

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



CLOSTRIDIASIS BOVINA (*Clostridium bovinum*)

POR

JAIME MORALES REBOLLEDO

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN COAHUILA, MÉXICO.

NOVIEMBRE DE 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



CLOSTRIDIASIS BOVINA (*Clostridium bovinum*)

POR:

JAIME MORALES REBOLLEDO

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR: M.C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2012

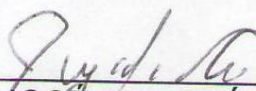
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

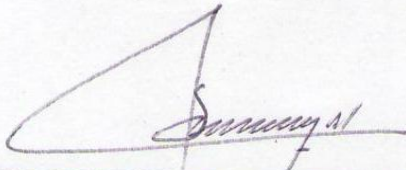
CLOSTRIDIASIS BOVINA (*Clostridium bovinum*)

MONOGRAFÍA

APROBADA POR EL COMITÉ


M.C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE

PRESIDENTE


M. V. Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL

DE CIENCIA ANIMAL

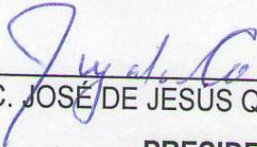



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

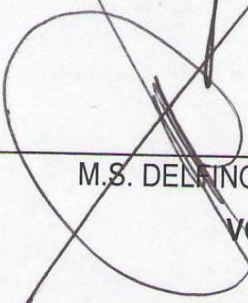
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

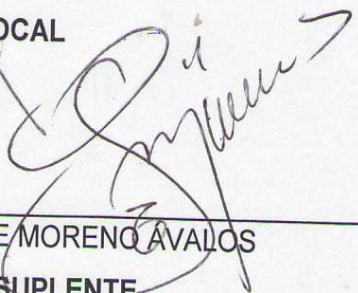
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

CLOSTRIDIASIS BOVINA (*Clostridium bovinum*)


M.C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE
PRESIDENTE


M.V.Z. CUAUHTEMOC FÉLIX ZORRILLA
VOCAL


M.S. DELINO REYES MACÍAS
VOCAL


M.V.Z. SILVESTRE MORENO AVALOS
VOCAL SUPLENTE

Índice

Índice.....	i
Resumen.....	ii
Introducción.....	1
1. Características bacteriológicas.....	2
1.2. Hábitat.....	2
1.3. Modo de infección.....	2
1.4. Morfología.....	2
1.5. Resistencia.....	3
2. <i>Clostridium chauvoei</i>	4
3. <i>Clostridium septicum</i>	6
4. <i>Clostridium haemolyticum</i> y <i>C. novyi</i>	7
5. <i>Clostridium perfringens</i>	8
6. <i>Clostridium botulinum</i>	13
7. <i>Clostridium sordelli</i>	17
8. Diagnóstico.....	17
8.1. Cultivo.....	18
8.2. Aislamiento e Identificación.....	18
8.3. Reacción en Cadena Polimerasa.....	20
8.4. Criterio de interpretación de resultados.....	21
9. Tratamiento.....	22
10. Control y Profilaxis.....	22
Literatura citada.....	25

Resumen

A las enfermedades causadas por bacterias del género *Clostridium* se les denomina clostridiasis. Más de 100 especies de esta bacteria están reconocidas, pero solo unas cuantas son patógenas para los animales domésticos. Estos microorganismos producen esporas y dependiendo de la enfermedad que producen se dividen en cuatro grupos: neurotóxicos, histotóxicos, hepatotóxicos y enterotóxicos. Estas bacterias tienen gran importancia económica en medicina veterinaria, debido a que su tratamiento es impráctico. El diagnóstico de la clostridiasis se realiza por cultivo y aislamiento; así como por identificación del agente o sus toxinas mediante pruebas tales como inmunofluorescencia o PCR. El control y la prevención comprenden medidas adecuadas de manejo, y las vacunaciones son esenciales debido a que los animales están en contacto permanente con los agentes y los factores que pueden desencadenar la enfermedad.

Palabras clave: Clostridiasis, Bovinos lecheros, Diagnóstico, Tratamiento, Profilaxis

Abstract:

Diseases caused by *Clostridium* bacteria are called clostridiasis. More than 100 species of these bacteria are recognized, but only a few are pathogenic for domestic animals. These organisms produce spores and depending on the disease consists producing four groups neurotoxic, histotoxic, enterotoxic and hepatotoxic. These bacteria are of great economic importance in veterinary medicine, because their treatment is impractical. Diagnosis of clostridiasis is by culture and isolation, as well as identification of the agent or its toxins through tests such as immunofluorescence or PCR. The control and prevention measures include proper handling, and vaccinations are essential because the animals are in constant contact with the agents and the factors that can trigger the disease.

Key words: Clostridiosis, Dairy cows, Diagnosis, Treatment, Prophylaxis

Introducción

El género *Clostridium* está conformado por bacilos Gram-positivos, fermentativos, catalasa y oxidasa negativos. Los clostridios son ubicuos y algunas especies están asociadas a áreas geográficas definidas, esto debido al pH, clima, tipo de suelo y presencia de otros microorganismos; así mismo, estas bacterias tienen la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones medioambientales debido a su capacidad de producir esporas. *Clostridium* tiene más de 100 especies conocidas (Ortiz-Ortega *et al.*, 2012), pero solo unos cuantos tienen potencial patógeno para el ser humano y los animales domésticos (Carter y Wise, 2004; Ortiz-Ortega *et al.*, 2012), y dependiendo de la enfermedad que producen se dividen en cuatro grupos (cuadro 1) (Carter y Wise, 2004):

Cuadro 1. Clasificación de los clostridios (Carter y Wise, 2004; Ortiz-Ortega *et al.*, 2012).

Neurotóxicos	Causan enfermedad mediante la producción de potentes exotoxinas (neurotoxinas), ejemplo: tétanos y botulismo
Histotóxicos	Son causantes de afecciones tisulares, principalmente en los músculos, después de sufrir alguna herida, ejemplo: edema maligno y pierna negra
Hepatotóxicos	Estos producen toxinas en el hígado y causan enfermedades tales como la hepatitis necrótica o hemoglobinuria bacilar
Enterotóxicos	La fuente de infección es alimenticia, provocan enterotoxemia, aunque ocasionalmente pueden ser histotóxicas

Clostridium es uno de los géneros que comprenden el grupo de bacterias de importancia económica considerable en medicina veterinaria, debido a que su tratamiento es impráctico. En general, se le da el nombre de clostridiosis a una amplia variedad de enfermedades causadas por bacterias de este género, las cuales tienen la capacidad de afectar cualquier parte del cuerpo que ofrezca las condiciones para su desarrollo (Miyashiro *et al.*, 2007). Los clostridios poseen poca habilidad invasiva, y la patogenicidad de dichas bacterias está determinada

principalmente por la producción de toxinas (Baldassi *et al.*, 2004), las que a su vez proliferan en los tejidos parenquimales con la subsecuente toxemia fatal (Glock y DeGroot, 1998).

1. Características bacteriológicas

1.2. Hábitat

Los clostridios son saprófitos de vida libre, distribuidos ampliamente en el suelo. Persisten en nichos ecológicos con condiciones de potencial de oxidación-reducción bajo. Algunas especie son más prevalentes en algunas áreas geográficas y algunas existen en el tracto intestinal (Carter y Wise, 2004).

1.3. Modo de infección

Aunque las infecciones clostridiales más importantes son adquiridas por ingestión o mediante heridas (cuadro 2), otras surgen por vía endógena (Carter y Wise, 2004).

Cuadro 2. Algunas infecciones y su vía de inicio (Carter y Wise, 2004).

Heridas	Ingestión
<i>C. chauvoei</i>	Pierna negra
<i>C. septicum</i>	Botulismo (alimento)
Otras gangrenas gaseosas (mionecrosis)	Enterotoxemia
	Enfermedad negra
	Hemoglobinuria bacilar

1.4. Morfología

Los clostridios son bacilos móviles (excepto *C. perfringens*) relativamente largos, con terminaciones redondeadas, pueden observarse solos, en cadenas o filamentos largos. Las endosporas pueden estar localizadas en las regiones central, terminal o subterminal (figura 1) (Carter y Wise, 2004; Mainil *et al.*, 2006).

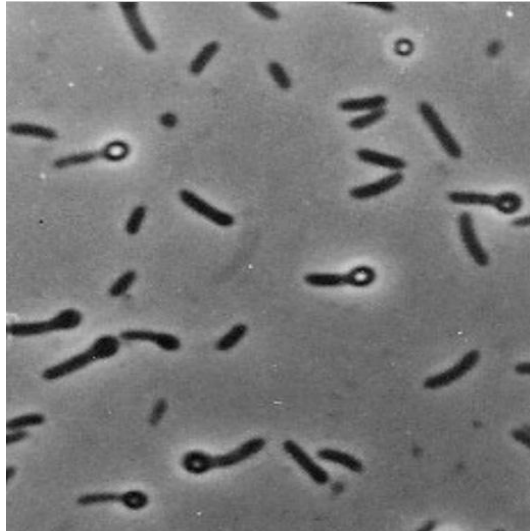


Figura 1. Fotomicrografía de contraste de fases de *C. hungatei* en la que pueden observarse los bacilos y las células esporuladas (Monserrate, s/f).

1.5. Resistencia

Las endosporas de los clostridios son altamente resistentes a varios agentes físicos y químicos, incluyendo desinfectantes. En este respecto son similares a las esporas producidas por *Bacillus anthracis*. Las esporas de *C. botulinum* sobreviven en el hervor hasta por 30 minutos; la autoclave a 121 °C durante 20 minutos es letal. Las formas vegetativas de los clostridios son susceptibles a la mayoría de los desinfectantes (Carter y Wise, 2004). En el caso de *C. botulinum* las esporas pueden sobrevivir hasta por 30 años y germinar bajo buenas condiciones de calor y humedad (Kummel *et al.*, 2012).

2. *Clostridium chauvoei*

Este microorganismo es el agente causal de las enfermedades conocidas como pierna negra (Bagge *et al.*, 2009; Useh *et al.*, 2010) y edema maligno en el ganado (Miyashiro *et al.*, 2007). La enfermedad se reportó por primera vez en 1870 (Useh *et al.*, 2003; Useh *et al.*, 2007); y hasta la fecha dicho padecimiento afecta principalmente al ganado bovino ocasionando altas pérdidas económicas (Farias *et al.*, 2012).

La pierna negra es una infección endógena atraumática, y se considera que una proporción considerable de bovinos alberga al *C. chauvoei* en el hígado. Los animales afectados están anoréxicos, deprimidos, con fiebre y cojera (solo un lado del miembro), se aprecia hinchazón, dolor y calor en el área; la cual posteriormente se torna fría, edematosa y crepitante. La muerte suele presentarse dentro de las 24 – 48 horas posteriores al desarrollo de la infección (Miyashiro *et al.*, 2007).

C. chauvoei produce una enzima llamada neuraminidasa, la cual se sugiere desempeña un papel importante en la diseminación del microorganismo en los tejidos de los rumiantes afectados, esta enzima es la clave para el catabolismo del ácido siálico, el cual facilita la propagación (Useh *et al.*, 2004; Vilei *et al.*, 2011). La neuraminidasa y las toxinas producidas por la bacteria actúan sinérgicamente produciendo leucopenia, linfopenia, neutropenia, eosinopenia y monocitopenia; por lo que se cree que los protocolos terapéuticos deben enfocarse en la inhabilitación de esta neuraminidasa y en las toxinas producidas (Useh *et al.*, 2010).

El agente tiene preferencia por los músculos grandes (muslo, diafragma y corazón), los cuales a la necropsia pueden observarse en color rojo oscuro, seco y esponjoso al tacto (Miyashiro *et al.*, 2007).

El edema maligno se considera una condición exógena, esto debido a que el microorganismo presente en el medio ambiente logra entrar al flujo sanguíneo a través del tracto gastrointestinal o hacia los tejidos después de sufrir una herida en la piel o mucosas, además de presentarse las debidas condiciones anaerobias para el desarrollo de la bacteria (Odani *et al.*, 2009; Vilei *et al.*, 2011).

Los tipos de traumatismo que predisponen a un animal a desarrollar el edema maligno incluyen, pero no se restringen a inyecciones intramusculares, castración, y parto. Este último es una forma especial de edema maligno caracterizado por vulvovaginitis y ocasionalmente metritis que se desarrolla posterior al parto en vacas (figura 2a-b) (Odani *et al.*, 2009).



Figura 2. a): Edema hemorrágico difuso en la región perineal que afecta la vulva y vagina. **b):** En esta imagen puede observarse edema y exudado fibrinoso que involucra la vulva (Vu), vagina (Va) y cervix (C). Las dos imágenes pertenecen a diferentes casos presentados en vacas Holstein (Odani *et al.*, 2009).

3. *Clostridium septicum*

Esta es una enfermedad generalmente fatal, la infección puede ocurrir por la contaminación de heridas posteriores a castración, sanidad deficiente en la vacunación, etc. (Troxel *et al.*, 2001).

Esta es una bacteria que tiene la capacidad de diseminarse rápidamente a nivel de la fascia. El progreso de la enfermedad es rápido, con signos clínicos evidentes dentro de las primeras 24 horas y generalmente fatal entre el día 1 y 4 postinfección. Este microorganismo ha sido implicado en una forma de edema maligno en el ganado, además de producir abomasitis hemorrágica o necrosante en becerras, también conocida como “braxy” (Odani *et al.*, 2009).

Este clostridio produce una alfa toxina (hemolisina) relacionada a la toxina épsilon del *C. perfringens* tipos B y D. Esta alfa toxina utiliza unas proteínas de la membrana celular como su receptor, derivando en una activación proteolítica e interactúa con otros monómeros para formar un poro transmembranal. Este poro es esencial para que la toxina cause toxicidad, mionecrosis, hemorragia intersticial, edema y colapso microvascular (Kosaki *et al.*, 2005; Odani *et al.*, 2009).

En adición, el clostridio también produce delta toxinas (hemolisina), beta toxinas (ADNasa, leucocida), gamma toxinas (hialuronidasa), neuraminidasa, hemaglutinina, quinasa, lipasa y sialidasa; las cuales, aunque no son letales, contribuyen a la patogénesis facilitando la invasión de los tejidos y la mionecrosis mediante la reducción del flujo microvascular (Odani *et al.*, 2009).

4. *Clostridium haemolyticum* y *C. novyi*

En rumiantes se presentan dos síndromes clínicos causados por las bacterias exotoxémicas del grupo de *C. novyi*: la enfermedad negra (EN), causada por *C. novyi* tipo B (Oaks *et al.*, 1997) y la hemoglobinuria bacilar (HB) o enfermedad , causada por *C. haemolyticum* (o *C. novyi* tipo D) (Ahourai *et al.*, 1990; Oaks *et al.*, 1997).

La EN clínicamente se caracteriza por muerte repentina. Usualmente existe evidencia de trayectos de migración de trematodos hepáticos, lo cual suele ser una lesión típica (Oaks *et al.*, 1997).

La hemoglobinuria bacilar o enfermedad de agua roja fue descrita por primera vez en 1916, como una enfermedad enzootica en áreas del oeste de los Estados Unidos (Ahourai *et al.*, 1990). Se caracteriza por muerte peraguda y hemólisis intravascular con hemoglobinuria debido a la acción de la betatoxina (Oaks *et al.*, 1997).

Dentro de la patogénesis de la enfermedad, se cree que esta por lo general comienza con la ingestión de organismos presentes en el medioambiente, seguido por el desarrollo de esporas en las células de Kupffer del hígado; dichas esporas permanecen inactivas hasta que se presenta alguna alteración en el hígado (trauma, infarto o migración parasitaria) (figura 3), lo cual resulta en la formación ambientes anaeróbicos localizados que permiten la germinación de las esporas (Ahourai *et al.*, 1990; Oaks *et al.*, 1997).

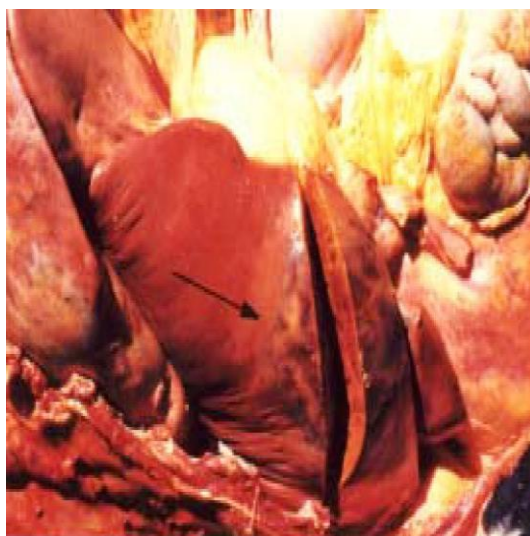


Figura 3. Obsérvese el infarto en el lóbulo parietal derecho del hígado de una vaca con hemoglobinuria bacilar (Ahourai *et al.*, 1990).

Las formas vegetativas de *C. novyi* tipo B producen las toxinas alfa y beta y *C. haemolyticum* solo la toxina beta; cuando dichas toxinas son absorbidas sistémicamente causan las lesiones y los signos clínicos de la EN y HB, respectivamente. En ambas enfermedades, la lesión corresponde a una necrosis hepática aguda, con focos de bacterias exotoxigénicas y otras lesiones relacionadas a toxemia y daño vascular generalizado (Oaks *et al.*, 1997).

5. *Clostridium perfringens*

El microorganismo se transmite de manera directa a animales sanos a través del suelo y alimentos contaminados (Rahman-Mafuza *et al.*, 2012). Es uno de los más importantes agentes causales de enfermedad entérica en los animales domésticos (Kalender *et al.*, 2007). El microorganismo se encuentra alojado en los intestinos de la mayoría de los animales; sin embargo, permanece en bajos números debido a la peristalsis (Soler-Jover *et al.*, 2004; Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007). La enfermedad clínica no ocurre a menos que ocurra un disturbio en el

balance microbiano del intestino, entre ellos se pueden contar los cambios repentinos en la dieta y algunos otros factores que desencadenan una proliferación rápida de la bacteria, la cual produce grandes cantidades de toxinas, que son absorbidas desde el intestino hacia la circulación sanguínea (Soler-Jover *et al.*, 2004; Nowell *et al.*, 2012).

La enfermedad se manifiesta principalmente con disturbios neurológicos severos fatales; edema en los pulmones, corazón, riñones e intestino, los cuales se asocian al daño microvascular (Soler-Jover *et al.*, 2004; Sayeed *et al.*, 2007).

La enterotoxemia en el ganado está caracterizada por muerte súbita con alta mortalidad y lesiones de enteritis hemorrágica en el intestino delgado (Kalender *et al.*, 2007; Miyashiro *et al.*, 2009).

Las esporas del microorganismo persisten en el suelo, sedimentos y áreas sujetas a la contaminación fecal. Este clostridio produce un gran número de enzimas y toxinas, las cuales, desempeñan papeles importantes en la producción de varias manifestaciones de enfermedad, tales como gangrena severa, diarrea, disentería y afecciones musculares (Rahman-Mafuza *et al.*, 2012).

El organismo por si solo es capaz de producir diferentes manifestaciones patológicas entéricas e histotóxicas tanto en humanos como en animales (Ahsani *et al.*, 2010).

C. perfringens es uno de los agentes causales de diarrea neonatal. La infección puede presentarse en animales jóvenes con un rango de menos de 2 semanas y mayores de 2 meses de edad (Amimoto *et al.*, 2007; Koç y Gökçe, 2007).

Este microorganismo posee un arsenal de más de 15 toxinas (Ahsani *et al.*, 2010); de las cuales, las toxinas alfa (α), beta (β), épsilon (ϵ) y iota (ι), comprenden

las cuatro principales producidas por el microorganismo y que además forman la base para la categorización de esta bacteria en cinco diferentes tipos toxigénicos: A, B, C, D y E (cuadro 3) (Avki *et al.*, 2009; Ahsani *et al.*, 2010).

Cuadro 3. *C. perfringens*: tipos, toxinas y enfermedades asociadas (Zerbini y Ossiprandi, 2010).

Tipo	Toxinas	Enfermedad
A	α	Mionecrosis, intoxicación por alimento, enteritis necrótica en aves de corral, enterotoxemia en bovinos y ovinos, enterocolitis necrótica en lechones; posiblemente colitis en equinos y gastroenteritis hemorrágica en perros
B	α, β y ϵ	Disentería en corderos neonatos, enteritis crónica en corderos destetados, enteritis hemorrágica en becerros(as) y potros, enterotoxemia hemorrágica en ovejas adultas
C	α y β	Enteritis necrótica en humanos y aves de corral, enterotoxemia hemorrágica o necrótica en lechones, ovi-caprinos y potros neonatos, enterotoxemia aguda en ovinos adultos
D	α y ϵ	Enterotoxemia en corderos (riñón pulposo) y bovinos, enterocolitis en caprinos neonatos y adultos; posiblemente enterotoxemia en bovinos adultos
E	α y ι	Enterotoxemia en corderos y becerros, enteritis en conejos; rango de hospedero y tipo de enfermedad no esclarecido

Las toxinas producidas dependen de la cepa de *C. perfringens* involucrada, y cada tipo induce un síndrome específico; de todas, la toxina α es considerada la más potente de todas las producidas por el clostridio (Rahman-Mafuza *et al.*, 2012), la cual es hemolítica, necrotizante y letal (Kalender *et al.*, 2007); además, la toxina β_2 tiene desempeña un papel sinérgico con la toxina α en el desarrollo de las lesiones hemorrágicas en el intestino delgado en los casos de enterotoxemia en bovinos (Vilei *et al.*, 2005; Kalender *et al.*, 2007).

Existen reportes en el que *C. perfringens* tipo A ha estado asociado a muchos incidentes de mastitis gangrenosa en bovinos (figura 4); sin embargo es necesario definir el tipo de toxina con la finalidad de desarrollar la vacuna adecuada para esta situación (Osman *et al.*, 2009).



Figura 4. Animal afectado con mastitis gangrenosa, obsérvese la demarcación de la línea necrótica (área negruzca) (Osman *et al.*, 2009).

C. perfringens tipo A, D y E, se ha visto involucrado también en casos de ulceración del abomaso (figura 5) en becerras lactantes. En frotis de la mucosa del abomaso fue posible observar bacilos Gram-negativos, los cuales se sembraron en medios selectivos y posteriormente fueron identificados como *C. perfringens* tipo mediante PCR (Assis *et al.*, 2002).

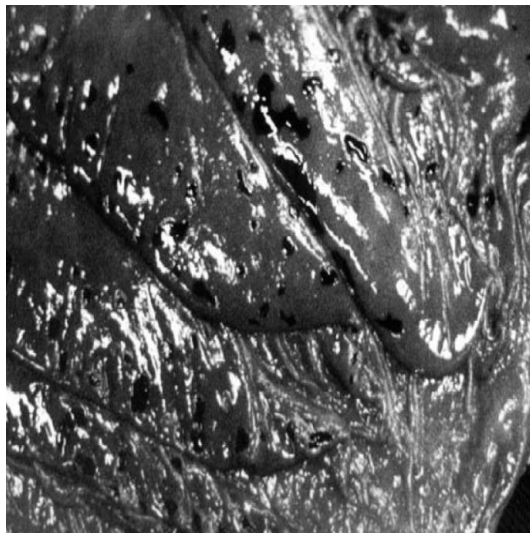


Figura 5. Abomaso de una becerro con múltiples úlceras (Assis *et al.*, 2002).

En lo que respecta a las becerras, se sugiere que en animales hambrientos que toman leche en exceso se promueve el sobre-crecimiento de *C. perfringens* tipo D en el abomaso; en adición a esto, si el animal fue mal calostreado y su estado nutricional es pobre, esto puede causar un estrés con la consecuente disminución de su estado inmunitario, desencadenando las condiciones para la afección por el microorganismo (Assis *et al.*, 2002).

En un estudio realizado por Niilo *et al.*, los animales inoculados experimentalmente con *C. perfringens* tipo D, presentaron signos neurológicos agudos y edema pulmonar severo, además de hidrotórax, hidroperitoneo y hemorragias severas; algunos de los animales murieron a los 6 días sin mostrar signos ni desarrollar cambios patológicos. En otro estudio desarrollado por Uzal *et al.*, se reportó que los animales desarrollaron pérdida de la consciencia, hiperestesia, convulsiones tónico-clónicas intermitentes y recumbencia; ocasionados por el edema perivascular proteináceo en el tálamo y el cerebro; esos mismos animales mostraron disnea ocasionada por el edema pulmonar agudo severo (figuras 6 y 7) (Filho *et al.*, 2009).

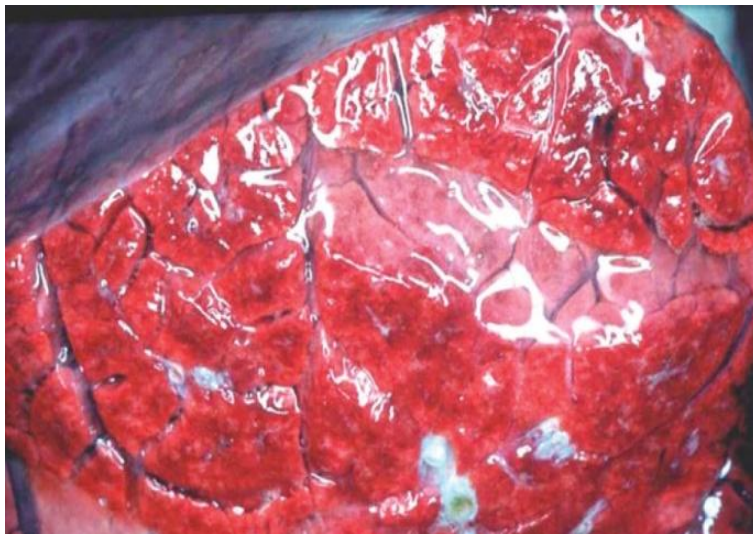


Figura 6. Edema pulmonar agudo. Nótese el septo interlobulillar severamente distendido por el líquido del edema (Filho *et al.*, 2009).

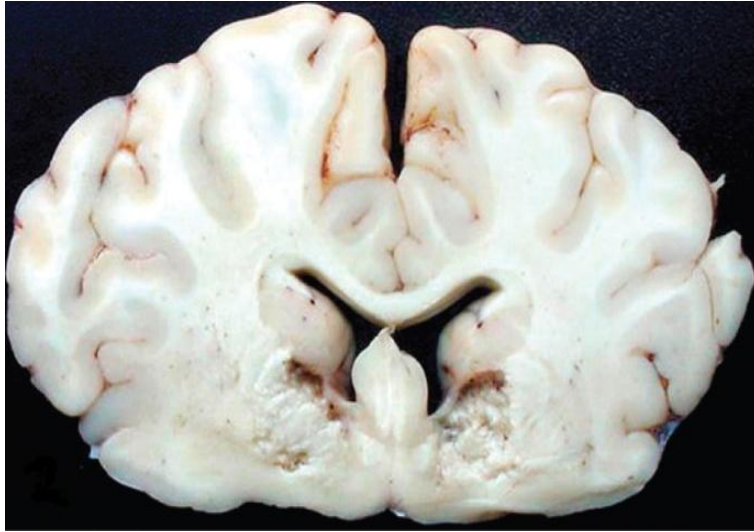


Figura 7. Encefalomalacia simétrica focal. Este animal desarrolló signos neurológicos progresivos, los cuales llegaron a ser muy severos al día 8 postinoculación, tiempo en el cual se le practicó la eutanasia (Filho *et al.*, 2009).

Los tipos B – E son menos comunes en los tractos gastrointestinales de los animales y pueden ser encontrados en el medio ambiente en áreas donde las enfermedades producidas por esos microorganismos son enzooticas (Zerbini y Ossiprandi, 2010).

6. *Clostridium botulinum*

El botulismo es una enfermedad fatal caracterizada por parálisis, la cual es ocasionada por las neurotoxinas producidas por la bacteria (Steinman *et al.*, 2006). Dicho padecimiento tiene una gran importancia debido a la alta tasa de mortalidad (Curci *et al.*, 2010) y las grandes pérdidas económicas que ocasiona (Nakamura *et al.*, 2010).

El botulismo generalmente es resultado de la ingestión de las esporas de *C. botulinum*; las cuales germinan, se multiplican y producen neurotoxinas (BoNT) en el tracto gastrointestinal (Nakamura *et al.*, 2010); aunque la infección puede ocurrir por tres vías: contaminación de una herida, ingestión de la toxina preformada, o

por la proliferación de neurotoxinas en el tracto gastrointestinal (botulismo toxico-infeccioso) (Kummel *et al.*, 2012).

Las toxinas se distribuyen a través del torrente sanguíneo, viajan retrógradamente hacia las uniones neuromusculares de las células nerviosas, interfiriendo con la liberación de acetilcolina, dando como resultado la característica parálisis flácida progresiva que inicia con desplazamiento torpe, que comienza por las extremidades posteriores y avanza cranealmente (Yoneyama *et al.*, 2008; Kummel *et al.*, 2012).

El microorganismo produce siete neurotoxinas inmunológicamente distintas A, B, C_α, C_β, D, E, F y G (Sharma *et al.*, 2005; Senturk y Cihan, 2007; Kummel *et al.*, 2012); los tipos A, B, E y más raramente la F, son las causantes del botulismo en humanos (Nakamura *et al.*, 2010), y las toxinas tipo C y D son las fuentes más comunes de botulismo en animales (Curci *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2010; Sugawara *et al.*, 2010).

En algunos estudios se ha encontrado que algunas cepas bacterianas atóxicas de *C. botulinum* desarrollan su potencial tóxico mediante la estimulación por bacteriófagos, los cuales influyen en la regulación de genes que inducen al microorganismo a producir toxinas (Ortiz-Ortega *et al.*, 2012).

En el pasado, el botulismo en el ganado estaba asociado exclusivamente a la contaminación del agua y alimento con toxinas provenientes de los esqueletos de gatos, aves acuáticas y excremento de aves (Nakamura *et al.*, 2010); pero se ha reportado que ciertos piensos contaminados con la toxina de *C. botulinum* también han resultado en botulismo (Curci *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2010). El periodo de latencia varía desde 24 horas hasta 7 días y depende de la cantidad de toxinas ingeridas (Kummel *et al.*, 2012). Se ha reportado que los signos clínicos usualmente aparecen entre 3 – 17 días post-infección y que los animales afectados suelen sobrevivir entre 1 y 4 días (Kummel *et al.*, 2012).

Se pueden observar signos clínicos tales como anorexia, debilidad, dilatación pupilar, disminución de las contracciones ruminales, ataxia, dificultad para levantarse, el animal puede estar en recumbencia con la cabeza hacia el flanco (figura 8). La consistencia de las heces varía desde diarrea hasta un excremento duro y seco, hay dificultad para tragar, salivación y la lengua protruye fuera de la boca (figura 9), lo cual tiene como resultado la disminución en la ingesta de alimento (Senturk y Cihan, 2007; Kummel *et al.*, 2012).



Figura 8. Posición recumbente en una vaca con botulismo, nótese que la postura es similar a la adoptada en la hipocalcemia (Senturk y Cihan, 2007).



Figura 9. Parálisis de la lengua en un caso clínico de botulismo (Kummel *et al.*, 2012).

Cuadro 4. Hallazgos clínicos y neurológicos en 26 vacas con botulismo (Senturk y Cihan, 2007).

Variable	Hallazgo	# de animales en los que se observó
Apetito	Disminuido	9
	Ausente	17
Motilidad ruminal	Reducida	9
	Ausente	17
Salivación	Ligera	12
	Marcada	14
Fuerza de la lengua	Moderadamente reducido	7
	Severamente reducido	19
Habilidad para tragar	Difícil	8
	Inhábil	18
Reflejo pupilar a la luz	Disminuido	22
	Ausente	4
Reflejo anal	Reducido	26
	Bajo	6
Tono de mandíbula y cola	Ausente	20
		26
Sensibilidad al piquete con aguja	Sin reacción	26
Temperatura corporal ^a (rango de referencia: 37.8 – 39.2 °C)	Normal	15
	Alto	11
	Bajo	26
Frecuencia cardíaca ^b (rango de referencia: 60 – 80 latidos/minuto)	Normal	4
	Bradicardia	18
	Taquicardia	4
Frecuencia respiratoria ^c (rango de referencia: 10 – 30 respiraciones/minuto)	Alta	26

^a Temperatura corporal: normal (38.5 ±0.4 °C); alta (39.6 ±0.2 °C); baja (35.6 ±0.3 °C)

^b Frecuencia cardíaca: normal (72±3 latidos/minuto); bradicardia (48±4 latidos/minuto); taquicardia (96±6 latidos/minuto)

^c frecuencia respiratoria: alta (42 ± 4 respiraciones/minuto)

El pronóstico depende del estado clínico de la enfermedad. Se ha reportado la recuperación en pacientes con signos clínicos leves. En los casos agudos, la muerte es causada por parálisis respiratoria (Kummel *et al.*, 2012).

Se han observado signos de botulismo tóxico-infeccioso en el parto y estos consisten en indigestión, laminitis aguda no infecciosa, alteración de las venas con pulso venoso positivo; edema en las piernas, ubres, formación de papada, abdomen endurecido, respiración forzada y muerte inesperada. Estos son

signos típicos de la forma crónica del botulismo tóxico-infeccioso y se le conoce como “botulismo visceral crónico” (Kummel *et al.*, 2012).

Existen casos en los que se ha confirmado la presencia de las toxinas del microorganismo en los intestinos de vacas con desplazamiento de abomaso (Avki *et al.*, 2009).

7. *Clostridium sordelli*

Esta bacteria se aisló por primera vez a partir de heridas infectadas en seres humanos, posteriormente, dicho microorganismo estuvo involucrada como la causante de muertes en el ganado del estado de Nevada, en los Estados Unidos. Recientemente, se ha detectado la presencia de este organismo en infecciones fatales posteriores a cirugías obstétricas (Ortiz-Ortega *et al.*, 2012).

Este microorganismo es una cepa altamente patogénica para los animales, tiene la capacidad de producir dos factores de virulencia, las toxinas hemorrágicas y las toxinas letales, que están relacionadas con diarrea y enterotoxemia y gangrena caseosa, respectivamente. La exposición a la toxina hemorrágica induce hemorragias, mientras que la toxina letal provoca edema severo (Ortiz-Ortega *et al.*, 2012).

8. Diagnóstico

El diagnóstico definitivo requiere del aislamiento e identificación del agente causal; sin embargo, los microorganismos son extremadamente sensibles al oxígeno y tienen requerimientos nutricionales fastidiosos, haciendo del aislamiento rutinario una herramienta de diagnóstico difícil y poco fiable (Oaks *et al.*, 1997).

8.1. Cultivo

Todos los clostridios crecen bien en medios enriquecidos, aparte de ser anaerobios, la mayoría de las especies no tienen requerimientos particulares de crecimiento (a excepción de *C. piliforme*) (cuadros 5 y 6). El pre-requisito más importante es enviar las muestras al laboratorio en estricta anaerobiosis (Mainil *et al.*, 2006).

8.2. Aislamiento e Identificación

El diagnóstico presuntivo de pierna negra y edema maligno depende de los hallazgos clínicos y patológicos, la confirmación de la enfermedad se realiza típicamente con el aislamiento e identificación del microorganismo, la producción de toxinas y los métodos inmunológicos; sin embargo, estos métodos son muy tardados y laboriosos (Miyashiro *et al.*, 2007), además de que los métodos inmunológicos pueden arrojar resultados equivocados debido a que *C. chauvoei* y *C. septicum* tienen varios antígenos en común (Miyashiro *et al.*, 2007; Ortiz-Ortega *et al.*, 2012).

Uno de los principales problemas es que los agentes causales de la enfermedad negra y la hemoglobinuria bacilar pueden ser aislados de hígados normales, dando como resultado falsos positivos. Consecuentemente, el diagnóstico de estos padecimientos suele realizarse en base a los signos clínicos, lesiones micro y macroscópicas, así como con la detección de anticuerpos fluorescentes contra los microorganismos del grupo *C. novyi* en improntas de hígado (Oaks *et al.*, 1997). *C. novyi* tipo B y *C. haemoliticum* están estrechamente relacionados, por lo que la utilización de antisuero policlonal suelen presentarse reacciones cruzadas haciendo difícil la diferenciación entre esas dos especies (Oaks *et al.*, 1997).

Cuadro 5. Ejemplo del tipo de muestra(s) y procedimientos de rutina para el diagnóstico de algunos clostridios (Mainil *et al.*, 2006).

Enfermedad	Especie	Muestra	Inmunoensayos	Producción de toxinas <i>in vivo</i>
Miositis	<i>Chauvoei</i>	Músculo	IFA ¹ , PAP ²	No
	<i>Septicum</i>		IFA, PAP	No
Gangrena gaseosa	<i>Septicum</i>	Líquido, efusiones, órganos (músculo, hígado, bazo...), hisopos	IFA	No
	<i>Novyi A</i>		IFA	Sí
	<i>Sordellii</i>		IFA	No
	<i>Chauvoei</i>		IFA	No
	<i>Perfringens A</i>		No	Sí
Hepatitis	<i>Novyi B</i>	Lesiones hepáticas	IFA	Sí
	<i>Haemolyticum</i>		IFA, PAP	Sí
Dermatitis	<i>Septicum</i>	Piel y tejido subcutáneo	No	No

¹ IFA = Prueba de Inmunofluorescencia

² PAP = Técnica de Peroxidasa-Antiperoxidasa

Cuadro 6. Pruebas bioquímicas para identificar algunas especies de clostridios (Ahsani *et al.*, 2010).

Especie de clostridio	Pruebas bioquímicas	Agar yema de huevo			Fermentación de carbohidratos				Reacción en leche		
		Prueba de catalasa	Producción de lecitinasa	Producción de lipasa	Hidrólisis de gelatina	Producción de Indól	Glucosa	Lactosa		Sucrosa	Maltosa
<i>C. perfringens</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	dc
<i>C. baratii</i>	-	+	-	-	-	+	+W	+	+W	-	C
<i>C. absonum</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	H	C
<i>C. bifementans</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-W	+	d
<i>C. sporogenes</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-W	H	d
<i>C. leptum</i>	-	-	-	-	-	-	H	H	+	-	-
<i>C. aurantibutyricum</i>	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	C
<i>C. sporosphaeroides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. symbiosum</i>	-	-	-	-	-	+	H	-	-	H	-C
<i>C. scatologenes</i>	-	-	-	-	H	+	-	-	-	+	-
<i>C. ramosum</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	C
<i>C. sordellii</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+W	H	d

*c: cuaja; d: digestión; dc: primero digestión después cuaja; w: débil.

8.3. Reacción en Cadena Polimerasa

Se ha demostrado que la utilización del ADNr de 16s hace más rápido el diagnóstico de las infecciones ocasionadas por diferentes *Clostridium spp* (Ortiz-Ortega *et al.*, 2012). La amplificación de regiones específicas de ácidos nucleicos del genoma bacteriano mediante PCR está ampliamente difundida. La PCR tiene la habilidad de amplificar ADN a partir de una pocas bacterias, además de ser simple y rápido; por lo que ofrece muchas ventajas sobre los métodos convencionales utilizados en la identificación de las especies de clostridios (Miyashiro *et al.*, 2007; Bagge *et al.*, 2009).

Para el diagnóstico de pierna negra se ha desarrollado una prueba a partir de la extracción del ADN del microorganismo en papel filtro impregnado con sangre o tejido, facilitando el envío de muestras al laboratorio, además de que la factibilidad del material genético en este medio representa un gran avance en el diagnóstico de la enfermedad (Farias *et al.*, 2012).

En el caso de *C. perfringens* la utilización de la PCR evita los problemas como el aislamiento y las pruebas éticamente inaceptables que se utilizan para dicho fin, esta técnica es una herramienta de fácil utilización en el diagnóstico veterinario de rutina (Piatti *et al.*, 2004; Zerbini y Ossiprandi, 2010). Comparada con otras técnicas de identificación, basadas en una gran cantidad de muestras, la tecnología basada en la PCR se considera la herramienta más conveniente, confiable y segura (Ahsani *et al.*, 2010; Rahman-Mafuza *et al.*, 2012), esta puede emplearse para la detección de los genes de las principales toxinas, tales como α (*cpa*), β (*cpb1*), ϵ (*etx*), ι (*iap*) de *C. perfringens* (cuadro 7) (Rahman-Mafuza *et al.*, 2012); esta es una técnica segura para quien la realiza, debido a que la preparación de la muestra comienza con una lisis celular y extracción del ADN, proceso que no sobrevive la célula y que la hace perder sus propiedades patogénicas (Ahsani *et al.*, 2010).

Cuadro 7. Cebadores y condiciones de PCR para la detección los genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpb2*, y *cpe* de *C. perfringens* (Das *et al.*, 2012).

Gen de la toxina	Secuencia del cebador 5´- 3´	Concentración del cebador (µL)	Tamaño del amplicón (bp)
<i>cpa</i>	For-gctaatgttactgccgttga Rev-cctctgatacatcgtgtaag	0.50	324
<i>cpb</i>	For-gcgaatagctggaatcatcta Rev-gcaggaacattagatatcttc	0.50	180
<i>etx</i>	For-gcggtgatatccatctattc Rev-ccacttactgtcctactaac	0.50	655
<i>iA</i>	For-actactctcagacaagacag Rev-ctttccttctattactatacg	0.34	446
<i>cpe</i>	For-ggagatggttgatattagg Rev-ggaccagcagttgtagata	0.36	233
<i>cpb2</i>	For-agattttaaatatgatcctaacc Rev-caatacccttcaccaataactc	0.36	567

La PCR en tiempo real para la detección simultánea de las neurotoxinas *bont/a*, *bont/b*, *bont/e* y *bont/f* de *C. botulinum*, ha demostrado ser una herramienta rápida y confiable para el análisis de alimento y muestras clínicas en casos de botulismo; por lo que este ensayo tiene un gran valor en su aplicación en estudios de prevalencia; así como en brotes (Kirchner *et al.*, 2010).

8.4. Criterio de interpretación de resultados

En general, los resultados de los análisis deben ser interpretados con precaución. Algunos clostridios de origen intestinal (*C. septicum*, *C. perfringens*) invaden el cuerpo rápidamente después de la muerte, incluso durante el periodo agónico. Por otra parte, otros clostridios que son extremadamente sensibles al oxígeno morirán rápidamente al ser expuestos al aire. No existe una regla general; cada caso es único. Por lo tanto, en el criterio de interpretación deberán considerarse aspectos tales como los signos clínicos y las lesiones, el retraso entre la muerte y la toma de la muestra, la temperatura exterior, la calidad del muestreo, las condiciones de transporte, así como la pureza y el número de bacterias observadas (Mainil *et al.*, 2006).

9. Tratamiento

Todos o la mayoría de las especies de *Clostridium* son intrínsecamente resistentes a los aminoglucósidos (como todos los anaerobios), sulfonamidas (*C. perfringens* es una excepción) y diaminopirimidinas. La resistencia adquirida hacia los miembros de otras familias de antibióticos, especialmente a los macrólidos, lincosaminas, tetraciclinas y fenicoles, se ha ido desarrollando progresivamente. Incluso, algunos *Clostridium spp.* poseen determinantes genéticos (plásmidos, transposonas, etc.) para el desarrollo de resistencia y estos mismos sirven como reservorio de genes de resistencia para otros géneros y especies (Mainil *et al.*, 2006).

10. Control y Profilaxis

El control y la prevención comprenden medidas adecuadas de manejo y vacunaciones sistemáticas del hato debido a que los animales están en contacto permanente con los agentes y los factores que pueden desencadenar la enfermedad (Miyashiro *et al.*, 2007).

La profilaxis y el control son esenciales, y la primera aproximación a esto es la vacunación (Zerbini y Ossiprandi, 2010; Rahman-Mafuza *et al.*, 2012). Para que esto sea exitoso, la vacuna debe estar basada en las cepas clínicamente relevantes. Por lo tanto, la identificación de los toxinotipos y subtipos es crítica para el desarrollo y uso efectivo de las medidas de prevención, incluyendo la vacunación (Zerbini y Ossiprandi, 2010).

El éxito de los programas de vacunación depende del manejo, el tiempo adecuado de aplicación de la vacuna y el la utilización del producto comercial adecuado. La aplicación de bacterinas/toxoides multicepas de *Clostridium spp.* son parte importante en los programas de vacunación (Curci *et al.*, 2010).

Respecto a *C. botulinum*, la inmunización activa se recomienda hasta los 45 días postparto, debido a que el nivel de inmunidad transferido por las vacas vacunadas es alto (Curci *et al.*, 2010).

Se considera que la vacunación con toxoide bivalente C y D es altamente efectiva contra el botulismo en el ganado, pero el toxoide bivalente puede ser inefectivo contra el botulismo bovino causado por la BoNT/CD. De hecho, las vacunas H_c recombinantes para los serotipos C y D tienen poca eficacia en la neutralización de la BoTN/DC comparada con la BoTN/C, BoTN/CD y la BoTN/D (Nakamura *et al.*, 2010).

Las enfermedades clostridiales pueden afectar al ganado de cualquier edad, pero la preocupación recae más que nada en aquellos entre los 6 meses y 2 años de edad. Algunas de las vacunas requieren de una revacunación entre las 4 – 6 semanas de la aplicación de la dosis inicial (Troxel *et al.*, 2001).

Las vacunas clostridiales contienen adyuvantes con propiedades específicas, utilizados para potencializar la respuesta inmune contra los antígenos contenidos en la vacuna; sin embargo, el efecto de los diferentes animales sobre el rendimiento de los animales merece consideración (Richeson *et al.*, 2009).

Es muy importante que la vacuna sea aplicada en el tiempo debido para estimular una fuerte respuesta inmunológica contra los tipos de *C. perfringens* causantes de diarrea o enterotoxemia (figura 10). Se ha observado que la respuesta a los antígenos clostridiales es mayor cuando la segunda inmunización se retrasa entre 2 y 6 semanas después de la dosis inicial. También se reporta que los títulos de anticuerpos en el calostro pueden aumentar si las madres son vacunadas 4 meses antes del parto; por lo tanto, la no aplicación de vacunas y el consumo insuficiente de calostro puede ser la respuesta a la alta incidencia de diarrea neonatal e infecciones clostridiales (Koç y Gökçe, 2007).

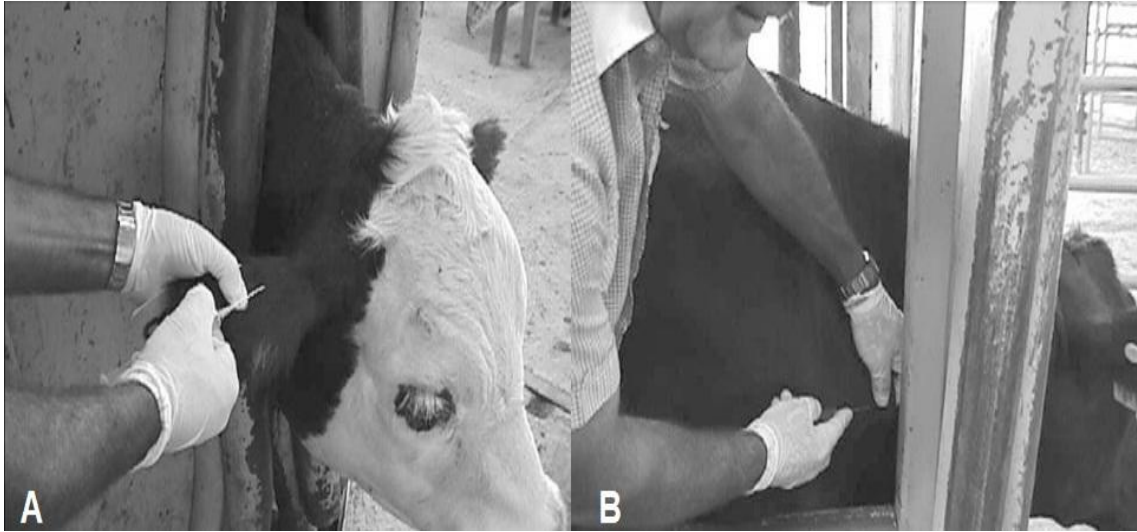


Figura 10. Sitios de aplicación para las vacunas clostridiales: A) subcutánea en la oreja y B) subcutánea en la región pre-escapular (Chirase *et al.*, 2001).

Literatura citada

- Ahourai, P., M. Ardehali, A. Ezzi, M. R. Gholami y M. Moosavi (1990). Bovine bacillary hemoglobinuria (*Clostridium haemolyticum*) in Iran. *J Vet Diagn Invest* 2(2): 143-144.
- Ahsani, M. R., M. R. Mohammadabadi y M. B. Shamsaddini (2010). *Clostridium perfringens* isolate typing by multiplex PCR. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 16(4): 573-578.
- Amimoto, K., T. Noro, E. Oishi y M. Shimizu (2007). A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology* 153(Pt 4): 1198-1206.
- Assis, R. A., F. C. F. Lobato, E. J. Facury-Filho, F. A. Uzal, F. J. F. Santana, L. D. Dias y P. M. Parreiras (2002). Isolation of *Clostridium perfringens* type D from a suckling calve with ulcerative abomasitis. *Arch Med Vet* 34(2): 287-292.
- Avki, S., H. Turutoglu, R. Alp, K. Yigitarslan y M. D. Temizsoylu (2009). Determination of *Clostridium botulinum* Toxins in Dairy Cows with Abomasal Displacement. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 15(5): 791-794.
- Bagge, E., S. S. Lewerin y K. E. Johansson (2009). Detection and identification by PCR of *Clostridium chauvoei* in clinical isolates, bovine faeces and substrates from biogas plant. *Acta Vet Scand* 51: 8.
- Baldassi, L., M. L. Barbosa, E. E. Bach y S. T. Iaria (2004). Virulence exaltation of *C. perfringens* strains from bovines. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 10(3): 280-292.
- Carter, G. R. y D. J. Wise (2004). *Essentials of veterinary bacteriology and micology*. 6th Edition. Ames, Iowa State Press.
- Curci, V. C. M., A. H. C. Nogueira, F. L. C. Nobrega, R. F. Araujo, S. H. V. Perri, T. C. Cardoso y I. S. Dutra (2010). Neonatal immune response of Brazilian beef cattle to vaccination with *Clostridium botulinum* toxoids types C and D by indirect ELISA. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 16(3): 509-513.
- Chirase, N. K., L. W. Greene, G. D. Graham y J. M. Avampato (2001). Influence of clostridial vaccines and injection sites on performance, feeding behavior, and lesion size scores of beef steers. *J Anim Sci* 79(6): 1409-1415.
- Das, A., Y. Mazumder, B. K. Dutta, B. R. Shome, K. M. Bujarbaruah y R. Kumar (2012). Molecular Typing of *Clostridium perfringens* Isolated from Diarrhoeic Cattle. *J Anim Sci Adv* 2(2): 226-229.
- Farias, L., S. A. Botton, M. M. Costa y A. P. C. Vargas (2012). Molecular Identification of *Clostridium chauvoei* from Common Filter Paper. *Acta Scientiae Veterinariae* 40(4): 1-5.
- Fernandez-Miyakawa, M. E., S. Sayeed, D. J. Fisher, R. Poon, V. Adams, J. I. Rood, B. A. McClane, J. Saputo y F. A. Uzal (2007). Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D infection. *Infect Immun* 75(9): 4282-4288.
- Filho, E. J., A. U. Carvalho, R. A. Assis, F. F. Lobato, M. A. Rachid, A. A. Carvalho, P. M. Ferreira, R. A. Nascimento, A. A. Fernandes, J. E. Vidal y F. A. Uzal

- (2009). Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. *Vet Pathol* 46(6): 1213-1220.
- Glock, R. D. y B. D. DeGroot (1998). Sudden death of feedlot cattle. *J Anim Sci* 76(1): 315-319.
- Kalender, H., A. Kili y E. Atil (2007). Enterotoxemia in a Cow due to *Clostridium perfringens* Type A. *Turk J Vet Anim Sci* 31(1): 83-84.
- Kirchner, S., K. M. Kramer, M. Schulze, D. Pauly, D. Jacob, F. Gessler, A. Nitsche, B. G. Dorner y M. B. Dorner (2010). Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. *Appl Environ Microbiol* 76(13): 4387-4395.
- Koç, R. y H. I. Gökçe (2007). Determination of the Toxins and Biotypes of *Clostridium perfringens* in Diarrhoeic Calves in the Kars District of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 31(3): 207-211.
- Kosaki, S., B. M. Hang'ombe, T. Kohda y M. Mukamoto (2005). Relationship between *Clostridium septicum* Alpha-Toxin activity and binding to erythrocyte membranes. *J Vet Med Sci* 67(1): 69-74.
- Kummel, J., R. Krametter-Froetscher, G. Six, R. Brunthaler, W. Baumgartner y B. Altenbrunner-Martinek (2012). Descriptive study of botulism in an Austrian dairy herd: a case report. *Veterinari Medicina* 57(3): 143-149.
- Mainil, J., C. Duchesnes, P. E. Granum, M. G. Menozzi, M. Peck, S. Pelkonen, M. Popoff, E. Stackebrandt y R. Titball (2006). Clostridia in medical, veterinary and food microbiology - Diagnosis and typing. Luxembourg, European Commission.
- Miyashiro, S., L. Baldassi y A. F. C. Nassar (2009). Genotyping of *Clostridium perfringens* associated with sudden death in cattle. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 15(3): 491-497.
- Miyashiro, S., A. F. Nassar, M. C. A. M. Souza, J. B. Carvalho y J. E. B. Adegas (2007). Identification of *Clostridium chauvoei* in clinical samples cultures from blackleg cases by means of PCR. *Braz J Microbiol* 38: 491-493.
- Monserrate, E. (s/f). Fecha de consulta: Septiembre de 2012, Recuperado de: <http://www.science.smith.edu/departments/Biology/EMONSER/>.
- Nakamura, K., T. Kohda, K. Umeda, H. Yamamoto, M. Mukamoto y S. Kozaki (2010). Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. *Vet Microbiol* 140(1-2): 147-154.
- Nowell, V. J., A. M. Kropinski, J. G. Songer, J. I. MacInnes, V. R. Parreira y J. F. Prescott (2012). Genome sequencing and analysis of a type A *Clostridium perfringens* isolate from a case of bovine clostridial abomasitis. *PLoS One* 7(3): e32271.
- Oaks, J. L., S. T. Kanaly, T. J. Fisher y T. E. Besser (1997). Apparent *Clostridium haemolyticum/Clostridium novyi* infection and exotoxemia in two horses. *J Vet Diagn Invest* 9(3): 324-325.
- Odani, J. S., P. C. Blanchard, J. M. Adaska, R. B. Moeller y F. A. Uzal (2009). Malignant edema in postpartum dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 21(6): 920-924.

- Ortiz-Ortega, D., L. C. Villamil-Jiménez y S. R. Martínez (2012). Isolation and typing of *Clostridium spp.* 16S rRNA from soil samples obtained in areas with sudden mortality history in Colombia. *Glo Adv Res J Microbiol* 1(3): 033-040.
- Osman, K. M., M. I. El-Enbaawy, N. A. Ezzeldeen y H. M. G. Hussein (2009). Mastitis in dairy buffalo and cattle in Egypt due to *Clostridium perfringens*: prevalence, incidence, risk factors and costs. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 28(3): 975-986.
- Piatti, R. M., A. A. Ikuno y L. Baldassi (2004). Detection of bovine *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 10(2): 155-160.
- Rahman-Mafruz, S., R. K. Sharma, P. Borah, A. Chakraborty, R. K. Devi-Mandakini y N. Longjam (2012). Characterization of *Clostridium perfringens* isolated from mammals and birds from Guwahati city, India. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 18(1): 83-87.
- Richeson, J. T., E. B. Kegley, M. S. Gadberry, P. A. Beck, J. G. Powell y C. A. Jones (2009). Effects of on-arrival versus delayed clostridial or modified live respiratory vaccinations on health, performance, bovine viral diarrhea virus type I titers, and stress and immune measures of newly received beef calves. *J Anim Sci* 87(7): 2409-2418.
- Sayeed, S., J. Li y B. A. McClane (2007). Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infect Immun* 75(5): 2391-2398.
- Senturk, S. y H. Cihan (2007). Outbreak of botulism in a dairy herd in Turkey. *Ir Vet J* 60(8): 481-484.
- Sharma, S. K., B. S. Eblen, R. L. Bull, D. H. Burr y R. C. Whiting (2005). Evaluation of lateral-flow *Clostridium botulinum* neurotoxin detection kits for food analysis. *Appl Environ Microbiol* 71(7): 3935-3941.
- Soler-Jover, A., J. Blasi, I. Gomez de Aranda, P. Navarro, M. Gibert, M. R. Popoff y M. Martin-Satue (2004). Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. *J Histochem Cytochem* 52(7): 931-942.
- Steinman, A., M. Chaffer, D. Elad y N. Y. Shpigel (2006). Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism. *Clin Vaccine Immunol* 13(8): 862-868.
- Sugawara, Y., T. Matsumura, Y. Takegahara, Y. Jin, Y. Tsukasaki, M. Takeichi y Y. Fujinaga (2010). Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *J Cell Biol* 189(4): 691-700.
- Troxel, T. R., M. S. Gadberry, W. T. Wallace, D. L. Kreider, J. D. Shockey, E. A. Colburn, P. Widell y I. Nicholson (2001). Clostridial antibody response from injection-site lesions in beef cattle, long-term response to single or multiple doses, and response in newborn beef calves. *J Anim Sci* 79(10): 2558-2564.
- Useh, N. M., E. Amupitan, E. O. Balogun, S. Adamu, N. D. Ibrahim, A. J. Nok y K. A. Esievo (2007). Plasma pyruvic acid changes in Zebu cattle experimentally infected with *Clostridium chauvoei*. *Slov Vet Res* 44(3): 91-96.

- Useh, N. M., A. J. Nok, O. J. Ajanusi, E. O. Balogun, S. B. Oladele y K. A. N. Esievo (2004). In vitro production of neuraminidase by *Clostridium chauvoei* (Jakari strain). *Vet Arhiv* 74(4): 289-298.
- Useh, N. M., A. J. Nok y K. A. Esievo (2003). Pathogenesis and pathology of blackleg in ruminants: the role of toxins and neuraminidase. A short review. *Vet Q* 25(4): 155-159.
- Useh, N. M., A. J. Nok, N. D. G. Ibrahim y K. A. N. Esievo (2010). Leukocyte response in Zebu cattle experimentally infected with *Clostridium chauvoei*. *Bulg J Vet Med* 13(3): 169-178.
- Vilei, E. M., A. Johansson, Y. Schlatter, K. Redhead y J. Frey (2011). Genetic and functional characterization of the NanA sialidase from *Clostridium chauvoei*. *Vet Res* 42(1): 2.
- Vilei, E. M., Y. Schlatter, V. Perreten, R. Straub, M. R. Popoff, M. Gibert, A. Grone y J. Frey (2005). Antibiotic-induced expression of a cryptic *cpb2* gene in equine beta2-toxigenic *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol* 57(6): 1570-1581.
- Yoneyama, T., K. Miyata, T. Chikai, A. Mikami, T. Suzuki, K. Hasegawa, T. Ikeda, T. Watanabe, T. Ohyama y K. Niwa (2008). *Clostridium botulinum* serotype D neurotoxin and toxin complex bind to bovine aortic endothelial cells via sialic acid. *FEMS Immunol Med Microbiol* 54(3): 290-298.
- Zerbini, L. y M. C. Ossiprandi (2010). Molecular toxinotyping of *Clostridium perfringens* cattle isolates by multiplex PCR. *Ann Fac Medic Vet di Parma* 30: 71-80.