

201
170



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

Elaboración Experimental de un Toxoide Contra Car- bón Sintomático y Comparación del mismo con Bacterinas Comerciales.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
SERGIO DARIO RODRIGUEZ CAMARILLO

ASESOR:
M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ ECHEGARAY

MEXICO, D. F.

1979

8313



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo consta de:

RESUMEN

INTRODUCCION

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

Resumen

Se elaboraron 3 lotes de toxoide contra Carbón Sintomático por 3 diferentes métodos (4,15,21).

Los toxoides producidos junto con 7 bacterinas comerciales se sometieron a las pruebas que se establecen en los "Requerimientos Mínimos de Calidad que deceran llenar los - Productos Biológicos para uso Veterinario", que exige la Dirección General de Sanidad Animal (DIGSA) (20).

Sólo un toxoide de los 3 elaborados y 4 bacterinas comerciales, llenaron los requerimientos exigidos por la DIGSA. Las otras muestras, brindaron bajos títulos de protección. Se compararon los resultados obtenidos con las diferentes muestras y se analizaron los factores que afectan la calidad de estos productos como agentes inmunizantes.

INTRODUCCION

El Carbón Sintomático es una enfermedad infecciosa causada por Clostridium chauvoei, que afecta a bovinos, ovinos, caprinos y ocasionalmente a suinos (1,2,8).

La enfermedad se caracteriza en los animales susceptibles, por inflamación de las grandes masas musculares, toxemia grave y mortandad elevada (1,2,8,14).

En los bovinos se presenta principalmente en animales jóvenes, de 4 meses a 2 años de edad y el curso de la enfermedad es agudo y sobre-agudo, muriendo los animales infectados en 12 a 36 horas posteriores a la aparición de los primeros signos, algunos animales mueren en la fase asintomática de la misma (1,2,8).

En México el Carbón Sintomático se ha presentado en forma epizootica de varios años a la fecha, lesionando en forma importante la economía de nuestra ganadería (22).

Del año 1972 a 1975, la incidencia de Carbón Sintomático, junto con la Gangrena Gaseosa se había mantenido semiestable, con un ligero incremento, pero en 1976 se observó un gran aumento en la presencia de estas dos enfermedades y en el año de 1976 el número de casos reportados, equivalen al 261%, con respecto al año anterior.

Según un análisis epidemiológico de las Gangrenas Gaseosas, presentado en la VI Reunión Anual de Sanidad Animal en 1977, los estados de la República más afectados son, por orden de importancia: Veracruz con 45%, Puebla 27%, San Luis Potosí 14%, Chiapas 9% y Yucatán con 5%, de la suma total de los casos reportados de 1972 a enero de 1977 (19,22).

En este análisis se indica que la mayor incidencia se presenta en los meses de diciembre y enero con 84%, y la menor en junio y julio con 14%.

Del mismo análisis se reproduce a continuación un cuadro que muestra en aproximaciones las pérdidas económicas sufridas al Carbón Sintomático de 1972 a enero de 1977.

REPERCUSION ECONOMICA DE CARBON SINTONATICO

ESTIMACION DE PERDIDAS MINIMAS OCASIONADAS

POR CARBON SINTONATICO

enero 1972 - enero 1977

Año	No. de brotes	por 2 animales muertos en cada brote	Por \$ 3,000.00 cada animal
1972	118	236	\$ 708,000.00
1973	131	264	792,000.00
1974	177	354	1,032,000.00
1975	101	202	606,000.00
1976	577	1,144	3,432,000.00
1977	120	240	720,000.00
Total	1,344	2,727	\$ 8,301,000.00
	1,344		
	<u>x 100</u>		
	134,000		
	<u>x 30</u>		
			\$ 4,020,000.00
			12,411,000.00

Si se calcula en base a la muerte de un mínimo de 2 animales por brote, las pérdidas económicas causadas por Carbon Sintónico durante el periodo de 72 - 76 y enero de 1977, la cantidad ascendería a más de 8 millones y cuatro mil pesos. Si a estos sumamos el costo del tratamiento al hato afectado con un promedio de 100 animales por brote, representaría más de 4 millones de pesos. Observarse que las pérdidas han sido de 12 millones cuatro mil once mil pesos.

Como se observa en el cuadro anterior, el problema va en aumento, ya que tan solo del quinquenio de 1972 a enero de 1977 las pérdidas económicas son del orden de \$12,411,000.00 para el resto de 1977, si calculamos sobre la misma base que para los años anteriores, serían aproximadamente \$ 7,054,230.00 (19,22).

Se ha reportado que más del 90% de los casos se han presentado en animales previamente vacunados, lo que puede indicar que las bacterinas de uso normal para la prevención del Carbón Sintomático, no han funcionado con la eficiencia adecuada (19,22).

Es importante hacer una breve descripción del agente -- causal y de sus características, para entender mejor su forma de acción y de los productos que se han usado para la prevención del Carbón Sintomático.

El Clostridium chauvoei es un microorganismo de tipo te lúrico, ya que se le encuentra normalmente en pastos y suelos, de igual forma habita el tracto digestivo de los bovinos y se piensa que es ésta la principal vía de infección en estos animales. También se ha podido aislar del bazo e hígado de bovinos clínicamente sanos (1,2,8,14). Es Gran positivo, anaerótico estricto y es móvil gracias a sus flagelos peritricos; entre sus múltiples características se encuentra la de producir toxinas de tipo necrosante (4,6,7,8,9,13,14), que se consideran la causa de la enfermedad.

Las sustancias tóxicas que produce son:

- 2 alfa toxinas: necrotoxina y hemolisina oxígeno estable;
- beta toxina o deoxirribonucleasa;
- gamma toxina o hialuronidasa y
- delta toxina o hemolisina oxígeno lábil.

A la necrotoxina se la hace responsable del cuadro clínico de la enfermedad y a las otras toxinas como agentes inmunodepresores que evitan la acción de los bacteriostatos (4,5,7,8), esto es de gran importancia, ya que si el Clostridium se

instala, la inmunidad celular no podría actuar en principio contra el cuerpo bacteriano, pero la de tipo humoral sí podría contrarrestar la acción de las toxinas del germen (4,5, 7,9).

En la historia de la inmunización contra Carbón Sintomático se han usado muchos productos derivados de Clostridium chauvoei tales como:

- a) Vacunas a partir de tejidos lesionados;
 - b) Agresinas;
 - c) Filtrados de cultivos (toxoides);
 - d) Anacultivos o bacterinas.
- a) Vacunas a partir de tejidos lesionados. La base de inmunización de estos productos, son las esporas contenidas en la zona afectada e inactivadas por calentamiento prolongado. De estas vacunas la más difundida fue la desarrollada por Arloing, Cornevin y Thomas (11,16) y la variante -- de ésta por Kitt (11,16), la cual fue muy usada en los -- EUA. Este tipo de vacunas tenía el inconveniente de no -- ser muy confiables, por no ser posible su estandarización además de resultar muy caro sacrificar animales para obtener el producto.
- b) Agresinas. Se denomina así a los líquidos edematosos centrifugados, filtrados, tomados de las zonas lesionadas de animales afectados por Carbón Sintomático; se atribuyen -- sus grandes características inmunizantes a las toxinas -- presentes en ellos (1,2,11,15,16,17,18). Las desventajas que se le encontraron fueron las mismas que los anteriores.
- c) Filtrados de cultivos (toxoides). Estos filtrados libres de esporas, cuerpos bacterianos eran detoxificados por -- medios químicos, en los que se busca la mayor producción de toxinas, las que en este caso funcionaban como agentes estimulantes de la inmunidad. se encontró que estos filtrados funcionaban bien como inmunógenos usando pequeñas -- cantidades, brindando protección hasta por 4 años (4,5, -- 11,16,17,18); el inconveniente que se les encon-

tró es su alto costo de filtración.

- d) Anacultivos o bacterinas. Estos son una suspensión de bacterias muertas junto con sus metabolitos, inactivados por medios químicos. A partir de su desarrollo y uso por Leclaiiche y Vallée (11) en 1925, se difundieron ampliamente. En la actualidad es el medio más común de inmunización -- contra Carcón Sintomático. Este producto es de fácil elaboración y ha dado buenos resultados contra esta enfermedad en casi todo el mundo, los autores que la desarrollaron consideraban que la base antigénica de las bacterinas eran principalmente los cuerpos bacterianos (11,18).

Nitta (10), encontró que la inmunidad proporcionada por los filtrados es más duradera que la estimulada por las bacterinas y que al momento del desafío de animales vacunados -- con bacterinas, había más muertes que en el caso de los que habían sido inmunizados con filtrados. Claus y cols. (4,5), encontraron que hay una estrecha relación entre la cantidad de hemolisina y los antígenos estimulantes de la protección; en sus experimentos se observó que los títulos de anti-hemolisina de varios sueros de cuyos inoculados, una o dos veces con bacterinas comerciales, tenían grandes variaciones, lo que indica que el método de preparación de estos productos puede afectar en forma importante el nivel de la respuesta inmune que desarrollan los animales inoculados.

El propósito del presente trabajo, basado en los datos arriba anotados, es la elaboración de un toxoide contra Clostridium chauvoei que brinde un mayor grado de inmunidad en los animales que se les va a aplicar, en comparación con bacterinas comerciales.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

1. Cepa de Clostridium chauvoei proporcionada por el Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, la que fue usada para la producción de los toxoides y para desafío de los mismos; esta cepa es usada como referencia para el desafío de -- productos comerciales, por dicho departamento.
2. Bacterinas comerciales (7 muestras tomadas al azar).
3. 110 cuyes machos, de la misma raza de un peso aproximado entre 350 y 450 gr, usados en la prueba de potencia de - toxoides y bacterinas, la cual fue realizada según los - Requerimientos Mínimos de Calidad que deberan llenar los Productos Biológicos para Uso Veterinario, de la Dirección General de Sanidad Animal de la S.A.R.H.
4. Medios de Cultivo
 - a) Medios de cultivo para producción de los toxoides.
 - b) Medios de cultivo para la prueba de Esterilidad de -- los biológicos comerciales y experimentales.

Métodos para la producción de los toxoides:

- A. Metodo de Producción de Toxide Tetánico del Instituto - Nacional de Higiene de la S.S.A. (19).
 - Se sembró en un lit. de medio de cultivo que está compuesto de:

Trypticasa	1.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
Phitona	1.0 %
NaCl	0.25 %
Tioglicolato de Na	1.5 mg/lit.
Agua destilada	1 lit

- 5 ml de un cultivo de Clostridium chauvoei de 24 horas - agregando 10 ml. de solución estéril de glucosa al 100%
 - Se incubó durante 6 días a 37°C, rectificando el pH a -- 7.4 y agregando 10 ml. de una solución estéril de glucosa al 100% cada 24 horas.

- Detoxificación: Se agregó al cultivo, formol al 35% hasta alcanzar una concentración de 0.35%.
- Para la clarificación, el cultivo se pasó por un filtro de gasa para eliminar las partes gruesas; centrifugando posteriormente a 15,000 RPM. durante 30 minutos, desechando así la mayor parte de los cuerpos bacterianos y el sobrenadante se pasó por un filtro Zeita de 0.45 mil micras.
- Para la precipitación se usó Alumbre de Potasio al 20%, determinando previamente la cantidad óptima de éste para precipitar el toxoide.
- Por último se concentró al 50% y 70% del volumen original por decantación.

B. El método de Raouf S. Moussa (15).

- Se siguieron los mismos pasos señalados anteriormente, a excepción de la primera incubación, que fue de 15 días, eliminando las dos incubaciones posteriores y utilizando el siguiente medio de cultivo :

Trypticasa	1.0 %
Peptona de Caseína	1.0 %
NaCl	0.25 %
Fosfato ácido de Amonio	0.06 %
Bicarbonato de Potasio	0.05 %
Citrato de Potasio	0.16 %
Citrato de Hierro y amonio	0.03 %
Hígado de res	500.0 gr/lt.
Agua destilada	1.0 lt.

C. El método de A.D. Claus (4).

- A diferencia del anterior, la incubación fue de 48 horas utilizando el mismo medio de cultivo descrito por moussa, agregando 50 ml. de suero equino normal al momento de la siembra.

Los toxoides obtenidos por los 3 métodos descritos anteriormente, así como las bacterinas comerciales, fueron sometidos a las pruebas de esterilidad, innocuidad y Potencia, según se describen en los Requerimientos mínimos de Calidad que Deberán llenar los Productos biológicos para uso Veterinario, de la Dirección General de Sanidad Animal (DIGSA).. (20), que a la letra dicen:

"...PRUEBA DE ESTERILIDAD.- Esta prueba consiste en determinar que el producto está libre de cualquier contaminante vivo o activo demostrable.

El análisis bacteriológico, usando medios para gérmenes aerobios y anaerobios, deberá demostrar que el producto está exento de cualquier bacteria viva.

Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

PRUEBA DE SEGURIDAD O INOCUIDAD.- Para esta prueba se utilizarán 2 cuyes adultos de la misma variedad y/o camada con un peso aproximado de 350 gr., los cuales serán inoculados por vía subcutánea con no menos de 1/5 de la dosis-ovino recomendada por el laboratorio productor, - los animales serán observados diariamente durante un período de 7 días, tiempo durante el cual los animales deben permanecer vivos sin presentar reacciones extrañas a atribuibles a la vacunación.

PRUEBA DE POTENCIA.- Se utilizarán 13 cuyes de la misma variedad con un peso de 350 a 450 gr. 8 de estos recibirán 2 inyecciones con un 1/5 de la dosis-bovino, por vía subcutánea en la región toraco-ventral derecha e izquierda, con un intervalo de 14 días entre cada inyección.

7 a 14 días después de la última inoculación, los cuyes vacunados y los controles serán desafiados con 100 DLG - 50% (dosis letal cuye), contenidos en un ml. por vía intramuscular, todos los animales se observarán diariamente durante 3 días posteriores a la inoculación.

La prueba se considerará satisfactoria cuando por lo menos el 80% de los controles muera durante el período de observación y cuando menos 7 de los 8 vacunados sobrevivan..."

Nota.- La prueba de potencia se realizó usando grupos de 10 animales para cada muestra y 10 animales como grupo control. Para la prueba de esterilidad se sembró en los siguientes medios de cultivo:

Agar Saoreaud
Agar Triptosa
Caldo Tioglicolato
Caldo Triptosa

en los que se observó por un período de 10 días para determi-
nar si los productos están libres de bacterias, hongos y le-
vaduras.

RESULTADOS

Cuadro #2 Pruebas de esterilidad y prueba de Seguridad o Inocuidad

Muestra	Agar tryptosa	Agar Saboreaud	caldo Tiociccolato	caldo tryptosa	Reacción observada en animales
A	*S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	+S.R.
B	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.
C	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.
D	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.
E	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.
F	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.
G	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.
H	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.
I	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.
J	S.C.	S.C.	S.C.	S.C.	S.R.

* Sin crecimiento en los medios de cultivo

† Sin reacción en los animales de prueba.

A Toxide elaborado según el Método de Producción de Toxide Tetánico del Instituto Nacional de Higiene (21).

B Toxide elaborado según el Método de K.D. Claus (4)

C Toxide elaborado según el método de R.S. Moussa (15).

D a J Muestras al azar de bacterinas comerciales.

CUADRO # 3 Porcentajes de protección ofrecidos por los toxoides y bacterinas

Muestra	Concentración	animales supervivientes	% de protección
A1	sin concentrar	6/10	60%
A2	50%	8/10	80%
A3	70%	9/10	90%
B1	50%	3/10	30%
B2	70%	3/10	30%
C1	50%	2/10	20%
C2	70%	4/10	40%
D	---	9/10	90%
E	---	5/10	50%
F	---	2/10	20%
G	---	10/10	100%
H	---	9/10	90%
I	---	9/10	90%
J	---	2/10	20%

A Toxoide elaborado según el Método de Producción de Toxoide Tetánico (21).

B Toxoide elaborado según el método de K.D. Claus (4).

C Toxoide elaborado según el método de R.S. Moussa (15).

D a J Muestras alvaza de bacterinas.

CONCLUSION

A todos los productos biológicos en estudio, se les practicó las pruebas que se establecen en los Requisitos Mínimos de Calidad que Deberán Llenar los Productos Biológicos para uso Veterinario, que exige la DIGSA (20).

En la Prueba de Esterilidad, ninguna de las muestras presentó agentes contaminantes bacterianos aerobios, anaerobios u hongos.

En la Prueba de Seguridad o Inocuidad, las bacterinas y toxoides, demostraron estar libres de agentes tóxicos, como las toxinas del germen o del formol, ya que ninguno de ellos provocó reacción indeseable en los animales de prueba.

La Prueba de Potencia también se realizó según los requerimientos exigidos por la DIGSA. (20). Como se observa en el cuadro número 3, los toxoides fueron probados a diferentes concentraciones, resultando el más efectivo, el toxoide concentrado al 70% elaborado según el método de Producción de Toxoide Tetánico del Instituto Nacional de Higiene (21), que brinda una protección del 90%. El mismo toxoide se probó sin concentrar y concentrado a 50%, dando una protección de 60% y 80% respectivamente. Las variaciones que se observan en los títulos de protección en el cuadro No. 3, coinciden por las observadas por Claus (4), en sus investigaciones sobre las características inmunizantes de los filtrados de cultivos de Cl. anabaei, ya que en el presente trabajo como en el de Claus, los medios de cultivos que se usaron tuvieron diferentes tipos y cantidades de sales, y es ésta la principal diferencia entre ellos. Al variar las cantidades y tipos de sales en el medio, se provocan alteraciones metabólicas en el microorganismo, de tal modo que puede o no producir sus toxinas y hasta dejar de crecer aún cuando el medio está enriquecido, como se observa con los toxoides elaborados según las técnicas de Roussa (15) y Claus (4), los que probados a concentraciones de 50%, protejieron 20% y 30%, y concentrados a 70%, sólo 40% y 30%.

A lo anterior podemos añadir la importancia del tiempo de incubación, ya que Scott (18) y Moussa (15), observaron - que el clostridio produce varias sustancias tóxicas y in vitro, este requiere de un tiempo mínimo para que las toxinas se encuentren en su totalidad y en cantidades considerables en el medio de cultivo. Algunas de las observaciones hechas en el presente trabajo, concuerdan con lo citado por Scott y Moussa, ya que el toxoide que protegió al 90% de los animales vacunados, tuvo tiempo de incubación suficiente (6 días) para que el germen, produjera sus toxinas en cantidades suficientes y así estimular una buena protección. Así mismo, el toxoide elaborado según el método de Claus (4), tuvo un tiempo de incubación de 48 horas y concentrado al 50%, protegió 20% y al 70% sólo al 40% de los animales vacunados. Contradictoriamente tenemos al toxoide elaborado según el método de Moussa (15), que fue incubado 15 días, y sólo protegió 30%, tanto el concentrado a 50% como a 70%.

Los resultados anteriores se consideran factibles tomando en cuenta que si el tiempo de incubación fue suficiente - para que el clostridio produjera sus toxinas, bien pudieron ser los diferentes componentes del medio de cultivo, la causa de que el microorganismo no produjera sus toxinas en cantidades suficientes. De lo anterior se ve la necesidad de buscar un medio de cultivo que proporcione las cantidades óptimas de sales, como de nutrientes requeridos para que el microorganismo del prole con eficacia sus toxinas en un tiempo adecuado.

De las bacterinas e inóculos probados, sólo 4 de las 7 muestras llenaron lo requerimientos exigidos por la OMSA. (20). Las muestras obtuvieron títulos de protección tan bajos como los de los toxoides B y C, y otra de las muestras sólo dió 50% de protección. Comparadas estas, por el grado de protección con los obtenidos con los toxoides, se encuentra cierta similitud, y se puede pensar que las variaciones en los componentes de los diferentes medios de cultivo (4), como el tiempo de incubación (19), el clostridio en la calidad de las bacterinas como agentes inóculos.

La diferencia de cepas de Ci. chauvoei, sobre la prueba de potencia de productos inmunizantes contra Carbón Sintomático, es un factor que si bien no ha sido tomado en cuenta, es muy importante. Se ha reportado la presencia de un antígeno adicional termolábil en algunas cepas de Ci. chauvoei. Estas cepas poseedoras del antígeno adicional termolábil han sido aisladas de casos clínicos de campo y actualmente se usan como cepas de referencia en Australia e Inglaterra (3).

Chandler (3), demostró en sus investigaciones en la prueba de potencia de bacterinas contra Carbón Sintomático, que los cuyes inmunizados con una cepa de Ci. chauvoei que tenía el antígeno adicional termolábil, al ser desafiados con la misma cepa resistían. Sin embargo aquellos que eran inmunizados con cepa de Ci. chauvoei sin el antígeno adicional termolábil, cuando se desafiaban con cepas con el antígeno adicional termolábil, morían, además, la inmunidad era más duradera en aquellos vacunados con cepas poseedoras del antígeno adicional.

De lo anterior se desprende la necesidad de realizar en México un estudio de tipificación de las cepas de Ci. chauvoei aisladas de casos clínicos de campo y de las que se usan en las pruebas de potencia para de esta forma, determinar si existe una cepa poseedora del antígeno adicional termolábil, y efectuar un mejor control de calidad de las bacterinas, así como de cepas de referencia para desafío.

Algunos autores reportan que la variación de la respuesta inmune de los animales de prueba normalmente usados en la prueba de potencia, no es siempre uniforme (5,10), y que por lo mismo se puede falsificar el resultado de la misma, por tanto se recomienda hacer un estudio para determinar si la variación de la respuesta inmune de estos animales es determinante en la prueba de potencia de productos inmunizantes -- contra Carbón Sintomático.

Analizando el método para la prueba de potencia de productos inmunizantes contra Carbón Sintomático establecido en el British Veterinary Code (BVC) (10), se observa que

prohíbe el uso de productos comerciales que no protejan al -- 100% de animales vacunados, en un desafío donde el total de animales controles no vacunados mueran. El método usado en los EUA (10), que es el mismo usado en México (20), permite el uso de productos que protejan un 85% de los animales vacunados, lo que da un rango de variación del 14%.

Adoptar un criterio semejante al establecido en el SVC., para la prueba de potencia, es una forma de resolver hasta cierto punto, la diferencia de cepas de C1. chauvoei (5) y la variabilidad de la respuesta inmune de los cuyes para este tipo de estímulo (10). Al no permitir variación e los títulos de protección que ofrecen los animales de prueba y al usar como cepas de referencia, líneas de C1. chauvoei poseedoras del antígeno adicional termolábil, se llega a un resultado más confiable de la calidad de productos inmunizantes contra Carcón Sintomático.

Conclusiones

1. Sólo uno de los toxoides dio un alto título de inmunidad junto con 4 de las bacterinas probadas.
2. La influencia de los componentes de los diferentes medios de cultivo, especialmente de los tipos y cantidades de las sales usadas, es determinante para que el clostridio elabore sus toxinas.
3. El tiempo de incubación de los cultivos debe ser suficiente para que el clostridio produzca sus toxinas.

BIBLIOGRAFIA

1. Blood, D.C., Henderson, J.A. Medicina Veterinaria, 4ª ed. en español. Nueva Editorial Interamericana, pp. 339 - 342, 1975
2. Bruner, D.W., Gilliespie J.H. Hagan's Infectious Diseases 6 th ed. ---- Cornell University Press, Ithaca N.Y. pp. 341 - 346. USA. 1973
3. Chandler, H.M. Some Observations of the Quality Control Testing of Clostridium chauvoei Vaccines, Devel. in Biol. Stand. Vol. 32 pp. 137 - 141. (Karger, Basel) 1976.
4. Claus, K.D. and Macheak, M.E. Characteristics and Immunizing Properties of Culture Filtrates of Clostridium chauvoei. Am. J. of Vet. Res. 33 -- (5) 1031-1038, 1972.
5. Claus K.D. and Macheak, M.E. Preparation of a Clostridium chauvoei Antigen and Determination of Protective Immunity by Plate Agglutination Test Am. J. of Vet. Res. 33 (5) 1045-1052, 1972.
6. Frerichs, G.N. and Gray, A.K. The Relation Between the Rabbit Potency test and the Response of sheep to sheep Vaccines, Res. in Vet. Sc. 18 70-75 1975
7. Herberbert, W.J. Veterinary Immunology 1st ed. 1970, Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, England, pp. 228.
8. Hutyra, F., Marek, J., Manninger, R., Mócsy, J. Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos Tomo I, trad. de la 11ª ed Alemana, pp. 36-45. Ed. Labor.
9. Jansen, B.C., Knoetze, P.C., Visser, F. The Antibody Response of Cattle to Clostridium botulinum Types C and D toxoides, J. Vet. Res. 43 (4) 165-174. 1974.
10. Knight, P.A., Kent, J. Some Problems Concerning the Assay of the Clostridium chauvoei Vaccines in Laboratory Animals; Devel. in Biol. Stand. Vol. 32 pp. 143-151. 1976.

11. Leclainche, E. et Vallée, H. Sur la Vaccination contre le Charbon Symptomatique. Comte Rendu des Seances de la Soc de Biologie 92 (9) 1272-1276. 1925.
12. Macheak, M.R., Claus, K.D., and Maloy, S.E. Potency Testing Clostridium chauvoei Containing Bacterins: Relationship of Agglutination Titers and Potency Test in Cattle. Am. J. of Vet. Res. 33 (5) 1053-1058 1972.
13. Macheak, M.E. and Claus K.D. Resposes of Hamsters and Guinea Pigs to Antigens of Clostridium chauvoei, Am J. of Vet. Res. 33 (5) 1039-1044. 1972.
14. Merchant, I.S. y Packer, R.A. Bacteriología y Virología Veterinaria 2a ed. española, Ed. Acribia.
15. Moussa, R.S. Complexity of Toxins from Clostridium chauvoei and Clostridium septicum, J. of Bac. 76 (5) 538-545. 1958.
16. Mitta, N. Investigations on Blackleg Immunization. J. of Am. Vet. Med. Ass. 53, 466-682, 1918.
17. Schoelenber, F.S., Haslam, T.P. and Franklin, O.M. A Preliminar Report on Two new Methods of Preventing Blackleg by means of an Anty-Blackleg Serum and Agresin. Man. Agr. Sta. Circ., Cl culgr No. 59 jan. 1917.
18. Scott, J.P. Blackleg Immunization., J. of Am. Vet. Med. Ass. 80, 848-862, june 1932.
19. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos/Boletín Zoon sanitario Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Sanidad Animal. México, 1977
20. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Requerimientos Mínimos de Calidad que deberán llenar los Productos Biológicos para uso Veterinario/ Subsecretaría de Ganadería, Departamento de Control de Medicamentos
21. Secretaría de Salubridad y Asistencia/ Instituto Nacional de Higiene. Método de Producción de Toxoi de Tetánico.

22. Vargaz, Lévaro, J. Análisis Epizootiológico de las Gangrenas Gaseosas en México. VI Reunión de Sanidad Animal, 1977. Dirección General de Sanidad Animal.
23. Zinsser, Hans and Jones, S.B., A textbook of Bacteriology 8th ed. 1972. D. Appleton Century Co. New York 27-28 y 630.