con otros tipos en proporción elevada, entonces el tubo era sometido a un tratamiento de

* BBL Laboratories

** Bioxón de México S. A de C. V.

descontaminación selectiva, que consistió en calentarlo a 70C por 10 minutos.

C.- En ambos casos, para purificar los aislamientos de bacterias anaerobias, se realizaron los subcultivos necesarios.

D.- Una vez puras, para obtener los inóculos para usarse en las pruebas de identificación, se inocularon en medio base líquido peptona-extracto de levadora (PY) y se incubaron de 18 a 24 horas.

E.- Para mantener las cepas se utilizó el medio carne cocida.

2.4.2.2 Pruebas bioquímicas para determinación de especies.

La siembra de los diversos sustratos líquidos se realizó con pipetas tipo Pasteur, depositando en el fondo de los tubos aproximadamente 0.5 ml del inóculo. Mientras que los medios sólidos, como el agar yema de huevo, se sembraron por estría.

En el caso de los aislamientos de bacterias que correspondían al género Bacillus, se diferenciaron de B. anthracis con base en su morfología colonial y la observación de la presencia de cápsula.

2.4.2.3 Lectura de las pruebas bioquímicas.

La lectura de las pruebas de degradación de carbohidratos se realizó a los 5 y 10 días de incubación. de la siguiente forma:

A los cinco días de incubación de cada tubo inoculado, se tomó con pipeta pasteur aproximadamente 1 ml

del medio, se colocó en tubos de ensayo estériles y se les añadió una gota de azul de bromotimol, como indicador de pH. Si el color del medio tornaba a amarillo, indicaba que había ocurrido acidificación y que la prueba era positiva, si permanecía azul indicaba que no había cambio de pH y era negativa. En caso de variaciones intermedias, se consideraron como resultados positivos o negativos débiles (+,-,+).

A los diez días de incubación se realizó la lectura final en los tubos que habían resultado negativos a los cinco días. Pero en esta ocasión se agregó el colorante directamente a los tubos.

La prueba de indol y de reducción de nitratos, se realizó en el medio "Indol-Nitrate Medium" (BBL), y las lecturas como sigue: primero se determinó la producción de indol, añadiendo 6 gotas de reactivo de Kovacs y posteriormente se realizó la lectura de la reducción de nitratos, usando ácido sulfanílico y alfa-naftilamina, y si se requería completar la prueba, zinc en polvo.

La lectura de la prueba de producción de lecitinasa y de lipasa se realizó después de incubar 48 horas; la lecitinasa, se considero positiva al observar opacidad del medio alrededor de las colonias y la lipasa cuando se notaba un color iridiscente sobre las colonias. En ambos casos negativas cuando no había cambios en el medio.

La prueba de ureasa se realizó en la misma placa de agar yema de huevo de la prueba de lipasa y lecitinasa. Después de dejarla expuesta al aire 30 minutos, se le añadió

una gota de reactivo de ureasa a las colonias, dejando la caja a temperatura ambiente durante cuatro horas, la aparición de un color rosa en el área del crecimiento bacteriano se consideró como un resultado positivo.

Para la prueba de catalasa se tomó una asada de las colonias del mismo agar yema de huevo y se mezcló con una gota de agua oxigenada en una laminilla, o bien se puso una gota de agua oxigenada 5% sobre las colonias, en ambos casos la producción de burbujas indicó un resultado positivo.

La lectura de la prueba de esculina se realizó después de 10 días de incubación, añadiendo dos gotas de cloruro férrico al medio. Una coloración oscura se consideró como positiva y la ausencia de esta coloración como negativa.

Para la lectura de las prueba de reducción del almidón se añadió una gota de lugol al cultivo, una coloración de café claro o café oscuro indica la persistencia de almidón en el medio y por tanto un resultado negativo, su ausencia se registró como reducción o hidrólisis positiva. La acidificación del almidón se detectó añadiendo azul de bromotimol, si tornaba a amarillo, se consideró positiva y negativa si se mantenía el color azul.

2.4.2.4 Interpretación de las pruebas bioquímicas.

Una vez efectuadas las lecturas de las pruebas bioquímicas y de degradación de carbohidratos, se compararon los resultados con el Cuadro No. 3.1 "Identificación de Clostridios Productores de Miositis" (página 66), las cepas cuyos resultados no correspondieron a ésta, fueron comparadas con los cuadros del "Anaerobe Laboratory Manual" (28).

3.1 RESULTADOS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

En general el criterio de los autores revisados (8, 12, 13, 16, 28, 53, 54, 55, 59, 73), coincide para las siguientes características esperadas en la identificación de los clostridios productores de miositis:

1.- Son bastones gram positivos, aunque varían en su reactividad a la tinción de gram.

2.- Son catalasa negativos.

3.- Son anaerobios no aerotolerantes, aunque el límite superior del potencial de óxido-reducción (Eh) en el que pueden crecer difiere entre las cepas, y aun en la misma especie.

4.- Sus esporas son generalmente subterminales y ovales.

5.- Son móviles, excepto C. perfringens.

6.- Carecen de cápsula excepto C. perfringens.

7.- Digieren la gelatina.

8.- Son bacterias hemolíticas.

9.- Fermentan la glucosa.

10.- En su mayoría acidifican, coagulan y forman gas al crecer en medio leche descremada.

11.- No fermentan la sacarosa, excepto C. chauvoei.

12.- No producen ureasa, excepto C. sordellii.

Respecto a las características bioquímicas que sirven para la identificación de clostridios de interés para este estudio, se preparó el Cuadro No. 3.1, de acuerdo al criterio emitido por los autores citados anteriormente, misma que fue utilizada para la especiación de los clostridios aislados durante el trabajo.

Cuadro No. 3.1

Identificación de Clostridios Productores de Miositis

	ESPO- RAS %	AEROTO- LERANCIA %	GELA- TINA %	LECHE	LECI- TINASA	INDOL	LI- PASA	GLU- COSA	MAL- TOSA	LAC- TOSA	SACA- ROSA	SALI- CIN	NITRA- TOS	ESCU- LINA	UREA- SA	MOTI- LIDAD	HEMO- LISIS	ALMIDON
<u>C. chauvoei</u>	ST O	-	+	A (C) (D)	-	-	-	A	A	A	A	(-)	+	V	-	+	+	-
<u>C. septicum</u>	(ST) O	-	+	A C, D	-	-	-	A	A	A	-	A	V	V	-	+	+	-
<u>C. perfringens</u>	(ST) O	-	+	CGAD (FT)	+	-	-	A	A	A	-	V	V	-	+	-	+	r d
<u>C. sordellii</u>	ST O	-	+	CDB	+	+	-	A	A	-	-	-	(-)	+	+	+	+	-
<u>C. bifermentans</u>	ST O	-	+	CDB	+	+	-	A	A	-	-	(V)	(-)	+	-	+	+	-
<u>C. haemolyticum</u>	ST D	-	+	(B, A, C, D)	+	+	-	A	-	-	-	-	-	-v	-	+	+	-
<u>C. novyi A</u>	ST O	-	+	V	+	-	+	A	(a)	-	-	-	(-)	-	-	+	+	-
<u>C. novyi B</u>	ST O	-	+	(D)	+	-	-	A	a	-	-	-	(-)	-	-	+	+	-
<u>C. histolyticum</u>	ST O	+	+	CD (B)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<u>C. sporogenes</u>	ST D	-	+	CD (B)	(d)	(d)	+	A	(V)	-	(-)	V	(-)	-	-	+	(+)	-
<u>C. subterminale</u>	ST O	-	+	CD (B)	V ⁻	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	-

Esporas:
O = ovoides
ST = subterminales
T = terminales
V = variable
D = dudosas
() = > 80% autores

Pruebas bioquímicas y de fermentación de azúcares:
A = acidificación (mas de 80% autores)
V = criterio diversificado = variable
- = negativo segun más de 80% de autores
+ = positivo más de 80% de autores
() = criterios variables (> 80 % autores)
d = dudoso
r = reducción parcial

Cambios en leche:
D = digestión total
C = coagulación
B = enegrecimiento
() = mayoría > 80% autores
G = gas
A = acidificación
FT = fermentación tormentosa
V = variable

3.2 RESULTADO DE LOS EXAMENES BACTERIOLÓGICOS

En total se recibieron 112 muestras procedentes de los tres estados que comprendió el estudio, 46 procedentes de Nuevo León (NL), 27 de Tamaulipas (Tamps), 13 de Coahuila (Coah) y otras 26 muestras que se colectaron de animales de la zona bajo estudio, pero cuyo municipio no pudo ser identificado y que para fines del estudio se consideraron como muestras "sin clasificación" (S/C).

No se pudo determinar si las muestras procedían de animales vacunados contra miositis clostridiales, ni si había evidencias clínicas de proceder de animales con cuadros sugestivos de miositis.

De esas 112 muestras, como se aprecia en el Cuadro No. 3.2, catorce se recibieron en malas condiciones y por ello no se trabajaron (NP), y de otras 11 no fue posible recuperar bacterias y por ello fueron consideradas "negativas".

Cuadro No. 3.2					
Origen de las Muestras Negativas y No Procesadas					
Muestras	NL	Tamps	Coah	S/C	Total
Negativas	7	0	0	4	11
No procesadas	8	2	2	2	14
Total:	15	2	2	6	25

NL = Nuevo León; Tamps = Tamaulipas; Coah = Coahuila;
S/C = sin clasificar.

En el Cuadro 3.3, se puede apreciar el origen de los aislamientos. Se ve que de las 87 muestras restantes, se obtuvieron 117 aislamientos de bacterias, de los cuales 67 corresponden al género Clostridium, 33 al género Bacillus, 16 a cocos anaeróbios y uno al género Fusobacterium.

Cuadro No. 3.3

Origen de los Aislamientos

Aislamientos	NL	Tamps	Coah	S/C	Total	%
<u>Clostridium</u>	30	15	8	14	67	57.3
<u>Bacillus</u>	10	10	4	9	33	28.2
cocos anaerobios	2	7	2	5	16	13.7
<u>Fusobacterium</u>	1	0	0	0	1	0.9
Total:	43	32	14	28	117	100.0

NL = Nuevo León; Tamps = Tamaulipas; Coah = Coahuila; S/C = sin clasificar.

En el Cuadro No. 3.4, se observa la frecuencia y la significancia nosológica de las cepas del género Clostridium aisladas en el trabajo, de acuerdo a su procedencia. Como se ve se aislaron 67 cepas, de ellas, 27 son consideradas como "productoras de miositis" de acuerdo a la clasificación de clostridios, que se adaptó para este trabajo, y 34 "no productoras de miositis". No se logró determinar la especie de 6 cepas, ya que los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas que se les practicaron no corresponden a los esperados al compararlas con los Cuadros de identificación utilizadas.

Así mismo en el Cuadro No. 3.5, se observa que el clostridio "productor de miositis" que se recuperó en mayor

frecuencia fue el C. sordellii con 16 aislamientos, siguiéndole en orden, el C. chauvoei con cinco aislamientos, así como el C. novyi y el C. septicum con tres cada uno.

Cuadro No. 3.4

Significancia Nosológica de los Aislamientos de Clostridium

Aislamientos	NL	Tamps	Coah	S/c	Total	%
prod miositis	12	2	4	9	27	40.3
no prod miositis	15	12	3	4	34	50.7
no identificados*	3	1	1	1	6	9.0
Total:	30	15	8	14	67	100.0

NL = Nuevo León; Tamps = Tamaulipas; Coah = Coahuila; S/C = sin clasificar; * = no aplica.

Cuadro No. 3.5

Frecuencia y Origen de los Aislamientos de los "Clostridios Productores de Miositis"

Especie	NL	Tamps	Coah	S/c	Total	%
<u>C. sordellii</u>	6	2	3	5	16	59.3
<u>C. chauvoei</u>	4	0	0	1	5	18.5
<u>C. novyi</u> tipo B	1	0	1	1	3	11.1
<u>C. septicum</u>	1	0	0	2	3	11.1
Total:	12	2	4	9	27	100.0

NL = Nuevo León; Tamps = Tamaulipas; Coah = Coahuila; S/C = sin clasificar.

En el Cuadro No. 3.6, se observa la especie, procedencia y el porcentaje del aislamiento de las diferentes especies de Clostridium que son consideradas como "no productoras de miositis". Como se puede ver, el C. perfringens se recuperó en 17 ocasiones, seguido por el C. bifermentans y el C. cadaveris, de los cuales se obtuvieron

seis cepas respectivamente, y por último se encuentran otras cinco especies, de las cuales se logró sólo aislar una cepa de cada una.

Cuadro No. 3.6

Frecuencia de Aislamientos de Clostridios
"No Productores de Miositis"

Especie	NL	Tamps	Coah	S/c	Total	%
<i>C. perfringens</i>	6	7	3	1	17	50.0
<i>C. bifermentans</i>	2	3	0	1	6	17.6
<i>C. cadaveris</i>	3	1	0	2	6	17.6
<i>C. subterminale</i>	1	0	0	0	1	6.1
<i>C. felsinerum</i>	1	0	0	0	1	6.1
<i>C. baratii</i>	1	0	0	0	1	6.1
<i>C. propionicum</i>	1	0	0	0	1	6.1
<i>C. aurantibutyricum</i>	0	1	0	0	1	6.1
Total:	15	12	3	4	34	100.0

NL = Nuevo León; Tamps = Tamaulipas; Coah = Coahuila; S/C = sin clasificar.

En el Cuadro No. 3.7, se observa la frecuencia de los cultivos de clostridios puros o mixtos.

Cuadro No. 3.7

Frecuencia de Cultivos Puros y Mixtos de Clostridios

Especie	Frecuencia / %		Total cepas
	puro	mixto	
<i>C. sordellii</i>	13/ 19.4	3/ 4.5	16
<i>C. chauvoei</i>	2/ 3.0	3/ 4.5	5
<i>C. septicum</i>	0/ 0.0	3/ 4.5	3
<i>C. novyi</i>	1/ 1.5	2/ 3.0	3
<i>C. perfringens</i>	5/ 7.5	12/ 17.9	17
<i>C. bifermentans</i>	4/ 6.0	2/ 3.0	6
<i>C. cadaveris</i>	0/ 0.0	6/ 9.0	6
Otras especies*	2/ 3.0	3/ 4.5	5
No identificadas	5/ 7.5	1/ 1.5	5
Total	32/ 47.8	35/ 52.2	67

* = *C. subterminale*, *C. felsinerum*, *C. baratii*,
C. propionicum, *C. aurantibutyricum*

Por otro lado, en el Cuadro No. 3.8 se observa la frecuencia de los aislamientos de bacterias que no corresponden al género Clostridium. Así tenemos que se recuperaron 33 cepas de Bacillus spp, las que de acuerdo a los exámenes practicados resultaron ser diferentes a la especie B. anthracis; así como 16 cepas de cocos anaerobios y una de Fusobacterium spp.

Cuadro No. 3.8						
Frecuencia de Aislamientos Diferentes a <u>Clostridium</u>						
Especie	NL	Tamps	Coah	S/C	Total	%
<u>Bacillus</u> spp*	10	10	4	9	33	66.0
Cocos anaerobios	2	7	2	5	16	32.0
<u>Fusobacterium</u>	1	0	0	0	1	2.0
Total:	13	17	6	14	50	100.0

* Especies diferentes a B. anthracis.

NL = Nuevo León; Tamps = Tamaulipas; Coah = Coahuila; S/C = sin clasificar.

3.2.1 MUESTRAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN

De las 112 muestras recibidas en el laboratorio, 46 procedían de 17 municipios de los 54 en que está dividido el Estado Nuevo León, ocho de ellas no fueron procesadas debido a que no se encontraban en condiciones adecuadas para el trabajo de laboratorio y de otras siete no se logró aislar anaerobios, por lo que se consideraron como "negativas".

La procedencia de las muestras de Nuevo León se observa en el Cuadro No. 3.9. Y en el Cuadro No. 3.10, el origen de los aislamientos de clostridios productores de miositis que se realizaron a partir de ellas. Tres de esos aislamientos no lograron ser identificados.

Cuadro No. 3.9		
Origen de las Muestras Recibidas de Nuevo León		
Municipio	Número de Muestras por Municipio	Total Muestras
Allende, Lampazos de Naranjo, Los Ramones, Monterrey	1	4
Bustamante, Villaldama, Doctor Arroyo, Galeana, Doctor Coss, Cerralvo, China, General Zuázua, General Terán	2	18
Doctor González	4	4
Anáhuac, Higueras	5	10
Los Herreras	10	10

Cuadro No. 3.10		
Origen de los Aislamientos de Clostridios "Productores de Miositis" de Nuevo León		
Municipio	Especie	Cepas por Municipio
Anáhuac	<i>C. chauvoei</i>	1
Allende	<i>C. chauvoei</i>	1
Lampazos de Naranjo	<i>C. chauvoei</i>	1
Los Herreras	<i>C. chauvoei</i>	1
Los Herreras	<i>C. sordellii</i>	2
Doctor González	<i>C. sordellii</i>	2
China	<i>C. sordellii</i>	1
Anáhuac	<i>C. sordellii</i>	1
Anáhuac	<i>C. septicum</i>	1
General Terán	<i>C. novyi</i> tipo B	1
	Total	12

Asimismo, en el Cuadro No. 3.11 se aprecia la procedencia de las muestras de Nuevo León, a partir de las cuales se logró recuperar 15 cepas de 7 diferentes especies de clostridios "no productoras de miositis".

Cuadro No. 3.11		
Origen de los Aislamientos de Clostridios "No Productores de Miositis" de Nuevo León		
Especie	Cepas por Municipio	Total
<u>C. perfringens</u>	Anáhuac (1), Los Herreras (1), Galeana (1), Higueras (1), China (1), Allende (1)	6
<u>C. cadaveris</u>	Higueras(1), Galeana (1), Los Herreras (1)	3
<u>C. bifementans</u>	Bustamante (1), General Terán (1)	2
<u>C. felsinerum</u>	Anáhuac (1)	1
<u>C. baratii</u>	Doctor González (1)	1
<u>C. subterminale</u>	General Terán (1)	1
<u>C. propionicum</u>	Higueras (1)	1
	Total	15

De igual manera, en el Cuadro No. 3.12, se observa el origen de los aislamientos diferentes a Clostridium, de muestras procedentes de Nuevo León.

Cuadro No. 3.12		
Origen de los Aislamientos Diferentes a <u>Clostridium</u> del Estado de Nuevo León		
Aislamiento	Municipio (cepas)	Total
<u>Bacillus</u> spp	Anáhuac (2), Los Ramones (2), Doctor Coss (2), China (1), Doctor Arroyo (1), Monterrey (1), Villaldama (1)	10
Cocos anaerobios	Galeana (1), Anáhuac	2
<u>Fusobacterium</u> spp	Los Herreros (1)	1

En el Cuadro No. 3.13, se observa la procedencia de ocho muestras de Nuevo León que no fueron procesadas por encontrarse en mal estado y de las siete que resultaron negativas.

Cuadro No. 3.13

Origen de las Muestras No Procesadas y Negativas del Estado de Nuevo León

No procesadas	Cerralvo (1), Higuera (3), Bustamante (1), Los Herreras (1), General Zuázua (1), Villaldama (1)
Negativas	Los Herreras (3), Anáhuac (1), Higuera (1), Doctor González (1), Cerralvo (1)

3.2.2 MUESTRAS DEL ESTADO DE COAHUILA

De las 112 muestras que se recibieron en el trabajo, 13 provenían de cuatro de los 38 Municipios de Coahuila, ocho de ellas procedían de Candela, tres de Saltillo, una de Cuatro Ciénegas y una de Zaragoza.

En el Cuadro 3.14, se observa la procedencia y la frecuencia de los aislamientos de clostridios "productores de miositis" de muestras procedentes del Estado de Coahuila.

Cuadro No. 3.14

Origen y Significancia Nosológica de los Aislamientos de Clostridios de Coahuila

Aislamientos	Significancia	Municipio (cepas)
<u>C. sordellii</u>	(a)	Candela (3)
<u>C. novyi</u> tipo B	(a)	Candela (1)
<u>C. perfringens</u>	(b)	Candela (1), Saltillo (1), Zaragoza (1)
No identificado	(c)	Saltillo (1)

(a) = Productor de miositis; (b) = no productor de miositis;
(c) = no aplica

Como se puede apreciar, se aislaron cuatro cepas de clostridios "productores de miositis", tres de ellas se

identificaron como C. sordellii y una como C. novyi tipo B; mientras que de los clostridios "no productores de miositis" tres correspondieron a la especie C. perfringens; una cepa no se pudo identificar.

También se recuperaron tres cepas de Bacillus diferentes a B. anthracis de las muestras procedentes de Candela y de Cuatro Ciénegas y dos de cocos.

3.2.3 MUESTRAS DEL ESTADO DE TAMAULIPAS

Del Estado de Tamaulipas se recibieron 27 muestras, de 6 de sus 43 municipios. Una de ellas procedente de Tampico y otra de Aldama no se procesaron debido a la mala condición de la muestra.

En la Cuadro No. 3.15 se observa que del municipio que más recibieron fue de Villagrán, siguiendo Aldama, Nuevo Guerrero y Tampico, Llera de Canales y González.

Cuadro No. 3.15	
Origen de las Muestras de Tamaulipas	
Municipio	Número de muestras
Villagrán	7
Aldama	6
Tampico	5
Ciudad Nuevo Guerrero	5
Llera de Canales	3
González	1

Como se puede observar en el Cuadro No.3.16, se aislaron 2 cepas C. sordellii, mientras que de los clostridios "no productores de miositis" se aislaron 7 cepas

de C. perfringens, tres de C. bifermentans, una de C. aurantibutyricum y de C. cadaveris, y un aislamiento no pudo ser identificado.

Además se aislaron diez cepas de Bacillus spp, diferentes a B. anthracis y siete más correspondieron a cocos anaerobios.

Cuadro No. 3.16

Origen y Significancia Nosológica de los Aislamientos de Clostridios de Tamaulipas

Aislamiento	S*	Municipio (cepas)	Total
<u>C. sordellii</u>	a	Llera de Canales (2),	2
<u>C. perfringens</u>	b	Aldama (2), Ciudad Nuevo Guarrero (2), González (1) Tampico (1), Villagrán (1)	7
<u>C. bifermentans</u>	b	Villagrán (2), Tampico (1)	3
<u>C. aurantibutyricum</u>	b	Villagrán (1)	1
<u>C. cadaveris</u>	b	Tampico (1)	1
No identificado	c	Llera de Canales (1)	1

S*= significancia. a= productores de miositis, b= no productores de miositis, (c) no aplica

3.2.4 MUESTRAS SIN CLASIFICACIÓN GEOGRÁFICA

De las 112 muestras del estudio, en 26 no pudo ser determinado el municipio de origen a pesar de proceder de la zona en estudio, dos de ellas estaban en mal estado y no se procesaron, y de otras cuatro no se logró recuperar bacterias.

Como se puede apreciar en el Cuadro No. 3.17, del resto de las muestras se logró el aislamiento de 28 cepas de

bacterias, nueve de clostridios "productoras de miositis", cinco de C. sordellii, dos de C. septicum, una de C. novyi tipo B y una de C. chauvoei. Otros cuatro "no productoras de miositis" se recuperaron: dos de C. cadaveris, una de C. bifermentans y de C. perfringens, y de uno más no se pudo establecer la especie, ya que no concordaron sus resultados con los de los Cuadros de identificación. Asimismo se obtuvieron 9 aislamientos de Bacillus diferentes a B. anthracis y cinco de cocos anaerobios.

Cuadro No. 3.17			
Aislamientos de Clostridios de las Muestras Sin Clasificación y su Significancia Nosológica			
Aislamiento	Significancia	Número cepas	%
<u>C. sordellii</u>	a	5	35.7
<u>C. septicum</u>	a	2	14.3
<u>C. chauvoei</u>	a	1	7.1
<u>C. novyi</u> tipo B	a	1	7.1
<u>C. bifermentans</u>	b	1	7.1
<u>C. cadaveris</u>	b	2	14.3
<u>C. perfringens</u>	b	1	7.1
<u>Clostridium</u> spp.	c	1	7.1
Total		14	100.0

a = "productor de miositis"; b = "no productor de miositis";
c = no aplica, no identificado.

4 DISCUSIÓN

4.1 DISCUSIÓN SOBRE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Dentro de la literatura revisada (8, 12, 13, 16, 28, 53, 54, 55, 59, 73), se encontró que la mayoría de las pruebas que mencionan los autores para lograr la diferenciación de especies de clostridios productores de miositis; v.g., C. chauvoei, C. septicum, C. sordellii, C. novyi tipos A, B, y D, así como del C. histolyticum y C. perfringens, son: hidrólisis de la gelatina; fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa, salicín e indol; así como la producción de lipasa y lecitinasa.

Otros añaden la detección de la producción de ureasa, la reducción de nitratos, la fermentación de la maltosa y del manitol; la reducción y coagulación de leche; y algunos mencionan además la fermentación de la manosa. Mientras que la prueba de esculina y la reducción o acidificación del almidón, así como la producción de esporas y hemólisis son poco mencionadas para la diferenciación de los clostridios productores de miositis.

Las principales diferencias que se encontraron en el criterio de los autores revisados, son las siguientes:

Clostridium chauvoei

Los autores coinciden en general en la descripción de los resultados esperados para el C. chauvoei, salvo en el caso del salicín, la sucrosa, la reducción de nitratos y en la reducción de la esculina.

Para el salicín, su fermentación es considerada

negativa por siete autores (8, 12, 13, 52, 54, 59, 73), uno más (53) menciona que la fermenta débilmente y otro (28) que es variable.

De la reducción de nitratos, el criterio de los autores difiere más, tres (13, 53, 55) dicen que sí los reducen, dos (8, 16) que débilmente, y uno más (37) que es variable.

Clostridium septicum

Cinco autores (8, 12, 13, 16, 59) mencionan que C. septicum, fermenta el salicín, tres más (28, 54, 55), dicen que lo hace en forma variable, y uno (53) que sólo en forma débil.

Sobre la reducción de nitratos, dos autores (28, 53) dicen que es variable, dos que es débil (16, 73), y uno que es dudosa (55).

Clostridium sordellii

El criterio de los autores coincide en que el C. sordellii y el C. bifermentans, son sumamente similares entre sí, pero expresan que existen diferencias que ayudan a separar estas dos especies, mismas que se mencionan a continuación. Así acerca de la reducción de los nitratos cuatro autores mencionan que no los reducen (8, 16, 28, 53), uno que lo hacen en forma débil (13) y otro más que lo hacen en forma dudosa (55).

Nueve autores coinciden en que el C. sordellii sí fermenta el salicín (8, 12, 13, 16, 28, 54, 53, 55, 73), mientras que para el C. bifermentans, tres dicen que no lo

hace (28, 54, 55), dos más mencionan que es variable (8, 16), y uno más dice que lo hace en forma débil (53).

Los autores mencionan que el C. sordellii, produce urea, mientras que el C. bifermentans no lo hace, siendo esta característica la principal diferencia entre las cepas.

Asimismo, el aspecto de patogenicidad es importante para diferenciarlas, pero difícil de evaluar, ya que se han encontrado cepas de C. sordellii que no son patogénicas, pero no se han encontrado cepas de C. bifermentans con esta capacidad (55).

Clostridium perfringens (C. welchii)

En el caso de esta especie, se presentan también diferencias respecto a los resultados expresados por los autores.

En el caso de la fermentación del salicín, cinco autores (8, 16, 53, 54, 55) dicen que es variable, Cottral (12) menciona que la mayoría de las cepas lo hacen, y otro más (28) dice que es negativa débil.

La producción de nitratos es positiva según tres autores (8, 13, 16), dudosa de acuerdo a otro (54), negativa para otro (53) y variable para uno más (28).

La producción de ureasa es negativa de acuerdo a tres autores (8, 13, 28), negativa débil según otro (53), y uno más dice que es dudosa (54).

Clostridium novyi (C. oedematiens)

El C. novyi tipo A, tiene divergencias en los resultados esperados: la fermentación de la maltosa es

positiva de acuerdo a tres autores (12, 53, 73), variable según otros tres (16, 28, 55) y dudosa por otro más (54). La reducción de nitratos es considerada negativa por un autor (28), negativa débil por dos (8, 16), dudosa uno (54), y positivo débil otro más (53).

Respecto a la fermentación de la maltosa, cinco autores, dicen que el C. novyi tipo B es positivo (8, 12, 28, 54, 55) y uno dice que es variable (53). Por otro lado sobre la reducción de nitratos, dos mencionan que no lo reducen (8, 28), uno dice que sí (53) y otro más expresa que el resultado es dudoso (54).

También difiere de la descripción del resultado esperado de la maltosa para C. novyi tipo C, dos dicen que sí la fermenta (54, 73), otro más lo niega (55).

Clostridium histolyticum

Los criterios de los autores revisados coinciden en general, variando sólo respecto a lo esperado sobre la prueba de ureasa, uno dice que sí produce (13), mientras que tres más lo niegan (28, 53, 54).

Los resultados de las pruebas bioquímicas practicadas a las cepas controles concordaron con el cuadro de identificación de clostridios productores de miositis que se preparó en este trabajo, debido a ello se considera que éste cumple su cometido para ser empleado en forma rutinaria con este fin.

4.2 DISCUSIÓN SOBRE LA COLECCIÓN, ENVÍO Y PROCESO DE LAS MUESTRAS

El estudio bacteriológico para el diagnóstico de miositis clostridiales se encuentra con el inconveniente de que los clostridios son bacterias anaeróbicas presentes en el intestino de los animales en forma normal y que al morir éstos, aunque no hayan sido productores de su muerte, invaden el resto de su organismo en forma postmortem aproximadamente en 6 horas. Por eso, para disminuir la probabilidad de que los aislamientos sean contaminantes, no se recomienda tomar muestras después de ese tiempo y al emitir un resultado en forma conservadora siempre que se base en el aislamiento a partir de muestras de animales muertos.

Por otro lado, de acuerdo a Berkhoff y Redenberger (4), aunque los aislamientos no estén obligadamente en relación al supuesto proceso patológico del animal del cual se tomó la muestra, sí pueden tener un papel etiológico y por ello se puede justificar el proceso de muestras que para otro tipo de bacteriología se considerarían en mal estado. De tal manera que es posible obtener muestras útiles para estudios epidemiológicos en el caso de miositis clostridiales, aunque el tiempo de toma de muestras sea mayor a las 6 horas postmortem.

Para casos en que los animales tengan más de las seis horas de haber muerto, Seifert y col. (50, y Seifert, H. S. H., com. pers. 1986), describen el método de colección de muestras seguido en este estudio, el cual se basa en el

hecho de que existe una fase septicémica previa a la muerte del animal durante la cual los clostridios se alojan en médula ósea (55, Seifert, H. S. H., com. pers, 1985), donde la misma estructura ósea impide la penetración de bacterias contaminantes postmortem a su interior.

Sin embargo, durante la manipulación del hueso al exponer la médula ósea y obtener la muestra con el hisopo, existe la posibilidad de introducir bacterias presentes en piel y tejidos adyacentes al hueso; por ello, en aquellas muestras en las que la observación microscópica del primoaislamiento en medio carne cocida, mostraba la presencia de bacterias no características del género Clostridium (Gram positivas, esporuladas, de tamaño grande), en números relativos superiores a los de las bacterias características, se les practicó un proceso físico que permitió disminuir su cantidad o eliminarlas, sin el uso de métodos químicos o de antimicrobianos.

Se considera que este proceso fue esencial para recuperar clostridios a partir de muestras en las que se notó la presencia de otras bacterias no esporuladas, aunque aparentemente no tuvo efecto sobre cepas esporuladas, vg. Bacillus spp., mismas que se recuperaron en proporción elevada a partir de las muestras, de la misma forma que el C. perfringens, mismo que consideramos como un indicador de la contaminación postmortem.

4.3 DISCUSIÓN SOBRE LOS AISLAMIENTOS

Respecto a los resultados de los aislamientos de clostridios productores de miositis de este trabajo, se considera muy interesante haber realizado 16 aislamientos de C. sordellii, cinco aislamientos de C. chauvoei y tres de C. septicum, ya que no concuerdan con lo descrito por Torres y col. (64) y los hallazgos de Williams (70), ya que ellos describen a C. chauvoei como el organismo que con más frecuencia se encuentra en problemas asociados con miositis clostridiales, seguido por C. septicum, mientras que C. sordellii se ha descrito con menos frecuencia en pequeñas porciones de lugares áridos (54) y frecuentemente en combinación con otros clostridios como el C. perfringens, C. histolyticum (59).

Parte de la diferencia encontrada puede ser explicada porque Williams (70) únicamente trabajó muestras seleccionadas que no mostraban evidencias de putrefacción y la mayoría provenían de animales que tenían menos de ocho horas de haberseles practicado el examen postmortem y la toma de muestras. Mientras en este trabajo se procesaron muestras de campo que procedían muchas de ellas de animales con varios días de haber muerto.

Aunque no se conoció el estado vacunal de los animales muestreados, se puede suponer de acuerdo a los resultados, que existe una inmunidad de hato en los animales de la región que se trabajó, debida posiblemente a la práctica generalizada entre los productores de realizar inmunizaciones a su ganado para prevenir infecciones de C.

chauvoei y C. septicum y por ello el número de muestras con esas bacterias fué menor. Si ésto fuera cierto indicaría que la calidad de los productos elaborados por los laboratorios comerciales es buena, así como el mantenimiento de la cadena fría, desde la salida de los laboratorios hasta el momento de la aplicación.

Desafortunadamente ninguna de estas suposiciones puede ser apoyada con fuerza, ya que no se realizan diagnósticos de laboratorio que confirmen la etiología de las muertes súbitas. Además, se sabe de fallas de potencia de los biológicos producidos en nuestro país (32); y que el cuidado que se da a los biológicos en general es pobre, ya que muchas veces no se da importancia a su conservación.

De acuerdo a los resultados, aparentemente la distribución del C. sordellii es más alta en esta región, que lo descrito por otros autores (54) para otras zonas, esto podría ser debido a que actualmente, de los biológicos comerciales nacionales, solo uno posee dentro de su fórmula antígenos de este germen y aunque se sabe de la introducción de productos polivalentes de los Estados Unidos, sus resultados aparentemente no son satisfactorios (51), aunque de acuerdo a algunos productores, cuando menos en una explotación, el problema ha sido controlado con estos productos. Esto indica por un lado, que aparentemente existe falta de inmunidad debida a la poca disponibilidad de biológicos con C. sordellii, pero por otro lado, también falta de inmunidad en animales vacunados, debido a la mala

calidad de los biológicos, ya sea desde su producción o por descuido de la cadena fría.

Aunque no se realizaron estudios sobre la patogenicidad de las cepas aisladas, como sugieren Sterne y Batty para dar un diagnóstico positivo (59), aparentemente este germen representa un riesgo potencial para los animales de la zona y es claro que se requieren estudios epidemiológicos restringidos a zonas más pequeñas, que permitan, por un lado controlar la toma de la muestras para evitar lo más posible contaminar la muestra, y lograr identificar tanto a los agentes involucrados en los brotes, y por otro conocer su distribución. Es deseable que los resultados de dichos estudios permitan dar recomendaciones encaminadas a controlar el problema de las clostridiasis con base a biológicos que contengan es su fórmula a los antígenos de los clostridios presentes en la zona.

Por otro lado, Torres y col (64), informan el aislamiento de C. septicum, de muestras procedentes de Coahuila, así como C. novyi de Tamaulipas, y de Pánuco, Ver., ciudad colindante con Tamaulipas. En éste estudio se detectó la presencia de C. septicum en Nuevo León y en dos muestras Sin Clasificación. Así como C. novyi en Nuevo León, Coahuila. y en una muestra Sin Clasificación. Estos resultados indican la posibilidad de que sean organismos con una amplia distribución en la zona. Sin embargo, así como en el caso anterior, los estudios son muy dispersos y escasos para dar recomendaciones o conclusiones sobre la importancia

epidemiológica que cada clostridio juega en la presentación de las miositis en la zona.

Se considera que las cepas de C. perfringens o de Bacillus spp, bacterias contaminantes postmortem de rápido crecimiento y abundantemente distribuidas en la naturaleza, pudieron ocultar cepas de clostridios "productores de miositis" con tasa de crecimiento mas lenta y por ello no se hayan detectado. De acuerdo a las características culturales observadas, ninguna de las cepas de Bacillus que se aislaron concordó con la especie B. anthracis.

Por otro lado, el aislamiento de las cinco cepas de C. bifermentans, se considera es debido a que es un germen ampliamente distribuido en la región, lo que concuerda con Smith (58), quien menciona que se le encuentra frecuentemente en muestras clínicas. O bien, puede ser que algunos de esos aislamientos sean cepas de C. sordellii, con baja tasa de producción de ureasa y que debido a ello se hayan identificado en forma equivocada como C. bifermentans, hipótesis que implicaría que la importancia del C. sordellii como patógeno potencial en la zona sea más elevada.

Asimismo, el C. cadaveris que también se recuperó en cinco ocasiones mostró tener una amplia distribución en la zona, lo que concuerda con Smith y Holdeman (53), quienes dicen que se encuentra en casi todas las muestras de suelo cultivado anaeróbicamente y se asocia a otros clostridios en gangrenas gaseosas de humanos, en las que aparentemente tiene un papel sinérgico.

Sobre el hallazgo de otras cepas de clostridios que se encontraron en el estudio con menor frecuencia se considera que son especies de clostridios contaminantes de la muestra o que pudieron ser acompañantes de algún patógeno. Esto último se ve como muy probable, ya que (19, 67) los estudios de las infecciones de gangrenas gaseosas en humanos, al igual que otras infecciones por gérmenes anaeróbios, han mostrado que generalmente son infecciones mixtas, o bien, cuando al tomar la muestra no es posible separar a la flora normal, haciéndose difícil o imposible conocer la significancia relativa de los diferentes aislamientos. Dentro de estos gérmenes asociados se encuentran los siguientes (58): C. perfringens tipo A; C. novyi tipo A, con menos frecuencia el tipo B; asimismo el C. sporogenes; el C. tertium y el C. septicum. Además de otros géneros, como: Staphylococcus, Escherichia, Proteus y Bacillus.

Se obtuvieron algunos aislamientos de cepas de clostridios que no pudieron ser clasificadas por medio del cuadro que se preparó en este trabajo, ni con las tablas del Anaerobe Laboratory Manual (28), lo que era de esperarse, ya que se sabe de especies de anaeróbios, en éste caso clostridios, en las que para lograr su clasificación se requiere de ayuda de técnicas cromatográficas. Además, se sabe muy poco de ellas, tanto en su papel en la naturaleza, como como productoras de enfermedad en forma directa como en infecciones mixtas.

1.- Se logró el aislamiento de los siguientes clostridios productores de miositis que no estaban reportados con anterioridad en la zona estudiada:

- C. chauvoei, de Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila
- C. septicum, de Nuevo León y Tamaulipas
- C. sordellii, de Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas
- C. novyi tipo B, de Nuevo León y Coahuila.

2.- Se requieren estudios epidemiológicos en áreas geográficas pequeñas para poder contar con muestras representativas de los problemas. Esto es, de animales con pocas horas de haber muerto o enfermos, con el fin de evitar contaminaciones posmortem, y de esa forma:

a) aclarar la importancia del Clostridium sordellii en la zona, ya que la frecuencia de sus aislamientos en este trabajo indica que potencialmente es un agente etiológico importante en ella.

b) determinar la importancia de otros clostridios productores de miositis como el C. chauvoei y C. septicum en la zona.

c) recomendar a laboratorios la producción de biológicos, de acuerdo a las especies de clostridios involucradas presentes en la zona.

d) recomendar a médicos veterinarios y productores el empleo de los biológicos específicos.

3.- El método descrito por Seifert (50), para el

diagnóstico de miositis clostridiales, en animales que tienen más de 6 horas de muertos, no es útil como método de diagnóstico debido a la posibilidad de introducir contaminantes a la muestra, pero sí para estudios epidemiológicos en que se quiera únicamente demostrar la existencia de especies de clostridios en una zona.

4.- Se considera que el cuadro de identificación de clostridios productores de miositis, que se preparó en este estudio con base en los publicados por diferentes autores, es de utilidad.

5.- Se aislaron cepas de clostridios diferentes a las consideradas como productoras de miositis, que no fue posible colocar dentro de una especie con el cuadro de Identificación que se preparó en este trabajo, ni con el Anaerobe Laboratory Manual de la Universidad de Virginia (28). Cepas cuyo valor nosológico se desconoce y en cuya clasificación puede ser muy útil el auxilio de otras técnicas, como la cromatografía de gases.

6.1 MEDIOS DE CULTIVO *

Medio Base Líquido - Peptona Extracto de levadura (PY)

peptona -----	2.0 g
tripticasa -----	0.5 g
extracto de levadura -----	0.5 g
solución de resazurina -----	0.4 ml
solución de sales -----	4.0 ml
agua destilada -----	100.0 ml
cisteína HC1.H2O -----	0.05 g

La cisteína se añade después de que el medio es hervido, pero antes de ser servido y esterilizado. Se le puede agregar agar en concentración de 0.5 a 0.05% para reducir la convección y retardar la oxidación.

Medio Base Sólido - PYA

Este medio puede ser utilizado en forma sólida si se le añade de 4 a 8% de agar, de acuerdo a la consistencia deseada, para inhibir el crecimiento en oleadas ("swarm") que presentan algunos clostridios.

Medio Carne Cocida de Robertson

(Modificado por el Instituto Politécnico de Virginia (28).

carne magra (libre de grasa) -----	500.0 g
agua destilada -----	1000.0 ml
NaOH 1 Normal -----	25.0 g

Use carne magra, o de caballo. Remueva la grasa y el tejido conectivo antes de moler. Mezcle la carne, el agua y el hidróxido de sodio y hiérvase agitando lentamente, enfríe a temperatura ambiente. Remueva la grasa de la superficie y filtre reteniendo la carne y el filtrado. Al filtrado añada agua suficiente para restaurar el volumen original de un litro y agregue:

tripticasa -----	30.0 g
extracto de levadura -----	5.0 g
fosfato de potasio -----	5.0 g
solución de resazurina -----	4.0 ml

Hierva, enfríe y añada 0.5 g de cisteína. Ajuste el pH. Sirva 7 ml en tubos a los que se les ha introducido la carne (use una parte de partículas de carne para 4 ó 5 de líquido). Esterilice a 120 C por 20 minutos. Enfríe rápidamente y apriete el tapón tan pronto se haya enfriado. Verifique que el pH este entre 7 y 7.4.

* Tomados de Holdeman, L. V. y col (28)

Medio Basal Smith y Holdeman (1968)

neopeptona (o equivalente) -----	20.0	g
extracto de levadura -----	5.0	g
cisteína hidrocloreto -----	0.3	g
KH ₂ PO ₄ -----	0.5	g
NaCl -----	0.5	g
agar -----	0.5	g
agua destilada -----	1000.0	ml

Se puede utilizar como alternativa del Medio Base. Ajuste el pH a 7.4 con NaCl. Sirva en tubos con tapón de rosca y esterilice a 120 por 15 minutos. Enfríe rápidamente y apriete los tapones.

Para utilizarlo en pruebas de fermentación añada 1 ml de solución de azul de bromotimol

Para usarse en pruebas de licuefacción de gelatina, añada gelatina 5%.

Medio Agar Sangre Anaeróbico

infusión cerebro Corazón -----	3.7	g
extracto de levadura -----	0.5	g
agua destilada -----	100.0	ml
resazurina solución -----	0.4	ml
agar -----	2.5	g

Hierva, enfríe y agregue:

cisteína HCl.H ₂ O -----	0.05	g
-------------------------------------	------	---

Esterilice, enfríe a 60 C y agregue 4 ml de sangre estéril, sirva en cajas petri.

Este medio no es prereducido, por lo que se debe preparar en la cantidad que se va a utilizar cada ocasión. Para facilitar ésto, se puede tener tubos ya preparados con 10 ml del medio BHIA, a los que, después de disolverlos, en baño maría, se le agregan 0.4 ml de sangre.

Agar Yema de Huevo de McClung-Toabe (modificado) (EYA)

peptona o tripticasa -----	20.0	g
Na ₂ HPO ₄ -----	2.5	g
NaCl -----	1.0	g
MgSO ₄ , sol. 5% -----	0.1	ml
glucosa -----	1.0	g
agar -----	12.5	g
agua destilada -----	500.0	ml

Ajuste el pH de 7.3 a 7.4. Esterilise a 121 por 15 minutos. Enfríe a 60 c, añada en forma aséptica una yema de huevo, mezcle y sirva en cajas petri. Los huevos se introducen 15 minutos en alcohol etílico 96%, se decanta el alcohol. Se sujetan con gasas estériles, se rompe el cascarón con pinzas esterilizadas en flama, se quita la albúmina y las membranas de la yema, y ésta se agrega al medio, mezclándola suavemente para evitar formar burbujas.

Medio de Gelatina

peptosa -----	1.0 g
extracto de levadura -----	1.0 g
glucosa -----	0.1 ml
sol. resazurina -----	0.4 ml
sol. sales -----	4.0 ml
agua destilada -----	100.0 ml
cisteína HCl.H ₂ O -----	0.05 g

Hierva, enfríe, añada la cisteína, ajuste el pH, sirva 5 ml en tubos que contengan 0.6 g de gelatina.
Ver también en Medio Basal Smith y Holdeman (1968)

Medio Leche

leche fresca -----	100.0 ml
solución de resazurina -----	0.4

Medio Indol-Nitratos

Indole-Nitrate Medium (BBL)

Prepárelo como se describe en el frasco, la vida media del medio preparado es de 10 días a 2 semanas. Si no se almacena en forma prereducida (con flujos de gases libres de oxígeno), debe calentarse en baño maría hirviendo durante 10 minutos y enfriarse antes de ser inoculado.

6.2 COMPONENTES REACTIVOS Y SUSTRATOS

Caldo Urea

(Para uso con placas de agar de yema de huevo)

Bacto-Urea Broth (dehydrated)* -----	4.0 g
agua destilada -----	100.0 ml
sol. rojo de fenol 0.02% -----	3.0 ml
cloroformo -----	1.0 ml

* Lab. Difco

Manténgalo en frascos con tapón de rosca, no con tapón de hule, a 4 C.

Solución de Urea

(para añadir a PY y preparar caldo Urea-PY)

Bacto-Urea Broth (dehydrated)* ----- 66.0 g
agua destilada ----- 100.0 ml
* Lab. Difco

Esterilice por filtración. Añada 0.3 ml de esta solución a 5 ml de solución de caldo PY para preparar caldo urea-PY.

Solución de Sales

CaCl (anhidro) ----- 0.2 g
MgSO4 (anhidro) * ----- 0.2 g
K2HPO4 ----- 1.0 g
KH2PO4 ----- 1.0 g
NaHCO3 ----- 10.0 g
NaCl ----- 2.0 g

* o use 0.48 g MgSO4.7H2O.

Mezcle el CaCl2 y en MgSO4 en 300 ml de agua destilada hasta que se disuelva. Añada 500 ml de agua y, mientras agita agregue el remanente de sales lentamente. Continúe agitando hasta que se disuelvan. Añada 200 ml de agua destilada, mezcle, almacene a 4 C.

Solución de Azul de Bromotimol (Indicador de cambio de pH)

azul de bromotimol ----- 1.0
NaOH N/10 ----- 22.0 ml
agua destilada ----- cbp 100.0 ml

*Tomados de Holdeman, L. V. y col. (55)

Reactivos Nitratos

Solución A.

ácido sulfanílico ----- 1.6 g
ácido acético 5 N ----- 200.0 ml
(56.8 ml ac.acético + 143 ml H2O dest)

Solución B.

alfa-dimetil-naftilamina ----- 1.2 ml
ac. acético 5 N ----- 100.0 ml

Almidón Soluble

Se utiliza en cantidad de 1 g por cada 100 ml de medio basal.

Soluciones de Carbohidratos

Los diferentes carbohidratos se utilizan a una concentración final del 1% a excepción de la esculina, que es de 0.5%. El pH después de esterilizados es de 7.0. Esterilice por filtración las soluciones de los sustratos y añádalos al medio basal estéril. O bien se pueden esterilizar si la temperatura del autoclave se reduce a 110 C por 15 minutos y se enfría rápidamente. La glucosa se puede añadir al medio basal antes de esterilizarlo, sin necesidad de alterar la temperatura.

sustrato	cantidad gramos/lt	medio base	pH	tiempo autoclave (minutos)
gelatina	a/	a/	7.0	15
glucosa	1.0	PY b/	7.0	15
lactosa	1.0	PY	7.0	15
sacarosa	1.0	PY	7.0	15
salicín	1.0	PY	7.0	15
manitol	1.0	PY	7.0	15
maltosa	1.0	PY	7.0	15
indol	a/	c/	7.0	15
nitratos	a/	c/	a/	15
lecitinasa	a/	EYA d/	a/	a/
lipasa	a/	EYA	a/	a/
ureasa	a/	EYA	a/	a/
esculina	0.5	PY	6.6	15
almidón	1.0	PY	6.5	15

a/ leer texto.

b/ PY, peptona-extracto de levadura

c/ Medio Indol Nitratos, BBL Laboratories.

d/ agar yema de huevo (EYA)

Reactivo de Ehrlich, para Indol

para-dimetil-amino-benzaldehido	----	2.0 g
alcohol etílico 95%	-----	190.0 ml
HCl concentrado	-----	40.0 ml

Reactivo de Kovaks, para Indol

alfa dimetil benzaldehido	-----	5.0 gr
alcohol isoamílico	-----	75.0 ml
ácido clorhídrico	-----	25.0 ml

Disuelva el alfa dimetil benzaldehido con el alcohol calentado en baño maría a 60 C., enfríe y agregue lentamente el ácido clorhídrico.

Citrato Férrico Amónico

(para hidrólisis de esculina)

citrato férrico amónico -----	1.0 g
agua destilada -----	100.0 ml

- 1.- Arloing, Cornvein and Thomas (1887): citado en Smith, L. DS.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. 2nd. ed., pp. 231-244. Charles C. Thomas. Springfield, Illinois (1975).
- 2.- Bagadi, H. O.: Production and Counting of Spores of Clostridium chauvoei. Appl. and Env. Microbiol. 33, 6:1287-1288(1977).
- 3.- Batty, J., and Walker, F. D. (1964): citado por Willis, A. T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd. ed. Butterworths. London (1977).
- 4.- Berkhoff G. A., and Redenberger, J. D.: Isolation and Identification of Anaerobes in the Veterinary Diagnostic Laboratory. Am. J. Vet. Res. 38: 1069-1074(1977).
- 5a.- Bojorques, N. L.: Pierna Negra y Edema Maligno. Memorias de la XIV Reunión Anual. Sección Trópico. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Jalapa, Ver., Noviembre, 1980 pp. 78-83. Imprenta Arana, S.C.L., México, D. F.
- 5b.- Bojorques N. L., Cruz, G. A., Mancera M. A.: Aislamiento e Identificación de Clostridium perfringens tipo a de un Brote de Enterotoxemia en Caballos en el Distrito Federal. Rev. Lat. Microbiol. 21, 2:61(1979).
- 6.- Brander, C. G., and Ellis, P. R.: The Control of Disease. Animal and Human Health. Baillere and Tindal. London (1977).
- 7.- Brewer, J. H., Allgeier, D. L.: Disposable Hydrogen Generator. Science. 147:1033-1034(1965).
- 8.- Carter, G. R.: Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology. Charles C. Thomas. Springfield, Ill. (1973).
- 9.- Claus, K. D., and Kolbe D. R.: Immunogenicity of Clostridium septicum in guinea pigs. Am. J. Vet. Res. 40,12:1752-1756(1965).
- 10.- Colle, J. G., Rutter, J. M., and Watt, B. (1971): citado por Willis, A. T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd. ed. Butterworths. London (1977).
- 11.- Cordella, A. M., and Kolbe, R. D.: Potency Testing of Clostridium septicum bacterins. Proceedings of the eighteenth Annual Meeting. Portland, Oregon, 1975. pp. 361-372. The American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. (1975).

- 12.- Cottral, E. G.: Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology, Cornell University Press, Ithaca (1978).
- 13.- Cowan, S. T., y Steel, K. J.: Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V. México, D. F. (1979).
- 14.- Chandler, H. M. and Gulasekharan, J.: The Protective Antigen of a Highly Immunogenic Strain of Clostridium chauvoei Including an Evaluation of its Flagella as a Protective Antigen. J. Gen. Microbiol. 84:128-134 (1974).
- 15.- Chandler, H. M., and Hamilton, R. C.: The Preparation of Immunogenic Cells Walls from a Highly Protective Strain of Clostridium chauvoei, J. Gen. Microbiol. 88,1:27-35 (1975).
- 16.- Dowell, V. R., and Hawkins, I. M.: Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology. CDC Laboratory Manual. United States Printing Office, Washington, D. C. (1974).
- 17.- Duncan, I. F.: Liver Biopsy and Black Disease in a Sheep. Aust. Vet. J. 61,8:272-273(1984).
- 18.- Ellener, F. D., and O'Donnell: A Selective Differential Medium for Histotoxic Clostridia. American Journal of Clinical Pathology. 56: 197(1971).
- 19.- Finenegold, S. M., Edelstein, M. A. C.: Coping with Anaerobes in the 80s. In: Anaerobes Today. Proceedings of the fifth Anaerobe Discussion Group Symposium held at Churchil College, University of Cambridge, July 23-25, 1987. Edited by Hardie, J. M. and Borriello S. P. pp 1-10, John Wiley & Sons. Chichester. Great Britain. 1988.
- 20.- Frappe, M. R. C.: Manual de Infectología Veterinaria. Editado e Impreso por Francisco Méndez Oteo. México, D. F. (1982).
- 21.- Glastonbury, J. R. W., Searson, J. E., Links, I. J., Tuckett, L. M.: Clostridial miocarditis in Lambs. Aust. Vet. J. 65,7:208-209(1988).
- 22.- Green, D. S. Green. M. J., Hillyer, M. H. and Morgan K. L.: Injection on Site Reactions and Antibody Responses in Sheep and Goats after the use of Multivalent Clostridial Vaccines. Vet. Rec. 120,18:435-439(1987).
- 23.- Hagemoser, W. A., Hoffman, L. J., Lundvall, R. L.: Clostridium chauvoei in a horse. J. Am. Vet. Med. Ass. 176,7:631-633(1980).

- 24.- Hajj., M. O. El-, Mekki, N. T., Sanousi, S. M. El-: Liver and Cysteine Hydrochloride and their Roles in the Production Medium for Blackleg Vaccines. Acta Vet. Yugoslavia. 34,1:49-56 (1984).
- 25.- Hayward, N. J., Miles, A. A. (1943): citado por Willis, A.T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd. ed. Butterworths. London (1977).
- 26.- Henderson, D.W.: citado en Chandler, H.M.: Rabbit Immunoglobulin Responses to the Flagellar and Protective Strain of Clostridium chauvoei. Infection and immunity. 12,1:143-147(1971).
- 27.- Hirsch, A., and Grinstead, E. (1954): citado por Willis, A.T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd ed. Butterworths. London (1977).
- 28.- Holdeman, L.V., Cato, E.P., and Moore, W. E. C.: Anaerobe Laboratory Manual. 4th. ed. V.P.I. Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University. Blaksburg, Virginia. (1977).
- 29.- Kerry, J. B. A.: A note on the Occurrence of Clostridium chauvoei in the Spleens and Livers of Normal Cattle. Vet. Rec. 76:396-398(1964).
- 30.- Knott, K. L., Erwin, G. G., Classick, L. J.: Benefits of a Clostridial Vaccination Program in Feedlot Cattle. Vet. Med. 80,6:95-97(1985).
- 31.- Kolbe, D. R., Claus, K. O. Nervig. R. M.: A Method for the production of Clostridium haemolyticum Spores on Solid Medium. J. Biol. Stand. 9:115-119(1981).
- 32.- Labrandero, E., y Hernández, O.,: Evaluación de 5 Bacterinas Comerciales contra Clostridium chauvoei. Resúmenes de la Reunión Anual. Sección Area Médica. pp. 48. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México, D. F. (1979).
- 33.- Macheak, M. E., Claus, M. S., and Maloy, S. E.: Potency Testing of Clostridium novyi Containing Bacterins: Comparision of Immunologic response in Guinea Pigs and Sheep. Am. J. Vet. Res. 33,6:1201-1208(1972).
- 34.- Malone, F. E., McParland, P. S., O'Hagan, J.: Pathological Changes in the Pericardium and Meninges of Cattle Associated with Clostridium chauvoei. Vet. Rec. 118,6:151-152(1986).
- 35.- Mhoma, J. R. L.: Observations on the Influence of Media Composition on the Efficacy of Vaccines Derived from some Clostridium chauvoei Strains. Bull. Animal Hlt. Prod. in Africa. 33,2:117-121(1985).

- 36.- McBee, R. H., Lamanna, C., and Weebs, O. B. (1955): citado por: Smith, L. DS.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. 2nd. ed. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois (1975).
- 37.- McIntosh, J., and Fildes, P. (1921): citado por Smith, L. DS.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. 2nd ed. Butterworths, London (1977).
- 38.- Moore, W. B. (1968): Solidified Media Suitable for the Cultivation of Clostridium novyi Type B. J. Clin. Microbiol. 53:415 (1968).
- 39.- Moussa, R. S.: Antigenic Formulae for Clostridium chauvoei. J. Path. and Bacteriol. 77:341-350 (1959).
- 40.- Nervig, R. M. Maloy, S. E., Claus, K. D., and Kolbe, D. R.: Clostridium septicum Infection in Cattle in the United States. J. Am. Vet. Med. Ass. 179,5:579(1981).
- 41.- Nishida, S. and Nakawara : Relationship between Toxicogenicity and Sporulating Potency of Clostridium novyi. J. Bact. 89:993-995(1965).
- 42.- Princewell, T. J. T., and Agba, M. I.: Examination of Bovine Faeces for the Isolation and Identification of Clostridium Species. J. Appl. Bact. 52,1:97-102(1982).
- 43.- Rebhun, W. C., Shin, S. A., King, J. M., Baum, K. H.: Malignant Edema in Horses. J. Am. Vet. Med. Ass. 187, 7, 732-736(1985).
- 44.- Robertson, M. (1915-1916): citado por Willis A. T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd. ed. Butterworths, London (1977).
- 45.- Rycke, J. de-, Bernard, S S., Laporte, J., Naciri, M., Popoff, M. R., Rodolakis, A.: Prevalence of various Enteropathogens is the Faeces of Diarrheic and Healty Calves. Ann. Res. Vet. 17,2:159-158(1986).
- 46.- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos: Requerimientos Mínimos de Calidad que Deberán Llenar Los Productos para Uso Veterinario. Dirección General de Sanidad Animal. México, D. F. (1971).
- 47.- Secretaría de Programación y Presupuesto: Síntesis Geográfica de Coahuila. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México, D. F. (1983).
- 48.- Secretaría de Programación y Presupuesto: Síntesis Geográfica de Nuevo León. Instituto Nacional de Geografía e Informática. México, D. F. (1983).

- 49.- Secretaría de Programación y Presupuesto: Síntesis Geográfica de Tamaulipas. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México, D. F. (1983).
- 50.- Seifert, H. S. H., Bohnel, H., Bunje., Ebrech, A., Kuenheim, U., Wech: A New Method for differentiating Pathogenic Anaerobes. Animal Research and Development. 12:88-107(1980).
- 51.- Seifert, H, S. H., Böhnel, H., Ranaivoson: Profilaxis of Anaerobic Infections of Ruminants in Madagascar by the Intradermal Application of Ultrafiltered Toxoids from Local Strains os Clostridia. Animal Res. and Development. 19:67-82(1984).
- 52.- Smith, H. A. Jones, T. C.: Patología Veterinaria. Editorial UTHEA, S. A. de C. V. México, D. F. (1980).
- 53.- Smith, L. DS., Holdeman, L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Charles C. Thomas. Springfield, Ill. (1968).
- 54.- Smith, L. DS., Hobbs, G.: Genus III. Clostridium. IN Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Edited by Buchanan, R. E., and Gibons, N. E., pp 551-572, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland. (1974).
- 55.- Smith, L. DS., Holdeman, L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. 2nd. ed. Charles C. Thomas. Springfield, Ill. (1975).
- 56.- Smith. L. DS. In: Handbook of Microbiology, Vol. 1 Bacteria, 2nd ed. CRC Press Inc., Florida, EUA. (1977).
- 57.- Starmatin, N. and Ungureanu, C.: Epizootiologic des clostridiasis. Bull. Off. Int. Epizoot. Tomo 67: 1283-1292, (1977).
- 58.- Sterne, M. and Warrack, G. H. (1942): citado por Smith, L. DS., Holdeman, L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. 2nd. ed. Charles C. Thomas. Springfield, ILL. (1975).
- 59.- Sterne, M and Batty, I.: Pathogenic Clostridia. Butterworths. London (1975) .
- 60.- Sterne M.: Clostridial Infections. Br. Vet. J. 137, 5:443-453(1981).
- 61.- Tamura, Y., Minamoto, N., Tanaka, S.: Demostration of Protective Antigen Carried by Flagella of Clostridium chauvoei. Microbiol. Immunol. 28,12:1325-1332(1984).
- 62.- Taylor, D. J., Estrada, A. E., Mashat, R. Al-: Toxigenic Clostridium sordellii and Clostridium perfringens Type A

- Infections in Animals. In: Anaerobes Today. Proceedings of the fifth Anaerobe Discussion Group Symposium held at Churchill College, University of Cambridge, July 23-25, 1987. Edited by Hardie, J. M. and Borriello S. P. pp 61-67, John Wiley & Sons, Chichester, Great Britain. 1988.
- 63.- Thompson, R. U., Batty, I., Thompson, A., Kerry, J. B., Epps., B. H. G. (1969): citado por Smith L. DS., Holdemanm, L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. 2nd. ed. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. (1975).
- 64.- Torres Barranca, J. I., Aguilar, O. F.: Incidencia en México y Diagnóstico de Clostridiasis en México. Actualidad Veterinaria, 2,8:11-18(1979).
- 65.- United States Department of Agriculture: Veterinary Biologic Products. Licenses and Permittes. Veterinary Services. Hyattsville, Md. (1985).
- 66.- Valberg, S. S., McKinnon, A. D.: Clostridial Cellulitis in the Horse: a report of five cases. Can. Vet. J. 25,2:67-71(1984).
- 67.- Vargas. L. J. (1977) Citado por Bojorques, N. L.: Pierna Negra y Edema Maligno. XIV Reunión Anual. Sección Trópico. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Jalapa, Varracruz. 17-19 Noviembre de 1977, pp 78-83. Imprenta Arana. México, D.F.
- 68.- Vilchis, M. C., Susana, M. V., Rosales, B. C. Aguilar, S. A., Vargas, L. J., Peña, M. I. Jorge, G. M. J., y Batalla, C. D.: Estudio Epizootiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Ganado Productor de Leche y Productor de Carne. Técnica Pecuaria en México. 49:106-115. (1985).
- 69.- Watt. B.: citado por Willis, A. T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd. ed. Butterworths. London (1977).
- 70.- Williams, B. M.: Clostridial Myositis in Cattle. Bacteriology and Gross Pathology. Vet. Rec. 100,5:90-91(1977).
- 71.- Willis A. T. (1957): citado por Willis, A. T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd. ed. Butterworths. London (1977).
- 72.- Willis A. T. and Hobbs. (1959): citado por Willis, A. T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd. ed. Butterworths. London (1977).
- 73.- Willis, A. T.: Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. 3rd. ed. Butterworths. London (1977).

74. - Worrall, E. E. Moekti, G., Lubis, D. A: Clostridium novyi
Isolated from the Livers of Healthy Sheep and Goats in
Java. Penyakit Hewan, 19, 33:14-16(1987).