



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"

"ELABORACION DE UN INMUNOGENO CONTRA  
CLOSTRIDIASIS EN ANIMALES (CARBON SIN-  
TOMATICO Y EDEMA MALIGNO) Y EVALUACION  
COMPARATIVA DE LA INMUNOGENICIDAD CON  
LOS PRODUCTOS COMERCIALES"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A

JESUS ALEJANDRO BACA RIVERA

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. MARIA DE LOURDES ONTIVEROS CORPUS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1987.



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

# INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
OBJETIVOS .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO .....	10
PREPARACION DE SOLUCIONES .....	11
PREPARACION DE CURVAS DE CALIBRACION .....	12
ELABORACION DE LOTES DE ESPORAS .....	14
PRODUCCION DE ANTIGENOS .....	16
EVALUACION DEL NUMERO MAS PROBABLE DE ESPORAS (NMP) POR EL METODO DE DILUCIONES .....	18
EVALUACION DE LOS PRODUCTOS INMUNIZANTES UTI- ZANDO LAS METODOLOGIAS DEL MANUAL DE REQUERI- MIENTOS MINIMOS PARA PRODUCTOS BIOLÓGICOS VE- TERINARIOS DE LA S.A.R.H. ....	19
TECNICA DE FIJACION DE COMPLEMENTO .....	23
RESULTADOS .....	30
DISCUSION DE LOS RESULTADOS .....	42
CONCLUSIONES .....	47
RECOMENDACIONES .....	48
BIBLIOGRAFIA .....	49

## RESUMEN

A partir de cepas de Clostridium chauvoei IRP 206 y Clostridium septicum se prepararon las bacterinas y toxoides correspondientes como productos inmunizantes. Se hizo un estudio comparativo de la respuesta inmune con cuatro productos comerciales conteniendo dichos microorganismos tomando como base de análisis la técnica del manual de requerimientos mínimos para productos biológicos de la S.A.R.H. 1977, dando como resultado el rechazo de todos los productos probados. Nuestros productos inmunizantes se probaron en las combinaciones de bacterina, toxoide y bacterina toxoide, de los cuales, el que tuvo mayor protección pero sin llegar al 100% fue la bacterina. En adición, se hizo una cuantificación del título de anticuerpos producidos por cada uno de los productos probados, encontrando que todos elevaban una respuesta de anticuerpos satisfactoria, pero no una protección efectiva. Para la cuantificación de anticuerpos se utilizó la técnica de fijación de complemento, utilizando como antígeno de prueba, el antígeno correspondiente al material de inmunización que se produjo en este trabajo.

## I N T R O D U C C I O N

Los *Clostridium* son bacilos anaeróbicos o microaerofílicos --- Gram positivos, formadores de esporas, que en su mayor parte - llevan en la naturaleza una existencia saprófita. Su habitat - natural es el suelo y el aparato gastrointestinal del hombre y los animales; estas bacterias existen en una relación simbiótica mal comprendida en la cual protegen contra la colonización e invasión por bacterias patógenas y contribuyen a la función digestiva normal; sin embargo, los microorganismos anaerobios endógenos o adquiridos exógenamente pueden invadir y destruir tejidos cuando la piel y las barreras mucosas resultan comprometidas por la cirugía, traumatismo o tumor y cuando los potenciales redox se reducen por isquemia, necrosis o infección, ocasionando así diversos procesos patológicos. Estos bacilos - son de tamaño variable, generalmente son largos, estrechos y - con extremos redondeados; todas las especies esporulan, pero la posición del esporo es variable; la mayoría de las especies son móviles gracias a flagelos peritricos.[25]

Los tipos de enfermedades producidas por los *Clostridium* pueden clasificarse en toxigénicas (*Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*) e histotóxicas (todas las especies del grupo - de la gangrena gaseosa son ejemplos) (33). Un aspecto importante que hay que resaltar, es el hecho de que no todos los clostridios son patógenos, en realidad, solo una pequeña minoría -

son capaces de producir enfermedad (10); así, los clostridios patógenos pueden ser subdivididos en tres grupos más o menos bien definidos:

1.- *Clostridios exotóxicos*. Estos clostridios se caracterizan por producir toxinas de gran potencia; estas toxinas son las responsables de producir la enfermedad y eventualmente la muerte del animal, sin embargo, la bacteria en si no es invasiva. Ejemplos de éste grupo son el *Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*.

2.- *Clostridios invasivos de origen traumático*. Este grupo incluye todos los agentes de la gangrena gaseosa del hombre y la mayoría de dichos agentes en los animales. Sus dos especies más representativas son *Clostridium perfringens* en el humano y *Clostridium septicum* en los animales. Estos clostridios producen toxinas de menor potencia que los del grupo anterior, sin embargo, las toxinas en vez de atacar al sistema nervioso, atacan directamente al músculo con una actividad necrosante; esta diferencia permite a estas especies ser invasivas, ya que sus toxinas van necrosando el tejido, permitiéndoles de esta manera avanzar.

3.- *Clostridium invasivos de origen digestivo*. Estos clostridios que solo se han demostrado de manera concluyente en animales, presentan la patogenia menos comprendida. El grupo está representado fundamentalmente por *Clostridium chauvoei*, *Clo-*

tridium haemoliticum y algunos serotipos de Clostridium perfringens. En estos casos las bacterias no entran a través de una herida, sino por vía oral; pasan por una fase de reproducción intestinal y por un mecanismo desconocido e incomprensible se trasladan a través de la sangre a sus tejidos de acción, en donde se reproducen y elaboran sus toxinas que producen la lesión.

Por otra parte, se hace hincapié en un aspecto importante, y es el hecho de que la mera presencia de un microorganismo en el cuerpo no constituye infección, sino que la infección se califica cuando hay presencia del microorganismo, síntomas de enfermedad y cambios patológicos de los tejidos.[25]

El carbón sintomático (al igual que el edema maligno) se clasifica dentro de las gas-gangrenas (33); su agente etiológico es el Clostridium chauvoei y es una enfermedad que afecta al ganado bovino, caprino y ovino principalmente; la vía de infección más común es la oral, aunque en ocasiones puede penetrar por lesiones en la piel; el período de incubación es de 1-3 días y se manifiesta por cojeras agudas con tumefacción caliente y crepitante, posteriormente fría e indolora; la enfermedad es mortal de 12 a 48 horas después de la aparición de los primeros síntomas (37).

Del edema maligno su agente etiológico es el Clostridium septicum, que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal

de los animales herbívoros, contaminando así tierras y pastos; la infección natural se realiza mediante lesiones bucales o cutáneas; los síntomas se manifiestan por tumefacciones edematosas locales, blandas, con gas y exudado gelatinoso, con fiebre elevada (37).

En el hombre, la higiene ha jugado un papel más importante que la inmunización en el control de las enfermedades. La gran reducción en la incidencia de enfermedades como el cólera, la escarlatina, la fiebre tifoidea y el tifus, poco le deben a la inmunización y casi todo a los cambios en el medio. En los animales, por otra parte, la inmunización jugó un papel decisivo en el control de las enfermedades infecciosas; la higiene no ha tenido la importancia que en el caso del hombre, la razón es simple, los animales no pueden ser separados de las fuentes de infección en la forma que es posible con el hombre; los animales defecan, orinan, dan nacimiento, mueren y eventualmente se descomponen en el lugar donde comen y viven; ellos están continuamente e íntimamente expuestos a los microorganismos del suelo y de sus propias excretas. Debido a ésto y hasta que la inmunización no fue desarrollada, fueron aceptadas como inevitables grandes pérdidas producidas por enfermedades infecciosas.

El tratamiento de las infecciones e intoxicaciones causadas por *Clostridium* es de valor limitado, pues los antibióticos y los agentes quimioterápicos son de poca efectividad. En adición



en la mayoría de los casos, el curso de la enfermedad puede ser tan rápido que los animales se encuentran moribundos o mueran antes de que el tratamiento pueda ser considerado, sin embargo, "TODAS LAS INFECCIONES O INTOXICACIONES CAUSADAS POR -- *Clostridium* PUEDEN SER PREVENIDAS POR INMUNIZACION"(34).

Afortunadamente, México no es un país endémico de las infecciones clostridiales que nos ocupan (carbón sintomático y edema - maligno), sin embargo existen muertes de animales y brotes epizooticos que han logrado aceptar la atención de algunos investigadores.

Durante los años de 1970-1977 el país sufrió una epizootia de clostridiasis (carbón sintomático) (ver cuadro 1) que costó - pérdidas cuantiosas a la ganadería nacional (13); el no contar con biológicos de alta calidad permitió que el número de brotes se incrementara; en 1977 al realizar un estudio epizootiológico de la enfermedad se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1.- Que las vacunas existentes (polivalentes) no protegían - en forma adecuada, por lo que se recomendó a la industria -- farmacéutica se produjeran vacunas monovalentes de alta calidad inmunológica.

2.- Que las coberturas de vacunación a nivel nacional eran bajas.

3.- Que los estados más afectados eran Veracruz, Puebla, Tabasco y Yucatán, y que debían de aumentar su cobertura de vacunación y acortar el tiempo de revacunación a seis meses.

Con estas medidas se obtuvo un descenso en el reporte de casos de clostridiasis, sin embargo, estas medidas se han ido descuidando, por lo que se hace necesario reforzar las actividades de prevención de esta enfermedad.

#### C U A D R O 1

Número de casos de clostridiasis en el país durante los años de 1970-1979.

AÑO	CASOS	AÑO	CASOS
70	80	75	225
71	50	76	476
72	40	77	375
73	175	78	200
74	120	79	175

Durante la epizootia, en 1976-1977, Bojórquez y colaboradores (27) evaluaron la potencia de las bacterinas existentes en el país, encontrando resultados nada halagadores, por lo que recomendaron revisar los métodos de producción y periódicamente la calidad de los productos que se distribuyen -- contra esta enfermedad en México, además de evaluar periódicamente la incidencia de la enfermedad en zonas afectadas.

Labradero (22) reporta en 1979 que ninguna de 5 bacterinas comerciales -- probadas cumple con los requerimientos mínimos de potencia exigidos por el departamento de control de producción de biológicos, farmacéuticos, alimen

ticios y equipos para animales de la Subsecretaría de Ganadería de la Dirección General de Sanidad Animal S. A.R.H..

Bojorquez reporta en 1981 (81) que las pérdidas económicas en el ganado a causa de Clostridium chauvoei ascendieron a cien millones de pesos en -- 1980.

Un aspecto muy importante del problema de clostridiasis es que no solo se presenta en países en vías de desarrollo como México o algunos países sudamericanos, sino que también es problema en países desarrollados como -- los Estados Unidos de Norteamérica (9), Francia(17), Australia (29,11) -- y algunos otros de donde no se tienen reportes concretos pero el problema existe. El problema común que se comparte no es el hecho de que en todos estos lugares existan enfermedades clostridiales, el verdadero problema es que los casos de clostridiasis que se reportan se presentan en animales que ya han sido vacunados contra la enfermedad.

Así pues, con todos los antecedentes citados se forma la base de estudio del presente trabajo.

## OBJETIVOS

- PRODUCIR INMUNOGENOS CONTRA LAS INFECCIONES CAUSADAS POR Clostridium chauvoei y Clostridium septicum.
  
- EVALUAR LA PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE PRODUCCION POR MEDIO DE LA DETERMINACION DE DOSIS LETALES, PARA UTILIZARLAS COMO CEPAS DE DESAFIO.
  
- EVALUAR LA CAPACIDAD INMUNOGENA DE LOS PRODUCTOS QUE FREPARAMOS ASI COMO DE CUATRO PRODUCTOS COMERCIALES QUE CONTIENEN LOS Clostridium chauvoei y septicum.

## MATERIALES Y METODOS

Para la realización del presente trabajo se llevaron a cabo - las siguientes etapas:

- I.- Preparación de medios de cultivo
- II.- Preparación de soluciones
- III.- Preparación de curvas de calibración
- IV.- Elaboración de lotes de esporas
- V.- Producción antígenos
- VI.- Evaluación del Número Más Probable de esporas (NMP) - por el método de diluciones
- VII.- Evaluación de los productos inmunizantes utilizando - las metodologías de Manual de Requerimientos Mínimos para Productos Biológicos de la S.A.R.H.
- VIII.- Evaluación de los productos inmunizantes cuantifican- do la producción de anticuerpos por medio de la técni- ca de fijación de complemento.

## I.- PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo de las especies de *Clostridium* que se traba- jaron, se utilizaron los tres medios de cultivo cuyas formula- ciones son las siguientes:

MEDIO DE KOLBE (21)	MEDIO MALOY (21)	
Hígado digerido por papaína 1000ml	Tripticasa	15 g
Tripticasa	40 g Agar	0.75g

Agar	20 g	Extracto de levadura	5 g
Extracto de levadura	10 g	Cloruro de sodio	2.5 g
		Cisteina-HCl	0.5 g
		Agua destilada csp	1000 ml

#### MEDIO DE CLAUS Y MACHEAK (8)

Extracto de carne	30 g
Peptona de carne	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Cisteina-HCl	0.3g
Almidón soluble	1 g
Glucosa	1 g
Agua destilada csp	1000 ml

## II.- PREPARACION DE SGLUCIONES

La preparación de todas las soluciones utilizadas en el presente trabajo se enuncia a continuación:

- SOLUCION BUFFER DE FOSFATOS (PBS) 0.1 M  $P_H$  7(27)  
 Solución A:  $Na_2H_2PO_4$  0.2M ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 27.6 g/lit)  
 Solución B:  $Na_2HPO_4$  0.2M ( $Na_2HPC_4 \cdot 7H_2O$ , 53.65 g/lit)  
 PBS = 195 ml solución A + 305 ml solución B + 500 ml de agua.  
 Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> --  
 (121 °C).
- SOLUCION DE CLORURO DE CALCIO 5%  
 Disolver 50 g de cloruro de calcio en 1000 ml de agua des---

tilada; esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> (121°C).

- SOLUCION DE ALEUMINA

Disolver 2.5 g de albumina sérica bovina en 100 ml de agua destilada (preparar inmediatamente antes de usarse)

- REACTIVO DE BIURET

Disolver en suficiente agua destilada 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado y 6 g de tartrato de sodio y potasio- adicionar 300 ml de hidróxido de sodio al 10%; aforar con agua destilada a 1000 ml, agitar y guardar en la oscuridad.

- SOLUCION BUFER DE BARBITURADOS (SAV)

Disolver en suficiente agua destilada 42.5 g de cloruro de sodio, 2.875 g de ácido dietil barbitúrico, 1.875 g de dietil barbiturato de sodio, 1.018 g de sulfato de magnesio - 7H<sub>2</sub>O y 0.147 g de cloruro de calcio; aforar con agua destilada a 1000 ml y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> (121°C); almacenar en refrigeración.

### III. - PREPARACION DE CURVAS DE CALIBRACION

- NEFELOMETRO

El nefelometro es una curva de calibración para la cuantificación del número de bacterinas por mililitro, tomando como ba-

se la turbidez de las suspensiones.

Tubo	ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	ml BaCl <sub>2</sub> 1%	Conc. x 10 <sup>6</sup> MO/ml.
1	9.9	0.1	300
2	9.8	0.2	600
3	9.7	0.3	900
4	9.6	0.4	1200
5	9.5	0.5	1500
6	9.4	0.6	1800
7	9.3	0.7	2100
8	9.2	0.8	2400
9	9.1	0.9	2700
10	9.0	1.0	3000

#### - CURVA DE CALIBRACION DE PROTEINAS

Por medio de la cuantificación de sustancias de naturaleza proteica por el método de Biuret, se constató la presencia de -- las toxinas.

Tubo	ml Biuret	ml sol. albumina	ml medio Claus	ml agua	Abs. (530 nm)	Conc. mg/ml
Blanco	8	-	1	1	0	0
1	8	0.1(sol 1:10)	1	0.9	0.0075	0.025
2	8	0.2(sol 1:10)	1	0.8	0.01	0.05
3	8	0.3(sol 1:10)	1	0.7	0.0105	0.075
4	8	0.4(sol 1:10)	1	0.6	0.025	0.1
5	8	0.2	1	0.8	0.115	0.5
6	8	0.4	1	0.6	0.225	1.0
7	8	0.6	1	0.4	0.29	1.5



8            8            0.8            1            0.2    0.35            2.0

#### IV.- ELABORACION DE LOTES DE ESPORAS

##### a) Clostridium septicum

Se prepararon 500 ml del medio sólido de Kolbe y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> de presión -- (121°C) En condiciones de esterilidad, se reparte el medio -- aúr. caliente (unos 45-50°C) en suficientes cajas petri estériles, en cantidad de 20-25 ml de medio por cada caja. Se dejó que el medio solidificara en las cajas y posteriormente se -- metieron éstas a incubar a 37°C durante 24 horas. A cada caja petri en condiciones de esterilidad se le adiciona un mililitro de inóculo (suspensión 1:10 de la suspensión de Clostridium septicum proporcionada por el departamento de Bacteriología del INIFAP, SARH), difundiendo éste a toda la superficie del agar por movimientos hacia adelante y hacia atrás y -- hacia un lado y otro de la caja; en seguida se colocaron las cajas en una jarra Gas-pack, la cual se pone en condiciones de anaerobiosis con un sobre Gas-gen, se cerró la jarra herméticamente y se puso en incubación a 36°C durante 48 horas.

Para realizar la cosecha de bacterias al término de la incubación se le agregaron 20-25 ml de PBS a cada caja, se frotó la superficie del agar con un isopo estéril y se recolectó la -- suspensión en un matraz estéril de capacidad adecuada; se realizó un lavado más de la superficie del agar con menos canti-

dad de PBS. El total de la suspensión cosechada se filtró a través de una gasa estéril para eliminar residuos de agar; a la suspensión resultante se le realizó prueba de pureza sembrando un poco de ésta en cuatro cajas de agar sangre, incubando dos cajas de atmósfera de anaerobiosis y dos cajas en atmósfera aeróbica durante 72 horas a 36°C. Al crecimiento de las cajas de anaerobiosis y a la suspensión filtrada por gasa se les realizó tinción de Gram, para verificar la pureza de los cultivos.

Al volumen de la suspensión filtrada por gasa se le agregó un volumen igual de glicerol y se puso en agitación lenta durante 14 días; cada 72 horas se le realizaron pruebas de pureza a la suspensión en agitación. Al cabo de los catorce días, la suspensión (sin dejar de agitar) se envasó en frascos viales y se puso en congelación a -25°C. El lote de esporas así producido se muestreó y se le realizó la evaluación del número más probable de esporas viable por milímetro.

b) Clostridium chauvoei

Se prepararon 500 ml del medio líquido de Maloy y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> de presión -- (121°C); una vez frío el medio, se puso en incubación por 24 horas a 36°C. En condiciones de esterilidad se le adicionaron al medio 5 ml de inóculo (suspensión de Clostridium chauvoei IRP 206 proporcionada por el departamento de Bacteriología --

del INIFAP, SARH ); el medio inoculado se agitó para homogenizar la suspensión y se puso en incubación por 48 horas a 36°C.

Al cabo del tiempo de incubación, las esporas se cosechan por centrifugación; el contenido del matraz de cultivo se vació en tubos de centrifuga que se pusieron a centrifugar a 2000 rpm - durante 15 minutos; el líquido sobrenadante se decantó y el paquete celular se reconstituyó a suspensión con PBS. A la suspensión así obtenida se le hacen las mismas pruebas de pureza que a la suspensión de Clostridium septicum y se le hacen las mismas pruebas de evaluación.

#### V.- PRODUCCION DE ANTIGENOS

##### a) BACTERINAS

La producción de los antígenos tanto de Clostridium chauvcei - como de Clostridium septicum se llevó a cabo mediante la misma metodología por tanto, solo se hará mención una vez.

Se prepararon 500 ml del medio líquido de Claus y Macheak y se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> (121°C); el medio pasó a prueba de esterilidad incubandose a 37°C durante 24 horas; en condiciones de esterilidad se le adicionaron al medio 5 ml del inóculo (suspensión de esporas de los lotes producidos en el apartado anterior) y se metió a incubar en atmósfera de anaerobiosis durante 15 horas a 37°C. Al cultivo que -

se obtuvo se le realizaron las mismas pruebas de pureza descritas para los lotes de esporas, y paralelamente a estas pruebas, se corre la inactivación del cultivo adicionando formaldehído en solución en cantidad suficiente para lograr una concentración final de 1%; se agita y se deja en reposo por 72 horas.

Al cabo de la inactivación, se repartió el contenido del matraz en suficientes tubos de centrifuga, los cuales se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos; el líquido sobrenadante se decantó y el paquete celular se reconstituyó a suspensión con el menor volumen de PBS. La suspensión obtenida se comparó con los tubos del nefelometro y se le agregó PBS hasta llegar a una concentración lo mas cercana posible a la del tubo número 4 del nefelometro (120000/ml). A la suspensión final se le agregó timerosal en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 1:10000. La bacterina (suspensión final) se dosificó en frascos viales que se almacenaron en refrigeración a 4°C.

#### b) TOXOIDES

La producción de los toxoides se realizó con la misma técnica de producción de las bacterinas hasta el paso de la centrifugación, en donde los pasos subsecuentes fueron de la siguiente manera:

El líquido sobrenadante se decantó y recolectó; el paquete celular se desechó. La solución recolectada se envasó en frascos viales que se almacenaron en congelación abajo de - 5°C.

VL.- EVALUACION DEL NUMERO MAS PROBABLE DE ESPORAS (NMP)  
POR EL METODO DE DILUCIONES

Se prepararon 250 ml del medio de Claus y Macheak, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> de presión (121 °C); el medio se repartió en 25 tubos de ensaye estériles a razón de 9 ml por tubo; los tubos se dividieron y se marcaron en cinco tubos cada uno, se sometieron a prueba de esterilidad incubándolos durante 24 horas a 37°C.

Cuando los tubos hubieron pasado la prueba de esterilidad, se inocularon de la siguiente manera:

Al tubo 1 del primer grupo de tubos se le adicionó 1 ml de la suspensión de esporas preparada en el apartado IV, se homogeniza la mezcla y con otra pipeta estéril se toma una alícuota de 1 ml, la cual se depositó en el tubo número 2, se homogenizó esa mezcla y con otra pipeta estéril se transfirió 1ml de este tubo al número 3, así, hasta llegar al tubo número cinco.

La operación que se acaba de describir se repitió cuatro veces más, en cada uno de los grupos de tubos restantes.

Todos los tubos se metieron a incubar en atmósfera de anaerobiosis por 24 horas a 37°C.

La lectura de los resultados se hace sumando todos los tubos -

turbios correspondientes a cada dilución.

La interpretación de los resultados se hace comparando los números que obtuvimos en series de tres, con los reportados en la bibliografía [26]; la primera combinación de números que logremos equiparar, corresponderá a la máxima probabilidad de tener el número reportado multiplicado por la primera dilución de los tres números escogidos, de esporas viables por mililitro de nuestra suspensión original.

#### VII.- EVALUACION DE LOS PRODUCTOS INMUNIZANTES UTILIZANDO LAS METODOLOGIAS DEL MANUAL DE REQUERIMIENTOS MINIMOS PARA PRODUCTOS BIOLOGICOS DE LA S.A.R.H.

##### a) TOXOIDE

Al toxoide producido se le realizaron las siguientes evaluaciones:

-Cantidad de sustancias de naturaleza protéica (toxinas) por el método de Biuret. Se tomó un mililitro del toxoide, se le agregaron 8 ml del reactivo de Biuret, se le adicionó un mililitro de agua, se agitó y se leyó en espectrofotómetro a 530 nm.

-DOSIS. Para determinar la dosis de toxoide que debía ser administrada con fines profilácticos, se inoculó un conejo intradermicamente con varias diluciones del producto, tomándose

como la dosis de inoculación inmurogánica a la mínima dilución del producto que no causa trastornos dérmicos (necrosis) en el conejo.

-ESTERILIDAD. Se hizo la siembra del producto en medio líquido tioglicolato y medio líquido Sabouraud, incubándose a 37°C durante 48 horas.

### P O T E N C I A

-En el manual de requerimientos mínimos para biológicos veterinarios no se especifica ninguna técnica al respecto, por lo que la evaluación de la potencia se realizó de manera similar a las bacterinas.

#### b) BACTERINAS

- PRUEBA DE ESTERILIDAD. Se hicieron siembras del producto en medio líquido Tioglicolato y medio líquido Sabouraud y se incubaron durante 48 horas a 37°C.

- PRUEBA DE PUREZA. Solamente por tinción de Gram y observación microscópica se determinó la pureza del producto.

- PRUEBA DE INOCUIDAD. Se inocularon subcutáneamente 2 cuyes de 350 g de peso con dos mililitros del producto; los animales no presentaron alteraciones fisiológicas o síntomas patológicos atribuibles al producto durante 7 días después de inocularlos.

- PRUEBA DE POTENCIA. El manual de requerimientos mínimos marca "Se utilizan 15 cuyes de la misma raza o variedad, con un peso de 350-450 g; éstos recibirán dos inyecciones con 1/5 de la dosis bovina por vía subcutánea en la región toraco ventral derecha e izquierda, con un intervalo de 14-21 días entre cada inyección. 7-14 días después de la última inoculación, los cuyes vacunados (9) y los controles (6) serán desafiados con -- 100DL 50% contenidos en 0.5 ml por vía intramuscular. Todos -- los animales se observarán diariamente durante tres días posteriores a la inoculación. La prueba se considerará satisfactoria cuando por lo menos 5 de los 6 controles mueran y cuando menos 8 de los 9 vacunados sobrevivan durante el período de observación".

En vista de que la dificultad por conseguir cuyes fué muy grande, las cantidades de éstos se modificaron para la realización de la prueba de potencia, quedando como sigue: considerando -- que el Clostridium septicum es menos patógeno que Clostridium chauvoei y que la frecuencia de que ocurra es menor también, para todas las evaluaciones de Clostridium septicum solo se trabajaron tres cuyes. Para las evaluaciones de Clostridium chauvoei se trabajaron cinco cuyes; y en vista de que todas las -- pruebas se trabajaron al mismo tiempo, solo se tuvo un lote de controles de cinco cuyes para Clostridium chauvoei y tres cuyes para Clostridium septicum.



A los productos que se les realizó esta prueba fueron:

- BACTERINA TRIPLE (Cl. chauvoei y Cl. septicum), laboratorios Norden lote 23G01-A, caducidad Julio 87.
- POLIBAC (Cl. chauvoei y Cl. septicum), laboratorios Fort Dodge Nova lote 8350, caducidad Febrero 87.
- BACTERINA BLACKLEG (Cl. chauvoei y Cl. septicum), laboratorios Brovel lote 1185, caducidad Enero 88.
- BACTERINA DOBLE (Cl. chauvoei), laboratorios Anchor lote 2385, caducidad julio 88.

El único aparato utilizado en la realización de este trabajo fue un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Coleman 111.

## VIII PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

En esta prueba intervienen dos reacciones Ag-Ac que compiten por activar el complemento:

REACCION PRINCIPAL	C'	SISTEMA INDICADOR
Antígeno - Anticuerpo (Bacterina (Suero de <u>co</u> 6 Toxoide) bayos inocu lados)	Complemento	Antígeno - Anticuerpo (Eritrocitos (Anticuer <u>os</u> de carnero) antieritro citos de carne ro)

Esta prueba consta de dos partes

### I.- Reacciones preliminares

- a) Titulación del amboceptor ó hemolisina
- b) Titulación del complemento

### II.- Reacción principal

#### I. a) Titulación del amboceptor ó hemolisina

Esta titulación sirve para determinar la cantidad exacta de éste que puede provocar la lisis de los globulos rojos de carnero en presencia de complemento.

La hemolisina se prepara mediante la inoculación de eritrocitos de carnero a conejos; se obtiene todo el suero de los conejos a los catorce días de inoculados (hemolisina). Se prepa



## PREPARACION DE LA SUSPENSION 2% DE ERITROCITOS

Se sangra un carnero y se recolecta la sangre en un tubo vacutainer, que contiene un volumen igual de solución Alsever<sup>+</sup> igual al volumen de sangre que se pretende recolectar.

+ (Glucosa 18.66 g, Cloruro de sodio 4.18 g, Citrato de sodio 8 g, Acido cítrico 0.55 g, Agua destilada 1000ml)

Las células recolectadas se almacenan en refrigeración durante una semana. Se hacen tres lavados por centrifugación, con buffer de veronal, a 2000 rpm durante 10 minutos cada uno. - Después de la tercera centrifugación, del paquete celular se toma 1 ml y se suspende en 49 ml de SAV; esto nos da una suspensión 2% de glóbulos rojos. Para comprobarlo, se hace una dilución de esta suspensión, 1:10, y se lee en el espectrofotómetro a 561 nm y la lectura se ajusta a 0.6 adicionando SAV - ó glóbulos rojos según se requiera.

## COMPLEMENTO

Este producto es suero fresco de cobayos sanos, el cual se trabaja en una dilución 1 : 30.

## TITULACION DE LA HEMOLISINA

Pczo	Dilución amboceptor (microlitros)	Complemento 1:30 (microlitros)	Eritrocitos 2% (microlitros)	SAV (micro litros)
1	1:1000	125	250	125
2	1:2000	125	250	125
3	1:3000	125	250	125
4	1:4000	125	250	125
5	1:5000	125	250	125
6	1:6000	125	250	125
7	1:8000	125	250	125
8	1:10000	125	250	125
9	1:12000	125	250	125
10	1:16000	125	250	125

Incubar a 37 °C durante media hora.

La unidad de amboceptor es la máxima dilución que muestra ó -  
presenta hemolisis completa.

## I. b).- Titulación del complemento

En la prueba preliminar del complemento se determina la canti-  
dad de éste que es suficiente para producir apenas la lisis -  
de eritrocitos de carnero en presencia del amboceptor; la uni-  
dad de complemento se define como la mínima dilución de com-  
plemento en donde se presenta la lisis de los eritrocitos.

## Preparación de las diluciones del complemento

Tubo	Complemento 1 : 30	SAV	Dilución
1	0.9 ml	0.1 ml	1 : 33.3
2	0.8 ml	0.2 ml	1 : 37.5
3	0.7 ml	0.3 ml	1 : 42.8
4	0.6 ml	0.4 ml	1 : 50
5	0.5 ml	0.5 ml	1 : 60
6	0.4 ml	0.6 ml	1 : 75
7	0.3 ml	0.7 ml	1 : 100
8	0.2 ml	0.8 ml	1 : 150
9	0.15 ml	0.85 ml	1 : 200
10	0.1 ml	0.9 ml	1 : 300

## Titulación del complemento

Pozo	Dilución Complemento (250 microlitros)	SAV (micro litros)	Amboceptor titulado (microlitros)	Eritrocitos 2% (microlitros)
1	1 : 33.3	250	125	125
2	1 : 37.5	250	125	125
3	1 : 42.8	250	125	125
4	1 : 50	250	125	125
5	1 : 60	250	125	125
6	1 : 75	250	125	125
7	1 : 100	250	125	125
8	1 : 150	250	125	125
9	1 : 200	250	125	125
10	1 : 300	250	125	125

Al adicionar la solución de veronal (SAV), se incuba el sistema a 37°C durante media hora; se adiciona el sistema indicador y se incuba nuevamente a 37°C durante media hora.

## II.- Reacción Principal

En la reacción principal se determina si están presentes en los sueros problema los anticuerpos. Primeramente, como en toda reacción de fijación de complemento, los sueros se inactivan durante 30 minutos a 56°C, ya que es necesario eliminar el complemento del suero mismo, debido a que el resultado de la prueba depende de la cantidad del complemento libre. Si los anticuerpos contra la bacteria están presentes en los sueros de los cuyes, reaccionarán con el antígeno consumiendo el complemento que se adicionó; por su parte, como el sistema herolítico depende de la presencia de complemento, no habrá hemólisis. Pero si no hay anticuerpos frente a la bacteria en los sueros problema, el complemento estará disponible para la reacción entre el antígeno y los eritrocitos de carnero, en este caso, resulta hemólisis.

## REACCION PRINCIPAL

Pozo	Dilución del suero (250 microlitros)	Antígeno (microlitros)	Complemento (microlitros)	Sistema hemolítico (microlitros)
1	1 : 2	250	250	250
2	1 : 4	250	250	250
3	1 : 8	250	250	250
4	1 : 16	250	250	250
5	1 : 32	250	250	250
6	1 : 64	250	250	250
7	1 : 128	250	250	250
8	1 : 256	250	250	250

Al adicionar el complemento, el sistema se incubaba a 37°C durante 15 minutos; se le agrega el sistema hemolítico y se incubaba nuevamente a 37°C durante media hora.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Título de la hemolisina 1 : 2000
- Título del complemento 1 : 42
- Dilución antígeno bacterina Clostridium chauvoei 1 : 20
- Dilución antígeno toxoide Clostridium chauvoei 1 : 20
- Dilución antígeno bacterina Clostridium septicum 1 : 40
- Dilución antígeno toxoide Clostridium septicum 1 : 40



## R E S U L T A D O S

### I.- CUENTA DE MICROCORGANISMOS POR MILILITRO DE LAS BACTERINAS

Como ya se indicó, la concentración de microorganismos de las bacterinas se ajustó por medio de comparación con los tubos - del nefelómetro, ajustando dicha concentración cercana a los 1200 microorganismos/ ml.

### II.- EVALUACION DE LA CANTIDAD DE TOXINA PRODUCIDA (TOXOIDE)

Las lecturas obtenidas por el método de Eiuert reportaron:

Toxina Clostridium chauvcei Abs 0.047

Toxina Clostridium septicum Abs 0.04

Estas absorbancias nos indican una concentración aproximada de 0.2 mg/ml, interpoladas en la curva de calibración de proteínas.

### III.- EVALUACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE ESPCRAS VIA-BLES.

Conforme a la técnica descrita con anterioridad, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tubos turbios para Clostridium chauvcei 5 5 5 4 3

NMP = 5 4 3 =  $28 \times 10^3$  = 28 000 esporas/ ml (26)

Tubos turbios para Clostridium septicum 5 5 3 1 4  
 NMP = 4 0 0 =  $1.3 \times 10^5$  = 130 000 esporas/ml (26)

#### IV.- EVALUACION DE DOSIS LETALES

Siguiendo la metodología de Reed-Muench (28) se construyó el cuadro número 2, para los datos correspondientes al Clostri -- dium chauvoei.

CUADRO No. 2

Datos correspondientes a la mortalidad causada por Clostri -- dium chauvoei con diferentes dosificaciones de esporas, según la metodología de Reed-Muench.

No. de esporas <u>Cl. chauvoei</u>	Vivos	Muertos	Vivos	Acumulativos Muertos	% Mortalidad
250	4	4	7	4	36.36
300	2	6	3	10	76.92
400	1	7	1	17	94.44
500	0	8	0	25	100

Los cálculos para la determinación de los parámetros que nos interesan(DL), se efectuaron mediante las siguientes fórmulas:

Diferencia de  $\frac{\text{Porcentaje buscado} - \text{Mortalidad inferior al porcentaje}}{\text{Mortalidad superior} - \text{Mortalidad inferior al porcentaje}} \times$   
 Logaritmos

Logaritmo del factor de dilución

Log DL = Diferencia de logaritmos + Log Dil. menor al porcentaje.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

DL 50 = 271 esporas DL 70 = 298 esporas DL 80 = 315 esporas

En forma análoga al procedimiento anterior, se construyó el cuadro 3 y se obtuvieron los datos correspondientes al Clostridium septicum.

### CUADRO No. 3

Datos correspondientes a la mortalidad causada por Clostridium septicum con diferentes dosificaciones de esporas, según la metodología de Reed-Muench.

No. de esporas <u>Cl. septicum</u>	Vivos	Muertos	Vivos	Acumulativos Muertos	Mortalidad %
4 500	4	4	7	4	36.36
5 500	2	6	3	10	76.92
8 000	1	7	1	17	94.44
11 000	0	8	0	25	100

Los resultados que se obtuvieron en este caso fueron los siguientes:

DL 50 = 5 049 esporas DL 70 = 5 573 3 esporas DL 80 = 8 325 esporas

## V.- PRUEBA DE PÓTENCIA

Para la realización de la prueba de potencia se utilizaron 61 cuyes entre 350 y 450 g de peso distribuidos de la manera siguientes:

- Cuyes 1-5, evaluación de Blackleg con Cl. chauvoei
- Cuyes 6-8, evaluación de Blackleg con Cl. septicum
- Cuyes 9-13, evaluación de Polibac con Cl. chauvoei
- Cuyes 14-16, evaluación de Polibac con Cl. septicum
- Cuyes 17-21, evaluación de Bacterina triple con Cl. chauvoei
- Cuyes 22-24, evaluación de Bacterina triple con Cl. septicum
- Cuyes 25-29, evaluación de Bacterina doble con Cl. chauvoei
- Cuyes 30-34, evaluación de nuestra bacterina de Cl. chauvoei
- Cuyes 35-37, evaluación de nuestra bacterina de Cl. septicum
- Cuyes 38-42, evaluación de nuestro toxoide de Cl. chauvoei
- Cuyes 43-45, evaluación de nuestro toxoide de Cl. septicum
- Cuyes 46-50, evaluación de nuestra bacterina-toxoide de Cl. chauvoei
- Cuyes 51-53, evaluación de nuestra bacterina-toxoide de Cl. septicum
- Cuyes 54-58, controles de Cl. chauvoei
- Cuyes 59-61, controles de Cl. septicum.

Los cuadros que a continuación siguen se hicieron tomando en cuenta la división de los cuyes que se acaba de mencionar, y contienen el número correspondiente a cada cuy, el título de anticuerpos contra la especie de Clostridium en el día cero (día de la primera inoculación), al día catorce (administra-

ción del refuerzo) y al día veintiocho (desafío), así como el resultado de la prueba de desafío, marcando si los animales vivieron o murieron después de tres días de haberlos desafiado.

## CUADRO No. 4

Resultados de la prueba de potencia para la Bacterina Blackleg evaluada con cepa de Cl. chauvoei IRP 206.

Cuye No.	Título de anticuerpos día 0	Título de anticuerpos (1 / Título) día 14      día 28		Vivió	Murió
1	2	8	8		+
2	4	8	8		+
3	2	4	8		+
4	4	8	8		+
5	4	16	16		+

## CUADRO No. 5

Resultados de la prueba de potencia para la Bacterina Blackleg evaluada con cepa de Cl. septicum.

Cuye No.	Título de anticuerpos día 0	Título de anticuerpos (1 / Título) día 14      día 28		Vivió	Murió
6	-	2	2		+
7	4	8	16		+
8	2	2	4		+

CUADRO No. 6

Resultados de la prueba de potencia para la Bacterina Polibac evaluada con cepa de Cl. chauvvei IRF 206.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
9	4	4	8		+
10	4	4	8		+
11	2	2	4		+
12	2	4	4		+
13	2	4	8		+

CUADRO No. 7

Resultados de la prueba de potencia para la Bacterina Polibac evaluada con cepa de Cl. septicum.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
14	2	2	4		+
15	2	2	4		+
16	2	2	4		+

## CUADRO NO. 8

Resultados de la prueba de potencia para la Bacterina triple evaluada con cepa de Cl. chauvcei IRP 206.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
17	2	-	8		+
18	2	4	8		+
19	2	8	16		+
20	2	32	8		+
21	2	8	8		+

## CUADRO NO. 9

Resultados para la prueba de potencia para la Bacterina triple evaluada con cepa de Cl. septicum.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
22	2	4	8		+
23	2	8	2		+
24	-	4	4		+

## CUADRO No. 10

Resultados para la prueba de potencia para la Bacterina doble evaluada con cepa de Cl. chauvoei IRP 206.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
25	2	8	4		+
26	2	8	4		+
27	2	8	4		+
28	2	4	4		+
29	2	8	4		+

## CUADRO No. 11

Resultados para la prueba de potencia para nuestra Bacterina e valuada con cepa de Cl. chauvoei IRP 206.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
30	2	-	-		+
31	2	4	4	+	
32	2	8	4		+
33	2	8	8	+	
34	2	8	8	+	



## CUADRO No. 12

Resultados para la prueba de potencia para nuestra Bacterina e valuada con cepa de Cl. septicum.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
35	2	4	4	+	
36	2	4	6	+	
37	2	-	-	+	

## CUADRO No. 13

Resultados para la prueba de potencia para nuestro Toxoide e-valuado con cepa de Cl. chauvoei IRF 206.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
38	4	4	8		+
39	-	2	4		+
40	2	4	4		+
41	2	4	4		+
42	2	2	8		+

CUADRO NO. 14

Resultados para la prueba de potencia para nuestro Toxoide evaluado con cepa de Cl. septicum.

Cuye No.	Título de anticuerpos día 0	Título de anticuerpos día 14	Título de anticuerpos día 28	Vivió	Murió
43	2	2	4	+	
44	2	2	32	+	
45	2	2	8	+	

CUADRO NO. 15

Resultados para la prueba de potencia para nuestra Bacterina-Toxoide evaluada con cepa de Cl. chauvoei IRP 206.

Cuye No.	Título de anticuerpos día 0	Título de anticuerpos día 14	Título de anticuerpos día 28	Vivió	Murió
46	2	-	-		+
47	4	8	256	+	
48	2	8	256		+
49	2	16	2		+
50	16	256	256		+

## CUADRO No. 16

Resultados para la prueba de potencia para nuestra Bacterina-Toxoide evaluada con cepa de Cl. septicum.

Cuje No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
51	2	4	2	+	
52	2	-	-	+	
53	2	4	4	+	

## CUADRO No. 17

Resultados para la prueba de potencia para el grupo control de Clostridium chauvoei.

Cuje No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
54	2	2	2		+
55	2	2	4		+
56	2	2	2		+
57	2	2	2		+
58	2	2	4		+

## CUADRO No. 18

Resultados para la prueba de potencia para el grupo control de  
Clostridium septicum.

Cuye No.	Título de anticuerpos (1 / Título)			Vivió	Murió
	día 0	día 14	día 28		
55	2	2	2		+
60	2	2	4		+
61	2	2	2		+

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Primeramente, la evaluación de los toxoides, en cuanto a la -- cantidad de materia de naturaleza protéica, no se hizo para te -- ner la seguridad de que cantidad de toxinas se tenían, sino -- que al saber que el *Clostridium* al crecer en un medio genera -- la producción de toxina (sustancia de naturaleza protéica), lo -- que se quería asegurar era solamente esta presencia, pues los -- estudios que se le iban a realizar a éste producto no dependían -- específicamente de una concentración bien definida.

Para la determinación de las dosis letales se trabajó el método -- de Reed-Muench; dicho método establece que toda evaluación se -- haga bajo un mismo patrón o factor de dilusión, sin embargo, -- como a lo que nosotros nos interesó reportar no iba a ser final -- mente una expresión de dilusión sino un número específico de -- esporas se trabajó no con un patrón definido de dilusiones, si -- no con unas dilusiones que nos dieran concentraciones especifi -- cas de esporas por mililitro.

Finalmente, la prueba de potencia que es la parte medular de -- este trabajo nos aporta resultados interesantes. En primera -- instancia vemos una marcada diferencia entre *Clostridium septi-* -- *cum* y *Clostridium chauvcei*; en las pruebas de desafío en las -- que se utilizó *Clostridium septicum*, no hubo ningún animal muer -- to de los inmunizados aún cuando todos los controles murieron

antes de setenta y dos horas; mientras que en las pruebas con Clostridium chauvei el resultado general es la muerte de todos los animales. Vemos que de los animales inmunizados con -- cuatro productos comerciales conteniendo Clostridium chauvei ninguno sobrevivió al desafío, aún cuando presentaron elevaciones en el título de anticuerpos.

De los productos por nosotros preparados, el único que confirió una inmunidad protectora fué la bacterina, en donde según -- nuestros resultados, la protección fué de un 60% (ver cuadro -- 11); los resultados con respecto al toxoide están de acuerdo -- con lo que reporta Bojorquez (2), en donde también se encuentra una protección negativa para éste producto (ver cuadro 13), así mismo, también reporta una protección del 60% para la Bacterina y un 15% para la Bacterina-toxoide, endonde nosotros -- reportamos un 20% (ver cuadro 15).

En el caso de la Bacterina-toxoide se observó un fenómeno muy curioso, teniendo como antecedente los valores de los títulos para la Bacterina y el Toxoide por separado, esperábamos tener unos resultados semejantes para este producto, sin embargo, los resultados que se obtubieron eran unos títulos demasiado -- elevados, por lo que se decidió evaluar nuevamente los sueros y probarlos con bacterina y toxoide por separado; los resultados que se observaron esta vez fueron que la evaluación con -- bacterina daba resultados concordantes con la demás serie de resultados, mientras que los resultados de la evaluación con -- toxoide seguían siendo demasiado elevados; ésto no resultaría

extraño si la protección conferida hubiera sido alta, pero en vista de que sucedió lo contrario, es posible pensar que el toxoide producido tenga un carácter antigénico inmunodominante con respecto a la bacterina, por tal razón, la respuesta inmune fué dirigida contra éste, pero los anticuerpos no son protectores, lo cual puede ser debido a que durante la inactivación las toxinas y antígenos de superficie bacterianos hayan sufrido una modificación por acción del formaldehído, y por lo tanto, los anticuerpos producidos (o la respuesta inmune montada) contra el toxoide y la bacterina no son eficaces, por lo cual, los animales mueren a pesar de detectar elevación en el título de anticuerpos.

Al observar los resultados podría pensarse que todos los productos al menos están cumpliendo con uno de sus propósitos que sería el de proteger contra Clostridium septicum, pero no lo hacemos válido ya que se ha establecido que la infección por Clostridium septicum es muy aislada y que los casos más graves están asociados con Clostridium chauvei y Clostridium Novyi -- (32).

En los resultados de los títulos de anticuerpos se presentan en algunos casos ausencia de algunos títulos, esto se debió a que en el momento del sangrado de los animales se dificultó esta operación, por lo que para no arriesgar al animal a morir por el efecto traumático se decidió no intentar más por esa vez y desconocer en ese momento el título de anticuerpos de ese

animal. Por otro lado, observamos en algunos datos un aumento y posterior disminución del título de anticuerpos, éste tipo de resultados los atribuimos a factores no determinados de la metodología.

Debido a que la técnica utilizada para la cuantificación de -- los anticuerpos es muy sensible y que los animales utilizados nunca estuvieron en contacto previo con *Clostridium* o algún otro microorganismo, el título 1:2 se considera como un valor -- negativo de presencia de anticuerpos.

Cabe hacer notar una observación más y es el hecho de que los cuyes inoculados con los productos comerciales presentaban un absceso en la zona de inoculación y que dicho absceso no desapareció durante el tiempo que duró la experimentación; al cabo de una semana de haber sido inoculados, los animales presentaban en la zona de inoculación el necrosamiento de la epidermis; ésto nos lleva a pensar también que la vía de administración ó los adyuvantes por esa vía no están funcionando.

Existe una gran discusión a cerca de que metodología de evaluación de bacterinas es la más adecuada, si la de los Estados Unidos (que utiliza una cepa estandarizada para el desafío de todos los productos similares) o la del British Veterinary Codex (la cual utiliza como cepa de desafío la misma cepa de producción del biológico); la respuesta sigue vacante en cuanto -- no se considere el hecho de que se ha logrado abatir el proble



ma cuando se han incluido en la producción cepas aisladas de -  
casos de infección clostridial, y que éstos productos se han a  
plicado en la zona de la cual fué aislada la cepa (11,29).

## CONCLUSIONES

PRIMERA . - Los productos biológicos comerciales evaluados no cumplen con el requisito de potencia constatado con la modificación hecha por nosotros a la técnica del Manual de Requerimientos Mínimos Para Productos Biológicos Veterinarios de la S.A.R.H..

SEGUNDA . - Del análisis de los resultados podemos concluir - que la inumidad contra *Clostridium* depende de la patogenicidad de la especie.

TERCERA . - Vimos que en la administración de la bacterina-toxoide existe poca protección, y que el toxoide no protege, por lo que para aumentar la protección de éstos productos hay que separar la bacteria de su medio de cultivo para poder administrarla como inmunógeno.

CUARTA . - El presente trabajo sólo comprueba que de 1980 (de donde se tienen los últimos reportes ) a la fecha, el problema clostridiasis sigue igual.

## RECOMENDACIONES

UNICA . - Los laboratorios productores de biológicos que contienen *Clostridium* deberían de incorporar a su producción todas las cepas que se pudieran aislar de infecciones clostridiales naturales, para buscar con ésto, un aumento en la protección de sus productos.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bcjrquez Narvaez Luis  
 Inmunología del Clostridium chauvoei  
 II Convención y Exposición Nacional de Salud Animal  
 X Reunión Anual de Sanidad Animal  
 México Junio-Julio 1981.
- 2.- Bcjrquez Narvaez Luis  
 Investigación de nuevos inmunógenos contra carbón sintomático  
 Reunión anual del área médica (INIP) SARH  
 Diciembre 1979.
- 3.- Brown K.K., Parizek R.E., Stewart R.C.  
 Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vacci  
 nation with a multivalent bacterin-toxoid  
 Veterinary Medicine / Small animal clinician p. 1717-20 Dec 1976
- 4.- Chardler H.M.  
 Some observations on the quality control testing of Clostridium  
chauvoei vaccines  
 Develop.Biol.Standard Vol 32 p. 137-41 1976.
- 5.- Cheryl M.E. Mc Crindle  
 The preservation of Clostridium chauvoei in liquid nitrogen  
 Journal of the South African Veterinary Association  
 Vol 50 No.3 p. 321-2 1979.

- 6.- Claus K.D., Macheak M.E.  
Characteristics and immunizing properties of culture filtrates  
of Clostridium chauvoei  
Am. J. Vet. Res. Vol 33 No. 5 p. 1031-8 May 1972.
- 7.- Claus K.D., Kolbe D.R.  
Immunogenicity of Clostridium septicum in guinea pigs  
Am. J. Vet. Res. Vol 40 No. 12 p. 1752-5 Dec. 1979.
- 8.- Claus K.D., Macheak M.E.  
Preparation of a Clostridium chauvoei antigen and determination  
of protective immunity by plate agglutination test.  
Am. J. Vet. Res. Vol 33 No. 5 p. 1045-52 1972.
- 9.- Cottral George E.  
Manual of Standardized methods for veterinary microbiology  
Comstock Publishing Associates, a division of Cornell University  
Press, Ithaca and London  
First Published 1978.
- 10.- Cutter laboratories (División Veterinaria)  
Seminario de Clostridiasis  
México 1978.
- 11.- Dodson L.F.  
Failure of Clostridium chauvoei vaccines to protect against  
blackleg (correspondence)  
Australian Vet. J. Vol 54 p. 598 Dec 1978

- 12.- Gorbach Sherwood L., Bartlett John G.  
 Anaerobic infections : Old myths and new realities (editorial)  
 The Jour. of Inf. Dis. Vol 130 No. 3 p.307-9 1974
- 13.- Cutiérrez Renovato Hiram  
 Trabajo de investigación sobre enfermedades infecciosas del  
 centro de producción agropecuaria FESC.  
 Comunicación personal
- 14.- Hoffmann S., Justesen T.  
 Effect of temperature, humidity and exposure to oxygen on the  
 survival of anaerobic bacteria  
 J. Med. Microbiol. Vol 13 p. 609-12 1980.
- 15.- Holdeman L.V., Catc E.P., Moore W.E.C.  
 Fermentation pathways of anaerobic bacteria  
 Bull. of Inf. Epiz. Vol 67 No. 10 p. 1239-48 1967.
- 16.- Horner R.F.  
 Malignant oedema caused by Clostridium perfringens type A in  
 a horse  
 Journal of the South African Veterinary Association  
 Vol 53 No. 2 p. 122-3 1982.
- 17.- Jorbert L., Vallette L.  
 Les echecs de la vaccination anti-symptomatique et les methodes  
 de controle d'activite des vaccins  
 Develop. Biol. Standard Vol 32 p 151-5 1976.

- 18.- Kaplar M.M., Koprwski H.  
La rabia : técnicas de laboratorio  
Serie de monografías No.23  
Organización Mundial de la Salud  
Tercera edición, Suiza 1976.
- 19.- Kerry J.B.  
Field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccine  
Vet. Rec. Vol 105 No. 24 P. 551-4 1979.
- 20.- Knight P.A., Kent J.  
Some problems concerning the assay of Clostridium chauvoei  
vaccine in laboratory animals  
Develop. Biol. Standard. Vol 32 P. 143-50 1976.
- 21.- Kolbe D.R., Claus K.D., Nerving R.M.  
A method for the production of Clostridium haemoliticum spores  
on solid medium  
J. of Biological Standard. Vol. 9 P. 115-9 1981.
- 22.- Labrandero E.  
Evaluación de 5 bacterinas comerciales contra Clostridium chauvoei  
Reunión anual del área médica (INIP) SARH  
Diciembre 1979.
- 23.- Macheak M.E., Claus K.D., Maloy S.E.  
Potency testing Clostridium novyi containing bacterins: comparison  
of immunologic response in guinea pigs and sheep

Am. J. Vet. Res. Vol 33 No. 6 p. 1201-8 Jun 1972.

- 24.- Manual de requerimientos mínimos para biológicos veterinarios  
S.A.R.H. 1977.
- 25.- Merchant I.A.  
Veterinary bacteriology and virology  
The Iowa State College Press  
Ames Iowa 1967.
- 26.- Meynell G.G.  
Theory and practice in experimental bacteriology  
Cambridge at the university press  
p. 204 1965.
- 27.- Morilla G. Antonio  
Manual de inmunología  
Ed. Diana  
Septiembre 1986.
- 28.- Priego Hernández Guillermo  
Desarrollo de conjugados de Clostridium para el diagnóstico  
diferencial de especie por medio de microscopía de inmunofluo-  
rescencia.  
Tesis profesional de Licenciatura 1985.



## 29.- Princewill T.J.T.

Effect of calcium chloride on germination and pathogenicity of spores of Clostridium chauvoei

J. Comp. Path Vol 75 p.343-51 1965.

## 30.- Reed G.A.

Failure of Clostridium chauvoei vaccines to protect against blackleg (correspondence)

Australian Vet. Jour. Vol. 53 p. 393 August 1977

## 31.- Shapton D.A.

Isolation of anaerobes

Academic press Inc. (Londres) LTD

Primera edición 1975

## 32.- Siomara Martínez

Crecimiento de Clostridium perfringens en diferentes medios

Revista de Salud Animal No. 5 p. 259-65 1983

## 33.- Sterne M.

Clostridial infections

Br. Vet. J. Vol 137 No. 5 p.259-65 1983

## 34.- Sterne M.

Algunos aspectos del diagnóstico y control de las enfermedades causadas por Clostridios

Veterinaria Montevideo Vol 15 No. 70 p.73-7 1979.

35.- Supplemental assay methods for potency testing products containing Clostridium antigen  
United States Department of Agriculture, animal and plant health inspection service.

36.- Udovlcic I.  
Comparative study of immune response in rabbits to the use of some clostridial toxoids and their mixture  
Vet. Arh. Vol 49 No. 5 p. 239-50 1979.

37.- Vedemecum Veterinario  
Productora Nacional de Biológicos Veterinarios S.A.G.

38.- Wells P.W.  
Development of a combined clostridial and Pasteurella haemolytica vaccine for sheep  
Vet. Rec. No. 114 p. 266-8 March 1984.