

IDENTIFICACION Y CLASIFICACION DE CEPAS DE *Clostridium**

Luis Carlos Caraballo
Gustavo Manrique L.
Ricardo Ochoa O.**

1. INTRODUCCION

Se sabe de la importancia clínica de las bacterias anaerobias particularmente de los *Clostridium* toxigénicos, sin embargo, el conocimiento de estas bacterias y el papel que juegan en humanos y animales es bien limitado. Existen muchas especies de este género y gran número de ellas son patógenas para el hombre y animales.

En nuestro medio estas bacterias producen diversas enfermedades tanto en las especies mayores como en las menores y los sistemas de prevención que se están utilizando contra estas enfermedades con base en la vacunación aparentemente no están dando la debida protección.

Las pérdidas económicas que producen estos organismos en los animales y la falta de clasificación para un diagnóstico seguro, hizo necesario realizar un estudio sobre identificación y clasificación de estos gérmenes a partir de cepas de campo, por pruebas bioquímicas, anticuerpos fluorescentes y por otras pruebas serológicas. En este último caso las cepas toxigénicas se sometieron a la prueba de seroneutralización, usando sueros comerciales conocidos y sueros preparados localmente y así poder determinar el mejor método rutinario para la identificación y clasificación de *Clostridium* de muestras de campo para un diagnóstico seguro.

2. REVISION DE LITERATURA

La mayoría de los microorganismos del género *Clostridium* son anaerobios obligados, pero algunos (*Clostridium histolyticum*, *Clostridium carnis*, *Clostridium tertium*) son aerotolerantes y crecen en caldo y en la superficie de cajas de agar incubadas aeróbicamente (15).

En el cultivo de las bacterias anaerobias están implicados dos principios fundamentales: la reducción de la tensión de oxígeno y el mantenimiento de esta tensión reducida (13).

La reducción biológica de la tensión de oxígeno es un modo natural de preparar las condiciones óptimas de cultivo de las bacterias anaerobias, puesto que crecen en presencia de especies aerobias o tejidos que absorben oxígeno. Uno de los métodos más corrientes empleados en el laboratorio es el cultivo en medio con trozos de carne, hígado, bazo, cerebro o cualquier otro tejido finamente dividido o agregando en medios líquidos sustancias reductoras tales como thioglicolato o cisteína (15).

* Contribución del Programa de Estudios para graduados en Ciencias Agrarias UN-ICA y el Departamento de Ciencias Veterinarias. Adaptación y resumen de la tesis de grado presentada por el autor principal a dicho programa, como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiae.

** Respectivamente: M.V.Z., Ph.D. Director del Programa Nacional de Microbiología. LIMV., M.V.Z., Ph.D. Director del Departamento de Ciencias Veterinarias. LIMV.

Brewer y Alger (3) describen un sistema de anaerobiosis que permite a los microbiólogos o técnicos de hospitales una operación fácil que no era posible con otros sistemas. Se eliminan los cilindros de gas, máquinas de vacío, válvulas y mangueras.

El uso de películas plásticas como barreras de oxígeno sobre la superficie de agar en cajas de petri, en conjunto con thioglicolato y agentes selectivos y diferenciales, permite el aislamiento primario y enumeración de *Clostridium* y otros anaerobios (13).

La idea de cultivar más de un organismo en el mismo medio y al mismo tiempo se usó para varias especies diferentes de bacterias incluyendo las especies de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* y *Clostridium novyi*.

Desde luego las tres especies estaban relacionadas y tenían características similares de crecimiento. Para obtener este crecimiento fue necesario un medio que tenía componentes nutricionales comunes que pudieran soportar el metabolismo de cada uno de los tres organismos en el mismo tiempo, dicho medio es aplicable para la preparación de bacterias polivalentes (9).

La identificación por especies se hace por el estudio de la morfología de la colonia, tamaño, forma y localización de las esporas, acción proteolítica sobre el suero o gelatina, fermentación de los azúcares, neutralización de la toxina por la antitoxina específica y los anticuerpos fluorescentes y otras reacciones serológicas. No son infrecuentes las reacciones atípicas con respecto a la formación de hidrógeno sulfurado y aun en la fermentación de ciertos azúcares, algunas de estas reacciones son inherentes a la cepa, pero otras están condicionadas por el medio (14).

Las pruebas más aceptables para la tipificación son las Bioquímicas, Neutralización de toxina y Anticuerpos Fluorescentes (5). Todos los cultivos de *Clostridium* se examinan rutinariamente para producción de toxinas. Aunque las condiciones para la elaboración de toxinas varían con las especies individuales, pueden ser detectadas en cultivos de carne dextrosa incubados en 18 horas a 35 grados centígrados. Algunos como el *Clostridium hemolyticum*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium histolyticum* son más toxigénicos en cultivos jóvenes y otros como el *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* y *Clostridium novyi* presentan el máximo de su toxicidad después de varios días de incubación (5).

En la actualidad se reconocen seis tipos de *Clostridium perfringens*, estos tipos (A - B - C - D - E - F) están basados en la producción de una o más toxinas (8).

Nishida y Nakagawara (12) investigaron las condiciones de cultivo para la producción de toxina por *Clostridium novyi* y determinaron los constituyentes óptimos de un medio adecuado.

Si el fluido del cultivo es tóxico para ratones, se procede a la identificación de la cepa por prueba de seroneutralización, que se realiza en ratones por vía venosa o intraperitoneal o en curies por vía intradérmica (5).

El uso de antisuero monoespecífico conjugado para la prueba de anticuerpos fluorescentes permite la rápida identificación de *Clostridium*, en láminas preparadas, bien de cultivos puros o de especímenes biológicos enviados para aislamiento e identificación de las especies de *Clostridium*. La especificidad es tal, que se puede hacer una diferenciación entre especies estrechamente relacionadas como por ejemplo *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei*. En este último caso si un antisuero es conjugado con rodamina y el otro con fluorescencia, uno puede distinguir ambas especies cuando ellas son colocadas en un cultivo mezclado en la misma lamina (1).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 ORGANISMOS

Se trabajaron cepas originarias de varias especies animales y de varias fuentes de origen que habían sido diagnosticadas como pertenecientes al género *Clostridium*, llegadas al laboratorio de bacteriología diagnóstica del LIMV (Bogotá), de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) y de algunos Centros de Diagnóstico del país.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO

Las cepas se sometieron a cultivos primarios para su purificación en medios líquidos tales como caldo de carne (Difco), Thioglicolato de sodio (Difco), Medio Esporulación descrito por

Duncan y Strong (6) y Medio Cerebro de Ellender *et al.* (7) Todos los tubos se incubaron a 37 grados centígrados por 24 horas. Además, se usaron medios sólidos tales como agar sangre y azida de sodio y se incubaron en aerobiosis y anaerobiosis. La pureza de los cultivos se controló haciendo coloraciones de Gram. Luego se sometieron a pruebas bioquímicas en medios diferenciales con base en thioglicolato más 0.5 por ciento de azúcares como glucosa, manitol, lactosa, maltosa y sacarosa con tubos de fermentación, además, se usaron medios para producción de indol, urea, hidrógeno sulfurado, reducción de nitratos, leche tornasolada, suero loeffler y agar yema de huevo (5).

Los cultivos se incubaron en anaerobiosis con la adición de sustancias reductoras en los medios líquidos y en campañas anaeróbicas los medios sólidos. En este caso se usaron generadores de gases de hidrógeno y dióxido de carbono*.

Los medios líquidos con base en azúcares se calentaron en baño maría por diez minutos y se dejaron enfriar para cultivarlos, se incubaron a 37 grados centígrados, lo mismo que los medios sólidos (5).

Los medios sólidos se observaron a las 48 horas de incubación, lo mismo que la acción sobre la leche tornasolada. En el agar yema de huevo se observó la producción de lecitinasa, la acción proteolítica de esta enzima y la reacción de catalasa (5).

La lectura de los medios azúcares se hizo de los cinco a siete días de incubación para la producción de ácido y gas. Este último se observó por el desplazamiento del medio líquido en los tubos de fermentación. Para la producción de ácido de sodio, 0.1 normal más 70 mL de agua destilada. Una reacción positiva a la producción de ácido en dicho azúcar se observó cuando el medio viró a un color amarillo y una reacción negativa cuando el medio quedaba de color rojo (5).

3.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS

Para establecer la patogenicidad de las cepas se usaron curfes de 300 a 400 gramos de peso, e infectados con 0.5 a un mL de una mezcla que contenía partes iguales de un cultivo de medio carne de 24 horas de incubación y 10 por ciento de cloruro de calcio. A los animales muertos se les hizo necropsia y se les practicó examen directo por coloración de Gram y por anticuerpos fluorescentes. Se cultivaron muestras para el aislamiento de gérmenes anaerobios según los métodos ya descritos (5).

3.4 PRUEBAS PARA TOXINAS

Todos los cultivos se examinaron rutinariamente para producción de toxinas así se usaron cultivos de 24 a 48 horas de incubación a 37 grados centígrados en medios adecuados para producción de toxinas (6, 7). Se centrifugó el medio de cultivo a 20 000 g por 15 minutos. se extrajo el sobrenadante con micropipetas y se depositó en tubos de ensayo esteriles. Por cada sobrenadante se inocularon tres ratones albinos de 40 días de edad y 15 a 20 gramos de peso con 0.3 mL de sobrenadante y las diluciones vía venosa por la vena caudal, se observaron por 24 horas después de la incubación (5).

3.5. PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN DE LA TOXINA

Cuando se demostró que el fluido del cultivo era tóxico, se procedió a la identificación de la toxina por pruebas de seroneutralización, mezclando 0.5 mL del sobrenadante del cultivo con 0.2 mL de caldo nutritivo y 0.1 mL de antisero específico tipo comercial, según la técnica del laboratorio productor y antisero preparado localmente. Las mezclas de toxina y suero se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos y se inocularon 0.3 mL vía venosa en tres ratones. Los animales se observaron durante 48 horas. Cuando los sobrenadantes eran sospechosos de contener toxina de *Cloridium perfringens* tipo D, se activaron por medio de la dilución de suficiente tripsina (Difco 1:250) para obtener una solución final del 0.25 por ciento (11).

La antitoxina del *C. sordellii* se preparó inmunizando dos conejos machos de tres kilogramos de peso por medio de una serie de inyecciones según una publicación previa (14).

* División de BioQuest, Canadá BBL Gas Pak Anaerobic Systems

3.6. PRUEBA DE LOS ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

Para realizar esta prueba se utilizaron conjugados preparados en nuestro laboratorio en el transcurso de este trabajo. El origen de las cepas para la preparación de cada conjugado se identifican así: *Cloridium perfringens* tipo D, cepa No. 4606, *Clostridium sordellii* IRP 136, *Clostridium septicum* IRP 111, *Clostridium novyi* IRP 79, *Clostridium chauvoei* IRP 129. Estas cepas fueron donadas por National Animal Diseases Laboratory, Iowa, USA.

El antígeno de cada especie de *Clostridium* para la inmunización de conejos se preparó de acuerdo a la técnica modificada de Klotz citado por Manrique (10). Por cada antígeno de los cinco gérmenes mencionados se inmunizaron dos conejos con un peso aproximado de dos a tres kilogramos con inyecciones intravenosas y una serie creciente de antígenos tal como lo reporta Yamagishi *et al.* (19).

Los antisueros se conjugaron con isotiocianato de fluoresceína a excepción del *Cloridium chauvoei* que se conjugó con rodamina, todos de acuerdo al método de The y Feltkamp (16) y The (17). Las láminas preparadas de cultivos o de tejidos se secaron al aire y se fijaron en acetona por 10 minutos. El antisuero conjugado se adicionó durante 30 minutos y se dejó actuar en una atmósfera húmeda a temperatura ambiente. Las láminas se lavaron por dos veces, 10 minutos cada lavado, se dejaron secar al aire y se montaron en una solución de glicerina al 90 por ciento de pH 9.0 y se examinaron en el microscopio de fluorescencia.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Para hacer más sencillo el análisis de los resultados se clasificaron las muestras según su origen como se observa en la Tabla 1.

TABLA 1. Clasificación de las muestras según su origen.

Origen de las muestras	Número de muestras
Bovinos	45
Alimentos concentrados	28
Aguas	8
Aviar	6
Equinos	4
Curfes	4
Ovinos	2
Caninos	2
Porcinos	1
TOTAL	100

Las muestras se purificaron en agar sangre y ácido de sodio en anaerobiosis y por pases en curfes en los que se estableció patogenicidad, algunas cepas no fueron patogénicas probablemente por mala conservación.

De 60 cepas sometidas a pruebas bioquímicas sólo se tipificaron 16 que corresponden a un 26.6 por ciento y entre este número se encontraron seis *C. perfringens*, cuatro *C. chauvoei*, dos *C. septicum*, dos *C. novyi*, un *C. histolyticum*, y un *C. tertium*. El número de especies clasificadas por este número fue muy baja debido a que los resultados cuando se usa este sistema son irregulares y deben ser repetidos dos ó tres veces (18, 9); en este trabajo sólo se hizo una sola prueba a cada cepa.

En cuanto a las pruebas para toxinas a todos los 100 cultivos se les probó su poder tóxico rutinariamente, sólo fueron toxigénicas 15 cepas, matando los ratones en menos de 24 horas cuando se utilizó el sobrenadante de cada cultivo concentrado. Este resultado tan bajo se puede explicar porque la mayoría de las cepas usadas eran viejas y además se obtuvieron después de mala conservación perdiendo en esta forma su poder tóxico.

Varios investigadores entre ellos Dowell y Hawkins (5), Duncan y Strong (6) y Manrique (10) demostraron la necesidad de enriquecimiento en algunos constituyentes en el medio de cultivo de cada tipo o especie de *Clostridium* para producir su máximo de toxicidad después de su periodo de incubación. Este factor no se tuvo en cuenta en este trabajo por la dificultad de preparar un medio apropiado para cada cepa ya que éstas eran desconocidas por ser provenientes de material de campo.

Las 15 cepas se sometieron a su identificación por pruebas de seroneutralización con sueros comerciales y uno preparado localmente como fue el de *C. sordelli*. Esta antitoxina fue la única preparación que neutralizó la actividad tóxica del sobrenadante homólogo y se preparó porque no existe en el comercio.

Por pruebas de Neutralización de la toxina se pudo detectar tres especies de *Clostridium* así seis *Clostridium sordellii*, cinco *Clostridium perfringens* tipo D y cuatro *Clostridium novyi* tipo B. El haliazgo de estas tres especies corrobora el hecho de que éstas son las que producen el máximo de toxicidad en el medio de Esporulación de Duncan y Strong (6).

En líneas generales los resultados obtenidos por la prueba de neutralización de la toxina fueron aceptables y similares a los obtenidos por anteriores investigadores (5, 6, 10, 12).

La mayoría de estos gérmenes fueron identificados a partir de alimentos concentrados y en mayor escala el *Clostridium sordelli* y el *Clostridium perfringens* tipo D. Sin embargo, el *Clostridium novyi* se encontró en mayor cantidad en muestras de bovinos.

En lo que respecta a la prueba de anticuerpos fluorescentes dió muy buenos resultados. Se mostró una fluorescencia específica con los conjugados de *C. perfringens* tipo D, *C. sordelli* y *C. septicum*, no así los de *C. chauvoei* y *C. novyi*, que además de dar fluorescencia inespecífica dieron reacciones cruzadas entre ellos dos, porque hubo necesidad de repetir la preparación de dichos conjugados desde la inmunización de los conejos.

El conjugado de *C. novyi* se preparó por tres veces consecutivas y en ninguno de los casos dió resultados satisfactorios, por lo que hubo necesidad de utilizar un conjugado tipo comercial.

El conjugado de *C. sordelli* presentó reacción cruzada con las cepas de *C. novyi* pero con muy escasa fluorescencia, en cambio con las cepas homólogas dió brillante fluorescencia.

Batty y Walker (2) y Choman (4) han reportado la dificultad en la preparación del conjugado de *C. novyi*, nartiendo de la exigencia de este germen para su crecimiento en medio de cultivos para anaerobios y además han reportado las reacciones cruzadas que presenta con *C. sordelli*, este último fenómeno también fue encontrado por Manrique (10). Las causas precisas por las cuales hay dificultad para la preparación de este conjugado no han sido aclaradas hasta el presente.

Los resultados obtenidos en las cien muestras enfrentadas a cada uno de los cinco conjugados se aprecian discriminadas por especies y fuentes de aislamiento en la Tabla 2 se observa que el total de cepas clasificadas por anticuerpos fluorescentes, fue de 82 que corresponde a un 82 por ciento cifra digna de tener en cuenta ya que solo se usaron cinco conjugados para el diagnóstico de las cien muestras. Puede observarse además, que el mayor número de *Clostridium* clasificados correspondió al *C. chauvoei* en un total de 34 y dentro de este número el mayor porcentaje correspondió a muestras provenientes de bovinos, le siguió el *C. septicum* y *C. novyi* en orden de aislamiento.

TABLA 2 Total de especies del género *Clostridium* identificados por pruebas de Anticuerpos Fluorescentes discriminados por especies de animales y fuentes de aislamiento

	Bovinos	Alimentos concentrados	Agua	Aviar	Equinos	Caninos	Porcinos	Curles	Ovinos	Total
<i>C. chauvoei</i>	23	3	4	1	1	0	1	1	0	34
<i>C. septicum</i>	9	6	1	1	0	1	0	1	0	19
<i>C. novyi</i>	9	5	1	3	0	0	0	0	0	18
<i>C. sordellii</i>	1	3	0	1	0	0	0	1	0	6
<i>C. perfringens</i> D	0	3	1	0	0	0	0	1	0	5
Total	42	20	7	6	1	1	1	4	0	82

Como el antisuero de *C. chauvoei* fue marcado con rodamina y el *C. septicum* con fluorescencia, cuando se aplicaron ambos conjugados en un frotis en una lámina, los *C. chauvoei* se observaron de color naranja y los *C. septicum* de color verde brillante. Este sistema dió buenos resultados tanto en frotis de tejidos de curies que habfan sido inoculados con la muestra sospechosa de contener uno o ambos gérmenes de éstos, como en frotis de cultivos.

De los resultados obtenidos en este trabajo es posible discriminar entre *C. chauvoei* y *C. septicum* con los antisueros marcados no sólo de frotis de cultivos sino de secciones de tejidos y frotis de lesiones patológicas. Por la técnica de anticuerpos fluorescentes es posible hacer una identificación precisa de ciertas especies de *Clostridium*. Esto también ha sido demostrado por Batty y Walker (2), Brewer y Algeier (3).

Las cepas que resultaron positivas a *C. novyi* y *C. sordellii* por la prueba de anticuerpos fluorescentes, se les hizo pruebas de seroneutralización para corroborar el diagnóstico, debido a la reacción cruzada que presentan estos dos conjugados y evitando así un resultado falso.

5. CONCLUSIONES

Los resultados en este trabajo por pruebas bioquímicas no fueron muy halagadores debido al número tan bajo de especies de *Clostridium* en que se logró tipificación; además, los hallazgos por este método no concordaron siempre con los obtenidos por otros métodos.

La prueba de neutralización de la toxina es muy útil para un diagnóstico seguro de especies de *Clostridium* usando las antitoxinas apropiadas, además en este trabajo dió buenos resultados para aclarar los diagnósticos hechos por anticuerpos fluorescentes de los *C. novyi*, *C. sordellii* y *C. perfringens* tipo D y fue así como se identificó por primera vez en Colombia el *C. sordellii*.

Con los resultados obtenidos en este trabajo sobre la aplicación de los anticuerpos fluorescentes marcados para la clasificación de cepas de *Clostridium*, se concluye que su empleo de rutina para identificar especies de *Clostridium* a partir de impresiones hechas en láminas de tejidos sospechosos o de cultivos, es altamente satisfactorio.

6. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el de identificar cepas provenientes de material patológico como perteneciente al género *Clostridium* y clasificarlas dentro de las distintas especies conocidas por pruebas bioquímicas, pruebas de anticuerpos fluorescentes y pruebas de neutralización de la toxina y demostrar el mejor método de clasificación.

Se trabajaron cien muestras y de éstas se les hizo pruebas bioquímicas a 60 cepas tipificándose solamente 16 en las que se encontraron: *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. histolyticum* y *C. tertium*. De éstos el que se encontró en mayor número fue el *C. perfringens* pero sin llegar a especificar de qué tipo.

A todos los cultivos se les hizo pruebas de toxicidad en ratones y sólo 15 cepas resultaron toxigénicas. De estas 15 cepas de seroneutralización se identificaron tres especies de *Clostridium* así: *C. sordellii*, *C. perfringens* tipo D y *C. novyi*.

Por pruebas de anticuerpos fluorescentes se identificaron 82 cepas de *Clostridium* entre ellas las especies de *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. perfringens* tipo D, *C. sordellii* y *C. novyi*, encontrándose en mayor escala el *C. chauvoei*. Estas pruebas fueron realizadas con conjugados preparados localmente y comerciales.

El uso de antisueros conjugados monoespecíficos permitió la rápida identificación de especies de *Clostridium* de láminas preparadas de cultivos o de tejidos derivados de curies inoculados con tales cultivos.

Se reporta por primera vez en Colombia el aislamiento del *C. sordellii*.

7. SUMMARY

The purpose of this work was to identify isolates from pathologic material as belonging to the Clostridia genera to classify them into the different known species by using biochemical test, Fluorescent antibody technique and toxin neutralization test, and to determine the best method for classification.

Out of one hundred samples selected, sixty were studied by biochemical tests, of these samples only sixteen were typifiable: *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. histolyticum* and *C. tertium*, *C. perfringens* was the most frequently found, however no further classification was obtained.

Only fifteen isolates were toxic to mice. Using neutralization test these toxigenic strains were classified as *C. sordellii*, *C. perfringens* type D and *C. novyi*.

Eighty two isolates of clostridium were identified when the Fluorescent Antibody technique was used: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. perfringens* types D and *C. sordellii*, and *C. novyi*, among them, *C. chauvoei* was the most frequently found.

For this test some conjugates were prepared locally and some were purchased commercially.

The use of monospecific fluorescent antisera allowed us the rapid identification of the different species of clostridia, both when slides were prepared from cultures and when they were prepared from tissues of guinea pigs inoculated with cultures of clostridia.

The isolation *C. sordellii* is reported for the first time in Colombia.

8. BIBLIOGRAFIA

1. BATTY, I. 1968. Fluorescent-labelled antibodies as tools in the detection, identification and differentiation of Clostridial species. Univ. of Montreal, Canada. pp. 85-99.
2. ————— and WALKER. 1963. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies Jour. Path. Bact. (EE.UU) 85(2):517-521.
3. BREWER, J.H. and D.L. ALGEIER. 1966. Safe self-contained carbon dioxide hydrogen anaerobic system. Jour. Appl. Microbiol. 14(6):985-988.
4. CHOMAN, B.R. 1966. Sequential growth of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* and *Clostridium novyi* in the same medium. Amer. Jour. Vet. Res. 30(1):133-137.
5. DOWEL, V.R. Jr. and T.M. HAWKINS. 1971. Laboratory methods in anaerobic bacteriology CDC. U.S. Department of Health Educ. Welfare, Atlanta. pp. 5-28.
6. DUNCAN, C.L. and D.H. STRONG. 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens* Appl. microbiology. (EE.UU.) 16:82-89.
7. ELLENDER, R.D.; R.J. HIDALGO and L.C. GRUMBLES. 1970. Characterization of five clostridial pathogens by gas chromatography. Amer. Jour. Vet. Res. 31:1863-1866.
8. ELLNER, P.D. and C.D. BOHAN. 1962. Serology of the soluble antigens of *Clostridium perfringens* types A-F by agar gel diffusion. Jour. Bacteriology (EE.UU) 83:284-296.
9. KAUFMAN, L. and L.S. McCLUNG. 1960. Rapid methods for the identification of clostridia. Jour. Bacteriology (EE.UU.) 79:(1):119-121.
10. MANRIQUE, G. 1972. Detection of Clostridium toxins from tissues. Ph.D. Thesis. Texas A&M University, College Station, Texas, 91 p.

11. NILO, L. 1965. Bovine "enterotoxemia". III factors affecting the stability of the toxin of *Clostridium perfringens* types A, C and D. *Can. Vet. Jour.* 6:38-42.
 12. NISHIDA, S. and G. NAKAGAWARA. 1964. Isolation of toxigenic strains of *C. novyi* from soil. *Jour. Bacteriology*. (EE.UU.) 82(6):1636-1640.
 13. SHANK, J.L. 1963. Application of the plastic film technique in the isolation and study of anaerobic bacteria. *Jour. Bacteriology* (EE.UU.) 86(1):95-100.
 14. SMITH, D.T. y N.F. CONANT. 1964. *Bacteriología de Zinsser*. 2ed. UTEHA, México. p. 557.
 15. SMITH, L. and L.V. HOLDEMAN. 1968. *The pathogenic anaerobic bacteria* Charles C. Thomas publisher, Illinois, pp. 185-200.
 16. THE, T.H. and T.E. FELTKAMP. 1970. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the condition of conjugation. *Immunology* (EE.UU.) 18:865-873.
 17. -----, 1970. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies II. A reproducible method. *Immunology* (EE.UU.) 18:875-881.
 18. WILSON, S.S. and A.A. MILES. 1964. *Principles of bacteriology and immunity* Fifth edition in two volumes. Edward Arnold publisher, London. V.I. pp. 1051-1092.
 19. YAMAGISHI, T.J. *et al.* Identification of isolates of *Clostridium perfringens* types C and D by agglutination and fluorescent antibody methods. *Jour. Appl. Microbiol.* (EE.UU.) 21(5):787-793.
-