

51  
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ANALISIS PROTEICO DE DIFERENTES CEPAS  
DE CLOSTRIDIUM

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

JOSE LEON ZARATE VAZQUEZ

ASESORES: M.C. MA. LOURDES ONTIVERO CORPUS

M.C. VICTOR TENORIO GUTIERREZ



## **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	2
1.0 Introducción	4
1.1 Generalidades de las Clostridiasis.	6
1.2 Características morfológicas y bacteriológicas.	9
1.3 Patogénesis y transmisión.	15
1.4 Toxinas y otros factores tóxicos.	18
1.5 Signos clínicos y lesiones.	23
1.6 Diagnóstico.	27
1.7 Control y tratamiento.	32
1.8 Electroforesis.	36
2.0 Objetivos.	38
3.0 Material y métodos.	39
3.1 Preparación de extractos.	39
3.2 Perfiles electroforéticos.	43
3.3 Tinción de geles.	47
3.4 Curva patrón de movilidad relativa.	48
4.0 Resultados.	50
5.0 Discusión.	59
6.0 Conclusiones.	64
7.0 Recomendaciones.	65
8.0 Bibliografía.	66

## RESUMEN.

El objetivo de el presente trabajo fue investigar si existen diferencias en las distintas cepas de Clostridium utilizadas en la produccion de biológicos.

Se desarrollaron cepas de Clostridium chauvoei y Clostridium septicum en el medio líquido de Smith & Holdeman, las cuales se incubaron a 37 C por 48 hrs.

Posteriormente se verificó la pureza de los cultivos y del desarrollo se obtuvieron los extractos totales de proteínas; determinándose por el método de Bradford.

De 1.5 ml de cultivo se obtuvo la masa celular, la cual fué suspendida en buffer de muestra de Laemmli en condiciones desnaturizantes, hirviéndose por 10 minutos.

Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 12%. Después del corrimiento, se observaron diferencias en las bandas que se encuentran entre 160 y 150 KD de peso molecular del patrón protéico entre las cepas de Clostridium chauvoei, en las que se cuentan: una cepa utilizada en la producción de biológicos, tres cepas mantenidas en el laboratorio y una cepa de desafio.

Las cepas de Clostridium septicum no mostraron diferencias en las bandas del patrón protéico.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de la existencia de diferencias antigénicas entre las cepas existentes en el país y posiblemente sea una de las múltiples causas en la falla vacunal o en la ausencia de anticuerpos dirigidos contra éstas proteínas.

## 1. INTRODUCCION.

El carbón sintomático al igual que el edema maligno se clasifican dentro de las gas gangrenas, ambos afectan con cierta periodicidad a bovinos, caprinos y ocasionalmente a ovinos, causando pérdidas económicas severas a la ganadería mundial, lo cual repercute en las explotaciones pecuarias.

En México, Vargas (43) calculó las pérdidas producidas por estas enfermedades en 480,000 dólares anuales de 1972 a 1977. Más tarde, un estudio realizado por el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP) y la Dirección General de Sanidad Animal (44), señala que las enfermedades que afectaban con mayor frecuencia a la ganadería productora de carne en México en 1985 son brucelosis, pasteurellosis bovina, carbón sintomático, antrax, abortos y rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR); mientras que la ganadería productora de leche es afectada con mayor frecuencia por tricomoniasis y vibriosis, además por las ya mencionadas.

De acuerdo a la literatura (38), las clostridiasis pueden ser prevenidas eficazmente por algún tipo de inmunógeno, siempre que cumplan los requisitos de control de calidad mínimos necesarios para todo biológico.

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

A su vez, Seifert y col. (32), mencionan que en el noreste de México, a pesar de que se realizan inmunizaciones repetidas con vacunas introducidas ilegalmente de los Estados Unidos, no se logra una inmunización efectiva.

Por otro lado, en el congreso de Buiatría (Ver., 1991) al hablar de el tema, se comentó que los biológicos elaborados en los Estados Unidos de diferentes marcas comerciales, pasan por el control de calidad de la FDA (Food & Drugs Administration), el cual es estricto para todos los productos (26).

### 1.1 GENERALIDADES DE LAS CLOSTRIDIASIS.

Las especies del género Clostridium consideradas como patógenas, son capaces de producir severas enfermedades en la mayoría de las especies de animales domésticos e incluso a los seres humanos. Estas enfermedades son conocidas con el nombre genérico de clostridiasis (27).

Dependiendo de la especie de Clostridium involucrada, se producen diferentes manifestaciones clínicas, de ésta manera se utiliza un término específico para ser mención a un tipo particular de clostridiasis, por ejemplo la enfermedad causada por Clostridium tetani, se identifica como tétanos; así mismo al hablar de pierna negra ó de carbón sintomático, se esta refiriendo al padecimiento producido principalmente por Clostridium chauvoei.

En el cuadro No. 1 se expone una lista de las clostridiasis más importantes para bovinos y caprinos, así como la especie de Clostridium considerada como agente causal.



Las clostridiasis debido a la ubicuidad de sus agentes etiológicos, a las peculiaridades de ésta y a la necesidad de intervención de algunos factores predisponentes para su aparición, tienen tres caracteres epizootiológicos comunes:

- a) Diseminación universal. .)
- b) No transmisibilidad por contacto. .)
- c) Incidencia esporádica.

Sterne (37), divide a las clostridiasis en tres grupos de acuerdo a las principales manifestaciones y órganos afectados, como se vé en el cuadro No. 2, el grupo de las enterotoxemias comprende a las condiciones que afectan el tracto intestinal y órganos parenquimatosos. El grupo de las intoxicaciones neurotrópicas incluye a las enfermedades en que se involucra principalmente el sistema nervioso; y el de las miositis clostridiales, a aquellas enfermedades en que predomina la mionecrosis con toxemia y formación de gas.

CUADRO 1

PRINCIPALES CLOSTRIDIOS PATOGENOS EN BOVINOS Y CAPRINOS.

ESPECIE DE CLOSTRIDIUM.	NOMBRE DE LA ENFERMEDAD QUE OCASIONA
Cl. Tetani	Tétanos
Cl. botulinum	Botulismo
Cl. chauvoei	Pierna negra (carbón sintomático, cuarto negro ó mancha).
Cl. septicum	Edema maligno; en bovinos causa además un cuadro de abomastitis.
Cl. perfringens	Enterotoxemia.
Cl. novyi tipo A	Gangrena gaseosa y síndrome de cabeza hinchada de los carneros.
Cl. novyi tipo B	Hepatitis necrótica.
Cl. haemolyticum	Hemoglobinuria bécilar.
Cl. sordelli	Aparentemente se asocia con otros clostridios para producir cuadros de gangrena gaseosa.

Sterne, M. 1981

## 1.2 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BACTERIOLOGICAS.

El género Clostridium son bacterias gram positivas, anaerobias estrictas, en forma de bastón, formadoras de esporas que por lo general son móviles. La esporulación se produce cuando las condiciones de temperatura, humedad y pH son desfavorables para la existencia de las formas vegetativas; también puede ocurrir cuando en el medio ambiente hay escasez de elementos nutricionales ó presencia de oxígeno libre; éstas esporas son resistentes al calor, desecación y a las sustancias germicidas, y representan una fuente de contaminación para los animales. Es común que las esporas se encuentren en el suelo y también en distintos animales que habitan áreas donde el padecimiento es endémico (10,27).

Algunas características comunmente encontradas en Clostridium chauvoei y Clostridium septicum se muestran en el cuadro 3 (40).

El Clostridium chauvoei es un bastón que en la fase logarítmica de crecimiento es marcadamente pleomórfico; mide de 3 a 8 micras de longitud por 0.6 a 0.8 micras de ancho. Forma esporas ova-les, con posición central ó subterminal, con un diámetro de 0.6

CUADRO 2

CLASIFICACION DE LAS CLOSTRIDIASIS.  
EN BASE A SUS MANIFESTACIONES

CLOSTRIDIUM INVOLUCRADOS	GRUPOS
<u>Ci. perfringens</u> tipo A,B,C,D.	Enterotoxemias.
<u>Ci. Novyi</u> tipo B,D.	
<u>Ci. septicum</u> .	
<u>Ci. sordelli</u> .	
<u>Ci. botulinum</u> tipo A,B,C,D,E,F,G.	Intoxicaciones.
<u>Ci. tetani</u> .	Neurotropicas.
<u>Ci. chauvoei</u> .	Miositis.
<u>Ci. septicum</u> .	Gangrena.
<u>Ci. sordelli</u> .	Gaseosa.
<u>Ci. novyi</u> tipo B.	

Sorno, M. 1981

micras y de 3 a 8 micras de largo. Tiene extremos largos filamentosos con frecuencia se encuentran formas pleomórficas con extremos engrosados y formas de limón. Existen flagelos peritricos (10).

Las colonias que se producen en agar sangre al ser sembradas son: hasta de 3 mm de diámetro, redondas, crateriformes, de color gris neutro y generalmente muestran una zona de hemólisis completa. Habita en el tracto digestivo de animales asintomáticos y algunas esporas sobreviven por más de 10 años en el suelo (8,35).

Clostridium septicum es un bacilo cilíndrico, anaerobio obligado, que mide 0.5 micras de diámetro por 2 a 6 micras de ancho; tiene flagelos peritricos. La forma vegetativa se presenta por lo general aislada, pero se le puede encontrar en grandes cadenas y filamentos. No es encapsulado y no se tiñe uniformemente. Con la tinción de azul de metileno puede verse gránulos en la célula. La temperatura óptima para su desarrollo es de 37 C y el pH es de 7.6. Forma esporas ovales y subterminales, que le dan al microorganismo esporulado una forma de zapato para nieve. Las colonias en agar sangre con 14 a 16 horas de crecimiento son grisáceas, irregulares, con crecimiento en oleadas, puede mostrar una zona de hemólisis hasta de 4 mm de diámetro (8,10).

**CUADRO 3**

**CARACTERISTICAS COMUNMENTE ENCONTRADAS EN LOS CLOSTRIDIOS  
C. septicum y C. chauvoel.**

PRUEBA	RESULTADO
Tinción de gram.	Positivo
Morfología.	Bastones anaerobios estrictos con esporas ovales y subterminales.
Movilidad.	Positivo
Cápsula	Negativo
Formación de gas.	Positivo
Hemólisis.	Positivo
Catalasa.	Negativo
Ureasa.	Negativo
Indol.	Negativo
Lipasa.	Negativo
Maltosa.	Positivo
Lactosa.	Positivo
Manitol.	Positivo
Fermentación de Gluc.	Positivo

No es conveniente suponer que una especie de Clostridium es siempre la única responsable de la gangrena gaseosa en el hombre ó de las infecciones de las heridas y del edema maligno en los animales. Otras especies patógenas de Clostridium pueden ayudar a la destrucción tisular. Clostridium septicum no es siempre el agente infectante; pero debido a su rápido y vigoroso desarrollo, puede enmascarar a otros patógenos presentes como Clostridium perfringens, Clostridium sordellii y Clostridium novyi (10,16,27,40).

Cl. perfringens es un germen que mide de 1 a 1.8 micras de ancho por 4 a 10 micras de largo, puede presentar formas cocoides ó elongadas (8). Sus esporas son rara vez observadas en cultivos, aproximadamente 3/4 partes de las cepas tienen esporas demostrables con tinta china (38). Cuando ocurre, son de forma oval y de posición subterminal, aunque en ocasiones se observan en posición terminal. Las esporas así como las cepas recuperadas a partir de muestras clínicas, pasan rápidamente en 4 a 6 horas al ponerse en cultivos a 37 C, por lo que es el anaerobio más fácil de aislar (38) y de más rápido crecimiento, ya que tiene un tiempo de duplicación de 10 minutos a 45 C en un pH de 7 (35,47). Las características morfológicas de las colonias después de una incubación de 12 a 18 horas en agar sangre son: colonias de 1 a 3 mm de diámetro, bajas, convexas, semiopacas ó brillantes, con

bordes enteros, muestran una doble zona de hemólisis, una completa debido a la toxina theta y una más extensa por la toxina alfa (35).

Clostridium novyi es una especie que comprende a bastones de 4 a 8 micras de longitud por 1 de ancho, son gram positivos en cultivos jóvenes, forma esporas ovales y subterminales. Después de las 24 horas de incubación, las colonias en agar sangre casi nunca son aparentes, a las 48 horas, miden de 2 a 4 mm de diámetro, son elevadas, regulares, con bordes enteros, con una zona de hemólisis incompleta de aproximadamente 8 mm de diámetro (8).

Clostridium sordelli es una bacteria con puntas redondeadas, mide de 2 a 4 micras de largo por 1 de ancho, forma esporas ovales centrales ó subterminales (35). Las colonias que produce en agar sangre miden de 2 a 5 mm y muestran ramificaciones que se extienden sobre la estria del asa, su apariencia es variable, se observan desde semiopacas y grisáceas a blancas y opacas mientras avanza la esporulación (8).



### 1.3 PATOGENESIS Y TRANSMISION.

Con respecto a las clostridiasis, el carbón sintomático conocido también como pierna negra, mal de paleta, cuarto negro ó mancha, es una enfermedad infecciosa, aguda, febril de los bovinos y otros rumeantes, distribuida ampliamente en todo el mundo, pero predomina en áreas tropicales, causada por Clostridium chauvoei; la via de infección más común es la oral, aunque en ocasiones puede penetrar por lesiones en la piel (1,28).

El carbón sintomático, al igual que otras enfermedades clostridianas, ha tenido un interesante pasado. Anteriormente se le confundía con antrax, pero en 1874 se demostró que era una enfermedad diferente, y en 1920 se precisó que era causada por distintos agentes etiológicos. En 1887 se le dió el nombre de Bacillus chauvoei al microorganismo, y en 1920 se le estableció que era un clostridio (10).

El edema maligno es una enfermedad febril, aguda, que se clasifica dentro de las gas gangrenas; su agente etiológico principalmente es el Clostridium septicum, pero puede estar asociado el Clostridium chauvoei y en ocasiones el Clostridium perfringens, Clostridium sordelli y Clostridium novyi. Se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los ani-

males herbívoros, contaminando así tierras y pastos; la infección natural se realiza mediante lesiones bucales ó cutáneas (1,27).

El nombre de edema maligno, se aplicó en 1881 a una infección bovina en la cuál se aislaron microorganismos esporulantes, anaerobios, en forma de bastón llamados Bacillus oedermatiens maligni. Otros investigadores habían aislado previamente de la sangre de una vaca, un microorganismo similar al cuál llamaron Vibrio septique. Este microorganismo puede no haber sido idéntico al descrito en 1881, pero el nombre de su especie ha sido aceptado después de haber latinizado en septicum (10).

Clostridium septicum se encuentra distribuido ampliamente en todo el mundo, incluso en los climas más fríos e indudablemente es muchas veces el microorganismo predominante en las infecciones clostridianas de las heridas y en el edema maligno de todos los animales de la granja. Se encuentra en el suelo, por lo cuál puede introducirse con facilidad en los tejidos a través de heridas penetrantes ó quirúrgicas.

**CUADRO 4**

**MODO DE PRODUCCION DE TOXINAS LETALES DE ALGUNOS  
CLOSTRIDIOS PATOGENOS.**

EXOTOXINAS		TOXINAS PROTOPLASMATICAS	
ESPECIE	TOXINA	ESPECIE	TOXINA
<u>perfringens</u>	alfa,beta epsilo,iota.	<u>botulinum</u>	todas
<u>septicum</u>	alfa	<u>totani</u>	todas
<u>novyi</u>	beta,gama	<u>novyi</u>	alfa
<u>chauvoei</u>	todas	<u>sordelli</u>	todas
<u>haemolyticum</u>	beta		

Adaptado de Smith, L. DS Holdeman, L.V., 1968.

**CUADRO 5**

**TOXINAS LETALES SEGUN SU ACTIVIDAD AL SER PRODUCIDAS**

TOTALMENTE ACTIVAS		PROTOXINAS	
ESPECIE	TOXINA	ESPECIE	TODAS
<u>perfringens</u>	alfa,beta	<u>perfringens</u>	epsilon,iota
<u>novyi</u>	alfa,beta	<u>botulinum</u>	todas
<u>haemolyticum</u>	beta	<u>septicum</u>	alfa
<u>hystoliticum</u>	alfa,beta		

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

#### 1.4 TOXINAS Y OTROS FACTORES TOXICOS.

Todos los clostridios patógenos producen toxinas, pero no de la misma forma. Algunas son producidas en el interior de la célula y no forman parte de la pared celular, llamadas "Exotoxinas", las cuales difunden a través de la pared celular, encontrándose en mayor cantidad al final del periodo logaritmico de crecimiento. Otras no difunden a través de la pared celular y son liberadas al producirse la lisis de la célula, llamadas "Endotoxinas" (34).

En el cuadro No. 4 se muestra el modo de producción de las toxinas letales de algunos clostridios.

A su vez las toxinas pueden ser sintetizadas en forma activa ó inactiva, necesitando éstas últimas de enzimas proteolíticas para su activación. Lo anterior se puede demostrar añadiendo al medio de cultivo enzimas como la tripsina, aunque a veces no es necesario, ya que el mismo microorganismo produce dichas enzimas (34). En el cuadro No. 5 se presentan algunas toxinas sintetizadas por distintos clostridios patógenos.

La mayoría de éstas toxinas son específicas para sus antitoxinas ó antisueros (34), sin embargo existe neutralización entre ellas; por ejemplo: la toxina de Cl. chauvoei con la toxina de Cl.

septicum además por la producida por el mismo Cl. chauvoei. Así mismo Cl. septicum se relaciona antigénicamente con Cl. hystoliticum.

Mussa (23), estudió las características de Cl. chauvoei y de Cl. septicum y representó a los antígenos de la espora con letras romanas mayúsculas, los somáticos con números arábigos y los flagelares con letras minúsculas. Así podemos observar que la mayoría de las cepas de Cl. chauvoei comparten antígenos somáticos y de la espora, siendo la diferencia únicamente en los flagelares. La fórmula es por tanto: A:3:f ó A:3:g.

El antígeno de la espora es compartido por Cl. septicum y aparentemente es responsable de la aglutinación cruzada entre las dos especies.

En el cuadro No. 6 se observan las cuatro toxinas de Cl. chauvoei (35), la toxina alfa es letal necrozante y hemolítica. La gama es hialuronidasa, la toxina beta es desoxirribonucleasa, la delta es oxígeno lábil y se relaciona antigénicamente con la estreptolisina O.

### CUADRO 8

TOXINAS PRODUCIDAS POR *Clostridium chauvoei* Y SU RELACION ANTIGENICA CON OTRAS TOXINAS.

TOXINA	CARACTERISTICAS	RELACION ANTIGENICA
alfa	fetal, necrozante, hemolítica.	toxina alfa <u><i>Ci. septicum</i></u> .
beta	desoxirribonucleasa	_____
gama	hiaturonidasa	_____
delta	hemolisina oxígeno lábil	antiestreptolisina

Tomado parcialmente de Smith L. DS, 1975.

### CUADRO 7

TOXINAS PRODUCIDAS POR *CLOSTRIDIUM SEPTICUM* Y SU RELACION ANTIGENICA CON OTRAS TOXINAS.

TOXINA	CARACTERISTICAS	RELACION ANTIGENICA
alfa	fetal, necrozante, hemolítica.	toxina alfa <u><i>Ci. chauvoei</i></u>
beta	desoxirribonucleasa	desoxirribonucleasa de <u><i>Ci. chauvoei</i></u> .
gama	hiaturonidasa	_____
delta	hemolisina oxígeno lábil	similar a delta de <u><i>Ci. chauvoei</i></u> , antiestreptolisina

Tomado de Smith & Holdeman (35).

Pruebas inmunológicas con Cl. chauvoei, han demostrado que son similares entre sí (8), lo que nos conduce a el hecho de que las pruebas de control de calidad que se realizan en los Estados Unidos a biológicos que tienen en su fórmula a éste agente, utilizan una cepa de desafío.

Sin embargo, aunque son similares entre sí, las cepas sí tienen diferencia antigénica (23).

Se considera que para la producción de biológicos, los antígenos somáticos desarrollan un papel importante y primordial (8), mientras que para la actividad inmunogénica de los flagelos aparentemente es escasa. Debido a lo anterior, se producen comercialmente bacterinas de cultivos formalinizados.

Clostridium septicum: éste microorganismo es menos complejo en comparación con los otros clostridios. Según Mussa (23), quien estudió 39 cepas en 1959 determinó: seis grupos antigénicos flagelares (a,b,c,d,e,f); dos somáticos (1,2) y uno común llamado A de la espora.

En el cuadro No. 7 se observan las toxinas producidas por Cl. septicum. La toxina alfa es letal, necrozante, hemolítica y muy similar, tanto en su acción, como antigénicamente a la toxina

alfa de Cl. chauvoei, la que es inactivada por anticuerpos producidos contra la toxina alfa de Cl. septicum (39). Esta toxina alfa es la causante de la hemólisis de eritrocitos en diferentes especies animales (35). Su acción in Vitro es compleja; aparentemente estimula una vasoconstricción periférica que aumenta la presión arterial y posteriormente tiene efecto directo sobre el músculo cardiaco, ocasiona también contracción del músculo liso y liberación de histamina en el pulmón. La toxina delta es oxígeno lábil, hemolítica y similar a la producida por Cl. chauvoei.

Este clostridio también forma otros factores (36), uno similar a la agresina de Cl. perfringens. Una hemoaglutinina asociada a la pared celular, y una neurominidasa diferente a la hemoaglutinina, que posiblemente ayuda a la diseminación del organismo en tejidos ó bien interfiere en la función de la membrana de otros tejidos afectados.

Algunos estudios (7,23), han demostrado la heterogenicidad de las cepas de Cl. septicum, ya que poseen un antígeno común y que la inmunidad conferida por los antígenos somáticos es más importante que la estimulada por otros antígenos. Además, el que la inmunidad producida sea de corta duración, hace suponer que la



resistencia estimulada por exposición natural a éste agente es más importante que el tratamiento con Bacterinas-toxoides(7).

#### 1.5 SIGNOS CLINICOS.

Debido a que los clostridios productores de gangrena gaseosa producen enfermedades de curso agudo y sobreagudo, los animales son encontrados generalmente muertos y en estado de descomposición, ya que éstos mueren en un lapso de 24 a 48 horas después de haberse iniciado los primeros signos, y éstos son observados ó informados con poca frecuencia. Es también por éstas razones que la mayoría de los autores que mencionan los signos clínicos se basan en infecciones experimentales.

Williams (46), describe los siguientes hallazgos patológicos macroscópicos encontrados en 173 casos de gangrena en bovinos de acuerdo al ó a los microorganismos demostrados en las lesiones:

Cl. chauvoei y Cl. septicum: área negruzca, seca, esponjosa, con olor rancio. Presencia de líquido amarillo pálido que rodea el músculo afectado y después se tiñe de sangre.

Cl. novyi y Cl. septicum: edema gelatinoso muy abundante en tejido subcutáneo y tejido conectivo intermuscular, claro al principio, después se tiñe de sangre.

Cl. septicum: edema teñido de sangre abundante, con numerosas burbujas de gas. Músculo de color rojo oscuro.

Sterne y Batty (38), mencionan que en el caso de animales que hayan muerto de una enfermedad que se sospeche de clostridiasis, se debe realizar la necropsia, enfocándose principalmente a piel y musculatura, vejiga y órganos parenquimatosos, y a la cavidad torácica, incluyendo el corazón y su cubierta.

Cl. chauvoei: debido a que no se logran observar lesiones en piel que expliquen la entrada de éste microorganismo a los animales afectados (34), se considera que la mayor parte de los casos de carbón sintomático son de origen endógeno.

La patogénesis de las clostridiasis de origen endógeno, en general, no se han estudiado extensivamente, en el caso de carbón sintomático, en el que los animales que más lo sufren tienen de 6 meses a 3 años de edad y se encuentran en las mejores condiciones de carne (8,38), se han visto patrones de comportamiento que atribuyen a cambios climáticos, por la repercusión que tienen

sobre el tipo de ingesta, ocasionando directamente cambios en la flora ruminal, que aunados a factores estresantes llevan al animal a un estado en que los gérmenes ó sus esporas pueden llegar a sangre después de pasar la pared intestinal y de ahí a músculos, donde un trauma posiblemente sea el factor desencadenante del proceso patológico, ya que se crearía un potencial rédox suficientemente bajo para que las esporas germinen produciéndose entonces el cuadro clínico.

Otros autores (31), sostienen que en las épocas de sequías los forrajes secos contaminados con esporas lanceran la mucosa oral y las inoculan, llegando al torrente circulatorio que las transporta a músculos donde se depositan y esperan las condiciones similares a las del caso anterior para germinar.

Los animales afectados por éste microorganismo y que llegan a observarse vivos, muestran una toxemia grave, con crepitación del miembro afectado por el gas producido. En algunos casos se llega a observar relación con sitios de vacunaciones u otros traumas, en esos casos se observa mayor presentación de gas y un edema predominante, con diseminación rápida, la muerte se presenta de 24 a 48 horas después de la inflación del sitio afectado con los primeros signos. Al final de la enfermedad, se presenta una bacteremia (34).

La lesión principal generalmente se encuentra en los músculos grandes de la espalda, pierna ó cuello, pero se puede presentar en lengua y confundirse con actinobacilosis. En el animal recién muerto se observan los músculos afectados de un color rojo negruzco, de aspecto seco y esponjoso, debido a la gran cantidad de burbujas de gas que se encuentran en los tejidos. Estos músculos se encuentran rodeados de grasa y emiten un olor rancio, dulzón, muy característico de las infecciones por Cl. chauvoei y Cl. septicum (34,38). Los órganos internos se encuentran relativamente sin cambio, a diferencia de la gangrena gaseosa, producida por Cl. novyi. El bazo muestra un tamaño normal, a diferencia de la esplenomegalia que se presenta en casos de antrax (33).

Malone y cols. (21), reportan haber encontrado de 29 casos de bovinos con miositis producida por Cl. chauvoei, 14 que tenían lesiones de miositis únicamente, 8 tenían miositis y pericarditis fibrinosa y 6 presentaban únicamente pericarditis fibrinosa y uno presentaba meningitis purulenta.

En bovinos la enfermedad por contaminación perineal postparto, presenta inflamación y edema de la zona, la que avanza hacia la pierna (38). En ovinos también se ha observado miocarditis necrótica y hemorrágica (11).

La vía de entrada del Cl. septicum, es generalmente por medio de heridas, aunque en bovinos también se ha descrito en casos de infecciones endógenas similares al carbón sintomático causado por Cl. chauvoei. El edema maligno producido por Cl. septicum, es secuela de heridas tales como castraciones, esquila ó partos mal atendidos (38). La infección es de curso agudo, en forma de muerte súbita (24), inicia con inflamación dolorosa, de la parte afectada. Después, se presenta edema, pero disminuye el dolor y la hipertermia de la zona afectada. A la necropsia se observa edema y hemorragias frecuentemente con algunas burbujas de gas. A menudo existe septicemia y las hemorragias se observan en todo el cuerpo, también puede notarse la presencia de exudado seroso sanguinolento en el peritonéo (33).

#### 1.6 DIAGNOSTICO DE LAS CLOSTRIDIASIS.

Se considera que la eficacia de los métodos de cultivo de anaerobios depende del método de colección, del transporte de los especímenes, de la prontitud del cultivo y del método de cultivo adecuado. Además del tiempo de exposición de la muestra al oxígeno ambiental, que les ocasiona pérdida de viabilidad, es una limitante.

Sterne (38), menciona que las muestras que se tomen de animales en que se sospeche de clostridiasis, se deben enviar en congelación ó en su defecto refrigeradas; pero si no es posible y el transporte excediera más de un día ó si las temperaturas a que se someterá la muestra van a ser elevadas, se debe de hacer uso de agentes químicos ó físicos, que no permitan la multiplicación bacteriana y no lastimen a los patógenos cuya presencia es deseable para elaborar un diagnóstico. "

Los agentes físicos son: hipertonicidad, lo cuál inhibe el crecimiento bacteriano. Esta puede ser en concentraciones elevadas de sales ó de glicerina.

La deshidratación es un método útil, donde los medios de comunicación son difíciles. Tiene la desventaja que el número de bacterias se altera, pero en ocasiones es el único método disponible.

La mayoría de las jarras anaeróbicas son modificaciones a la diseñada por Mc. Intosh y Fildes en 1916 (22). Son básicamente recipientes cilíndricos herméticamente cerrados, en uno de los cuales el aire puede ser evacuado mecánicamente y reemplazado por otro gas ó una mezcla de ellos. Mientras que en el otro sistema el oxígeno se elimina en forma química, por medio de generadores

de hidrógeno y dióxido de carbono como los desarrollados por Brewer y cols. (6). En ambos casos, se remueven los vestigios de oxígeno con la ayuda de un catalizador. Dicho catalizador ayuda en la reacción del oxígeno que se encuentra dentro de la jarra con el hidrógeno que se introduzca dando la atmósfera anaeróbica.

Existen métodos bacteriológicos enfocados a realizar tanto el aislamiento e identificación de clostridios. Sin embargo, en la literatura se encuentran diferentes manuales y artículos (8,27, 28,35) que contienen cuadros de identificación de clostridios por medio de pruebas bioquímicas, mismas que en ocasiones se contraponen en el resultado de algunas pruebas bioquímicas de algunas especies.

Tal vez éstas diferencias sean por motivos de falta de unificación de criterios para la preparación de medios ó sustratos utilizados por diferentes autores, ó bién, porque el periodo de incubación empleado sea diferente, lo que puede invalidar la identificación (15).

Además, la interpretación de los resultados, tanto bacteriológicos así como los de inmunofluorescencia, para emitir un diagnóstico debe ser con cierta reserva (38), debido a:

a) las características del habitat de Cl. chauvoei y Cl. novyi,

que son francamente patógenos han sido recuperados en pequeñas cantidades de hígado de ovinos sanos (9,42,47); mientras que Cl. septicum y Cl. perfringens invaden casi la totalidad de los clostridios pocas horas de muerto el animal y aunque no hayan sido la causa de muerte es posible realizar su aislamiento y debido a su rápido crecimiento pueden enmascarar la presencia del agente etiológico.

b) su forma de presentación, así debido a las lesiones, el diagnóstico clínico de carbón sintomático es, a diferencia de otras miositis clostridiales, el más fácil de realizar con los datos obtenidos en la necropsia y a partir de la historia clínica, pero existen reportes de casos clínicos con lesiones iguales a ésta enfermedad en los que se ha logrado el aislamiento de Cl. septicum, pero no se ha logrado demostrar la presencia de Cl. chauvoei. Además en los animales con varias horas de haber muerto y que presentan gas, es difícil los cambios post-mortem, de los producidos por las miositis clostridiales (35,38).

c) su amplia distribución; que permite se presenten con facilidad como contaminantes de la muestra (38).



Sin embargo, como son agentes patológicos potenciales, su hallazgo debe considerarse importante para estudios epidemiológicos y se aceptan muestras que para otro tipo de estudios no podrían considerarse en condiciones adecuadas (2).

#### 1.61 DIANOSTICO POR INMUNOFLUORESCENCIA.

De acuerdo a Sterne y Batty (38), la técnica de anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico de anticuerpos de clostridiasis, depende de la demostración de la pared celular de los clostridios, utilizando para ello anticuerpos específicos teñidos con un colorante fluorescente, mencionan que la técnica tiene las siguientes ventajas: ofrece un diagnóstico rápido y económico, en el cual las muestras se pueden tomar directamente del sujeto en el campo, no se deteriora durante el transporte, ni los números relativos de las bacterias varía y su eficacia no depende de los microorganismos de la muestra que se encuentren vivos, por lo que es posible emplear después de un tratamiento terapéutico. Tiene alta sensibilidad y los clostridios patógenos se pueden detectar en presencia de un alto contenido de microorganismos contaminantes.

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

#### 1.7 CONTROL Y TRATAMIENTO.

De acuerdo a Brander y Ellis (5), en la mayoría de los casos el control de enfermedades, puede ser llevado a cabo por un buen entendimiento de los métodos de diseminación de la enfermedad, la importancia del ambiente, y la relación entre el hombre y el animal en la situación de la enfermedad.

El control de las enfermedades causadas por clostridios difiere de cualquier otro tipo de enfermedad, en que puede ser prevenida por algún tipo de inmunógeno, vacuna ó antisueros (1,37.38). Sin por defectos de control de calidad, muchos de ellos ni siquiera son algo útiles, además en la práctica pueden "fallar" porque se empleó uno no adecuado para las condiciones clostridiales específicas en su región, debido a un diagnóstico erróneo ó bien porque se haya empleado uno en que la cadena fría se haya roto.

En México, Labradero y Hernández en 1979 (18), al evaluar la efectividad de cinco bacterinas comerciales contra carbón sintomático, de acuerdo a las normas oficiales establecidas por la Dirección General de Sanidad Animal de la S.A.R.H. (30), encontraron que un producto protegió únicamente al 23 % de los cuyos inmunizados en dos ocasiones y desafiados con una cepa, los biológicos restantes no confirieron ninguna protección.

Así mismo Baca (1), en su trabajo titulado "Elaboración de un Inmunógeno contra Clostridiasis en Animales (Carbón Sintomático y Edema Maligno) y Evaluación Comparativa de la Inmunogenicidad con los Productos Comerciales", Concluye que los productos no cumplen con los requisitos de potencia del manual de requerimientos mínimos para productos biológicos veterinarios de la S.A.R.H. Además señala que en la administración de la bacteria-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.

Es necesario recordar la importancia que tiene la necesidad de realizar un diagnóstico etiológico, para lograr controlar estas enfermedades, ya que como se mencionó anteriormente, aunque generalmente el agente causal de las gangrenas gaseosas es el Cl. chauvoei y el Cl. septicum, puede haber otros agentes

involucrados ó una combinación de más de uno de ellos y clínicamente es difícil diferenciarlos. Por lo que, una vez determinado el agente etiológico relacionado con el brote, se debe realizar una selección adecuada de los biológicos, para que esté de acuerdo a los tipos de bacterias presentes en la región donde se van a emplear, teniendo cuidado tanto en la conservación como en la aplicación de los biológicos para obtener una inmunidad duradera.

Knott y cols. (17), en un estudio de campo en el cuál utilizaron un solo lote de 9448 bovinos en sistema de engorda en corral, aplicaron la mitad de bacterinas-toxoides polivalentes, observaron que en los animales vacunados hubo 322 muertos, 47.3 % menos en comparación con los no vacunados (311) muertos, independientemente de la causa de muerte.<sup>1)</sup> Concluyeron que los clostridios fueron el factor que contribuyó más a las muertes de los animales no vacunados. Tuvieron un ahorro solo por mortalidad de 104,040 dólares americanos en dicho estudio.

En Inglaterra se ha visto (12), que las fórmulas polivalentes utilizadas no tienen efectos adversos en bovinos, sin embargo, en caprinos y menos en ovinos se puede presentar inflamación prolongada en la zona de aplicación, además en los caprinos el efecto inmunizante de éstos biológicos polivalentes es menor que en los ovinos.

En los Estados Unidos, dentro de las diferentes presentaciones que existen en el mercado (42), hay una bacterina-toxoide con los siguientes antígenos de: Cl. chauvoei, Cl. septicum, Cl. haemolyticum, Cl. novyi, Cl. sordellii, Cl. perfringens tipos C,D; Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida.

En México en general las bacterinas comerciales son dirigidas a proteger contra infecciones de: Cl. chauvoei y Cl. septicum, en las llamadas bacterinas dobles. Cl. chauvoei, Cl. septicum y Pasteurella multocida en las llamadas bacterinas triples.

Solo una bacterina-toxoide presenta a Cl. chauvoei, Cl. septicum y Pasteurella multocida.

Todas son cultivos formalinizados con adyuvantes de hidróxido de aluminio, oleosos ó bien registrados bajo un nombre comercial. Debido a las tres características epidemiológicas comunes de las clostridiasis (36) (diseminación universal, no transmisibilidad por contacto e incidencia esporádica); la cuarentena no es una medida práctica para el control. Esto es porque en general el suelo y el contenido intestinal de los animales son el habitat de

los agentes etiológicos. Lo que aunado a su alta distribución, las características de la esporulación de los gérmenes, hacen que éstas enfermedades sea resistentes.

#### 1.8 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Esta es una técnica de alta resolución para la separación de mezclas de proteínas u otros compuestos de elevado peso molecular. Al igual que en otros tipos de electroforesis la migración de las proteínas va a depender del tamaño, formas y cargas de las moléculas. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización del monómero de acrilamida y la N,N'-metilen-bis acrilamida, la que sirve de agente de entrecruzamiento (45).

Variando las cantidades de bis-acrilamida se obtienen geles con un rango de poro muy amplio.

El sistema más utilizado para la electroforesis es el sistema discontinuo de Laemmli 1970 (19), en el cual la separación se efectúa por diferencias en peso molecular. Si se añade al sistema dodecil sulfato de sodio (SDS), la carga original de cada

molécula se enmascara por el SDS y quedan todas las moléculas con carga negativa uniforme y al someterse a electroforesis se separan de acuerdo a su tamaño, actuando el gel como un tamiz.

Aunque las proteínas pueden ser separadas en su estado natural, generalmente se obtiene mejor resolución si los puentes disulfuro se reducen primero (por ejemplo con 2-Mercaptoetanol) (45), permitiendo así la separación de las cadenas polipeptídicas. La técnica de SDS-PAGE se utiliza frecuentemente para determinar el peso molecular de las proteínas por comparación de su movilidad relativa (Rf), con proteínas estándar de peso molecular conocido.

Estudios realizados anteriormente, han demostrado los perfiles electroforéticos en SDS-PAGE de las proteínas membranales de algunas bacterias (13,25,29). En dichos trabajos se han modificado la técnica de obtención de las proteínas, el agente solubilizante para éstas y las condiciones de corrimiento (14).

## 2.0 OBJETIVOS.

- 1.- Analizar el patrón electroforético de las proteínas que se encuentran en los extractos totales de diferentes cepas de Clostridium chauvoei y Clostridium septicum.
- 2.- Comparar dichos patrones electroforéticos y establecer proteínas comunes en las diferentes cepas y proteínas específicas para cada cepa.



### 3.0 MATERIAL Y METODOS.

#### 3.1 PREPARACION DE EXTRACTOS.

Para la obtención de los extractos totales de Clostridium chauvoei, se empleó una cepa utilizada en la producción de biológicos (314, donada por los laboratorios PRONABIVE); 3 cepas mantenidas en el laboratorio de Enfermedades Bacterianas de los Rumeantes del CENID\_Microbiología,; una cepa de desafío como cepa patron (donada por el laboratorio PRONABIVE); y dos cepas proporcionadas por el Dr. Maloy de la Universidad Estatal de Iowa (Iowa State University).

Las cepas de Clostridium septicum, utilizadas en éste trabajo fueron proporcionadas por el laboratorio PRONABIVE.

Para éste propósito, las cepas se conservaron en el medio de carne cocida (cooked Meat).

Una vez que se obtuvo el desarrollo de las cepas de Clostridium, se realizó la tinción de gram y pruebas bioquímicas como ureasa, citratos, indol, catalasa, lactosa, manitol. tal y como lo describe el manual de bacteriología de anaerobios, para confirmar la pureza del microorganismo (40,47).

MEDIO DE SMITH-HOLDEMAN.

TRIPTOSA	20.0 g
EXTRACTO DE LEVADURA	5.0 g
CISTEINA HCl	0.3 g
KH PO	0.5 g
2 4	
NaCl	2.5 g
H O	1000 ml.
2	

Estas cepas se sembraron en matraces Erlen-Mayer de 250 ml. que contenian 125 ml. del medio liquido de Smith-Holdeman (15) y se incubaron a 37 C por 48 horas en jarras Gas-Pack.

Posteriormente a el desarrollo de cada una de las cepas de Clostridium chauvoei y Clostridium septicum se les realizo una prueba de pureza que consistio en una tincion de gram.

Para la inactivacion se les anadio formalina ajustando a una concentracion final de 0.1 % v/v, manteniendose a 37 C por 18 horas (20).

Pasado el tiempo, se sedimentó la suspensión bacteriana en una centrifuga Beckman modelo J-6b a 5000 rpm. por 20 minutos. Una vez efectuada la centrifugación, se separaron los sobrenadantes por decantación y el paquete celular se trató de la siguiente manera;

AMORTIGUADOR DE LAEMMLI.

(Buffer de muestra)

TRIS-OH (hidroximetilamino-metano)	1.51 g
SDS (dodecil-sulfato de sodio)	2.0 g
Glicerol	25.0 g
Pironina	0.002 g
H O	100.0 ml.

2

Se tomaron 100 microlitros (mcl) del paquete celular de cada una de las cepas de Clostridium, depositandose en tubos Eppendorff perfectamente identificados, posteriormente se les agregó 100 mcl del amortiguador de Laemmli (13), mezclandose en un vortex. Se hierven a 100 C en baño maria por 7 minutos, transcurrido el tiempo se les agregó 20 mcl de 2-Mercaptoetanol, mezclandose en

vortex y sometiendo nuevamente a 100 C por 7 minutos mas en baño maria. Pasado éste tiempo se centrifugaron a 5000rpm por 10 minutos (13).

Se tomaron 50 mcl de cada uno de los sobrenadantes, depositandose en una serie de tubos de ensaye 12 X 100, a los que se les agregó 50 mcl de solución salina fisiológica (SSF) y 5.0 mililitros (ml) del reactivo de Bradford (4), se agitaron en vortex y se leyeron en un espectrofotómetro Beckman modelo 34, a 595 nanómetros (nm). Los resultados se interpolaron en una curva estandar previamente realizada, bajo las mismas condiciones utilizando como proteina estandar albúmina sérica bovina (4).

La preparación de la muestra para el corrimiento electroforético se realizó de la siguiente manera:

De los paquetes celulares del desarrollo de cada cepa de Clostridium, se transfirieron 100 mcl. de cada uno en tubos Eppendorff, posteriormente se les agregó 100 mcl de amortiguador de Laemmli (13) y se mezclaron en un vortex; se transfirieron a un baño maria, donde permanecieron a 100 C por 7 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se les agregó 2-Mercaptoetanol a una concentración final de 10 %, poniendose nuevamente en baño maria por 7 minutos mas.

Finalmente, las muestras se centrifugan a 5000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se utiliza para el corrimiento electroforético.

### 3.2 PERFILES ELECTROFORETICOS.

Se emplea un sistema de geles discontinuos de acuerdo al procedimiento de Laemmli 1970 (19).

Se prepararon las siguientes soluciones:

Acrilamida	Sol. al	30.0 %
Bis-acrilamida	Sol. al	0.8 %
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino (TEMED)	Sol. al	8.4 %
Persulfato de amonio	Sol. al	12.5 %
Dodecil-sulfato de sodio (SDS)	Sol. al	20.0 %.

BUFFER DE pH 8.8.

TRIS-OH            18.165 g    (1.5 M)

H O      cbp.      100 ml

2

(El pH se ajusta con HCl concentrado.)

BUFFER pH 6.8

TRIS-OH            6.055 g    ( 0.5 M)

SDS sol.al 20 %      2 ml

H O      cbp      100 ml

2

(El pH se ajusta con HCl concentrado.)

La cámara de electroforesis empleada en éste trabajo fué marca "Electrofor".

Primeramente se prepara un tapón (que es una capa dura) y sirve para sellar la base de la placa, la cual consiste:

TAPON.

Bis-acrilamida	1.0 ml.
Agua	0.5 ml.
TEMED	25.0 mcl.
Persulfato de amonio	50.0 mcl.

Se adiciona rápidamente la mezcla "tapón", sellando la base de las placas.

Ya polimerizado el tapón, el gel de separación se vierte a las placas de vidrio, guardando una pequeña cantidad para observar en que momento polimeriza.

GEL DE SEPARACION AL 12 %

Buffer pH 8.8	2.5 ml.
Acrilamida-bisacrilamida	3.77 ml.
Agua destilada	3.75 ml.
TEMED	50.0 mcl.
Persulfato de amonio	100.0 mcl.

Se adiciona la mezcla (gel concentrador) sobre el gel de separación con cuidado y rapidez, quedando una pequeña cantidad en el matraz, se coloca el peine, el cual se retira cuando el gel ha polimerizado, quedando de ésta forma pozos bien definidos.

#### GEL CONCENTRADOR.

Buffer pH 6.8	1.0 ml.
Acrilamida-bisacrilamida	0.66 ml.
Agua destilada	2.33 ml.
TEMED	20.0 mcl.
Persulfato de amonio	40.0 mcl.

#### CORRIMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Con la ayuda de una jeringa Hamilton o con una micropipeta, colocar el volumen necesario (preparado) de cada muestra para tener una concentración de proteína en los pozos del gel de concentración. Junto con las muestras problema, se corrieron pozos adyacentes de proteínas de peso molecular conocido con el fin de tomarlos de referencia y poder hacer el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas desconocidas presentes en las muestras. La electroforesis se corrió de 95 a 110 volts a tempe-



ratura ambiente, hasta el momento en que el colorante (pironina) que sirve de referencia, llega al final del gel de separación.

### 3.3 TINCION DE LOS GELES DE SDS-CON NEGRO DE AMIDO.

#### SOLUCION STOCK DE COLORANTE:

Negro de Amido al	0.1 %
-------------------	-------

#### SOLUCION DESTENIDORA:

Metanol	400.0 ml
Acido acético	100.0 ml
Agua	500.0 ml

#### SOLUCION HIDRATANTE:

Acido acético al	10.0 %
------------------	--------

Finalmente desensamblar los moldes (placas de vidrio) del gel cuidadosamente, y colocarlo en la solución teñidora por 30 minutos con agitación constante; por 24 horas en la misma solución sin agitación. Una vez que pasó éste tiempo, se sacó el gel y se colocó en la solución desteñidora, haciendo cambios

constantes hasta que el colorante del gel se eliminó y las bandas de proteínas se observaban perfectamente (aproximadamente 24 horas).

Posteriormente se transfirió a la solución hidratante.

#### 3.4 CURVA PATRON DE MOVILIDAD RELATIVA DE PROTEINAS.

En cada gel se incluyeron los siguientes marcadores de peso molecular:

Miosina (cadena pesada) 200.0 KD; fosforilasa B 97.4 KD; albúmina sérica bovina 68.0 KD; ovoalbúmina 43.0 KD; lisozima 14.3 KD.

Previamente se deberá construir una curva patrón que muestre la relación entre los logaritmos naturales de los pesos moleculares de los marcadores de peso molecular (eje de las Y); y la movilidad relativa de las proteínas estándar en el gel de poliacrilamida (eje de las X). Esta relación es directamente proporcional y por tanto debe formar una línea recta, la cuál debe ser ajustada mediante el tratamiento matemático de mínimos cuadrados y a través de regresión lineal, determinar los valores de "Y" de las muestras desconocidas.

X = Rf de los marcadores de peso molecular (MPM).

Y = Logaritmo Natural del peso molecular de los MPM.

Donde:

Rf = Coeficiente de movilidad relativa.

#### CALCULO DE COEFICIENTE DE MOVILIDAD RELATIVA.

La movilidad relativa de las proteínas contenidas en las muestras, es el desplazamiento que tienen con respecto a la distancia total que corre la muestra, dato que se obtiene con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{corrimiento de los MPM (bandas) (cm)}}{\text{corrida de la muestra}}$$

#### 4.0 RESULTADOS.

##### 4.1 IDENTIFICACION.

Los resultados de las pruebas realizadas para la identificación de las cepas de Clostridium se resumen en el cuadro No. 3.

Las pruebas de identificación del microorganismo se realizaron continuamente a lo largo de todo el trabajo, verificando así la pureza de los cultivos de Clostridium utilizados.

El paquete fué tratado como se describió en la metodología y la concentración proteica se determinó por el método de Bradford, para lo cuál fué necesario realizar una curva estandar. Dicha curva se muestra en el cuadro No. 8.

Los resultados del contenido proteico de las diferentes cepas de Clostridium empleadas en este trabajo, se resumen en el cuadro No. 9.

### CUADRO 8

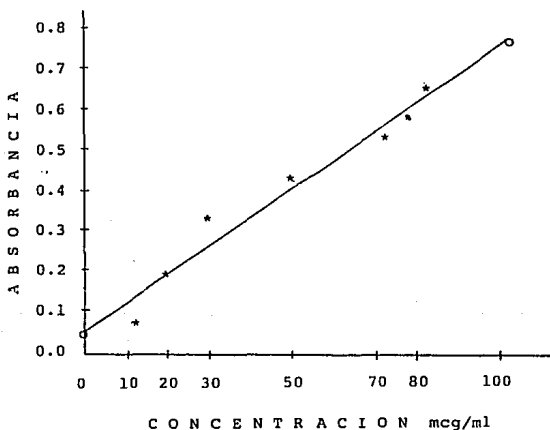
Valores para la curva de Proteína (  $k = 595$  ). Cálculos siguiendo la metodología de Bradford, utilizando Albúmina Sérica Bovina como Proteína ( figura 1 ). Regresión lineal. Correlación: 0.9844,  
-3  
 $m = 7.6209 \times 10^{-3}$  ,  $b = 0.0692$ .

CONCENTRACION PROTEICA mcg/ml	ABSORBANCIA
10	0.0879
20	0.199
30	0.367
50	0.474
70	0.570
80	0.692
100	0.798

**FIGURA 1**

Curva patrón de proteínas. Elaborada con base a los datos mostrados en el cuadro No. 8. Los datos experimentales fueron ajustados con regresión lineal:

Regresión =  $0.9844$ ,  $m = 7.6309 \times 10^{-3}$ ,  $b = 0.06192$ , usando albúmina sérica bovina como proteína estandar. ( $k = 595\text{nm}$ ).



\* Resultados experimentales.

o Resultados ajustados con regresión lineal.

CUADRO 9

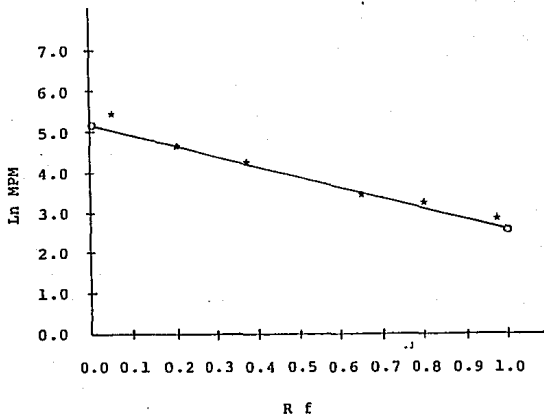
RESULTADOS DEL CONTENIDO PROTEICO DE LAS CEPAS DE  
CLOSTRIDIUM UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.

CEPAS DE CLOSTRIDIUM		CONCENTRACION PROTEICA
Cepa	<u>Cl. chauvoel</u> : mantenida en laboratorio	7.3583
Cepa	<u>Cl. septium</u> : lab.	11.9509
Cepa	<u>Cl. septicum</u> : prod. biol.	12.8694
Cepa	<u>Cl. septicum</u> : patron	20.7424
Cepa	<u>Cl. chauvoel</u> : Prod. Biol.	73.8855
Cepa	<u>Cl. chauvoel</u> : mantenida en laboratorio	6.5710
Cepa	<u>Cl. chauvoel</u> : Prod. Biol.	36.6510
Cepa	<u>Cl. chauvoel</u> : mantenida en laboratorio	6.8704
Cepa	<u>Cl. chauvoel</u> : patrón	93.5681

**FIGURA 2**

Curva patrón de pesos moleculares, elaborada con base en los datos mostrados en el cuadro No. 10. Los datos experimentales fueron ajustados con regresión lineal:

Regresión = 0.98,  $m = -2.47$ ,  $b = 5.3$ .





#### 4.2 TRATAMIENTO DEL PAQUETE CELULAR. .,

Como ya se mencionó anteriormente, el agente solubilizante empleado en éste trabajo fué SDS al 10 %, lo cuál fué efectivo, ya que la solubilización del paquete fué casi total. La pequeña cantidad que no se solubilizó después del calentamiento, se separó por centrifugación, siendo empleada la fracción que se solubilizó (sobrenadante), para el corrimiento electroforético.

#### 4.3 PERFILES ELECTROFORETICOS DE LAS CEPAS DE Clostridium.

Para dicho trabajo, fué necesario ensayar diversas concentraciones del gel de poliacrilamida, que varió del 5 % hasta el 12 %, siendo éste último en el que el patrón electroforético quedó mejor definido.

Los coeficientes de movilidad relativa (Rf) de los marcadores de peso molecular, se muestran en el cuadro No. 10; y la curva que los define se presenta en la figura No. 2.

Los resultados de las bandas de la estimación de los pesos moleculares de las cepas de Clostridium utilizadas, se muestran en la figura No.3.

**CUADRO 10**

**VALORES DE LOS COEFICIENTES DE MOVILIDAD RELATIVA (Rf) Y**

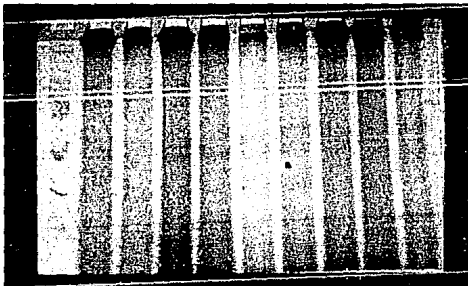
**LOGARTIMO NATURAL DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS**

**PATRON.**

<b>PROTEINA</b>	<b>PM (Kd)</b>	<b>Ln Pm</b>	<b>Rf</b>
Miosina	200.00	5.3	0.083
Fosforilasa B	97.40	4.6	0.20
Alb. Sér. Bov.	68.00	4.2	0.43
Ovoalbúmina	43.00	3.7	0.65
Chimotripsinógeno	25.70	3.2	0.87
Lactobulína	18.40	2.9	0.97

**FIGURA 3**

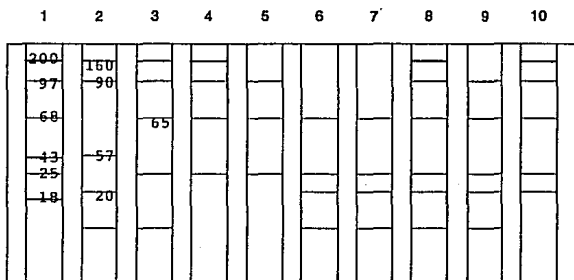
Patrón electroforético de los extractos totales de Clostridium chauvoei y Clostridium septicum.



- 1.- MPM: Miosina, Fosforilasa B, Albumina Sérica Bovina, Ovoalbúmina,Chimotripsinogeno, Lactolobulina.
- 2.-Cl. chauvoei: cepa patrón.
- 3.-Cl. chauvoei: cepa mantenida en el laboratorio.
- 4.-Cl. chauvoei: cepa mantenida en el laboratorio.
- 5.-Cl. chauvoei: cepa mantenida en el laboratorio.
- 6.-Cl. chauvoei: cepa utilizada en la produc. de biológicos.
- 7.-Cl. chauvoei: cepa de desafío ó patrón.
- 8.-Cl. septicum: cepa utilizada en la produc. de biológicos.
- 9.-Cl. septicum: cepa de desafío ó patrón.
- 10.Cl. septicum: cepa mantenida en el laboratorio.

FIGURA 4

DIAGRAMA QUE REPRODUCE TODAS LAS BANDAS QUE SE REPRESENTARON EN EL PATRON DE PROTEINAS DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE CLOSTRIDIUM UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.



## 5.0 DISCUSION.

Los microorganismos pueden presentar cambios ó alteraciones de origen genético ó no genético; esto es, las bacterias por sí mismas desarrollan mutaciones en forma espontánea, sin contar con las que presentan dicho cambio a nivel de la estructura de DNA cromosómico ó por adquisición de DNA extracromosómico.

Se ha encontrado que las cepas de Clostridium aunque se localizan en una misma zona geográfica, pueden presentar una diversidad antigénica, la cual se observa bajo ciertas condiciones (23).

Los trabajos realizados por Labrandero y Hernández en 1979 (18), al evaluar la efectividad de cinco bacterinas comerciales que contenían Clostridium chauvoei, reportan que la máxima protección conferida fué del 23 %; por lo tanto ninguna de las bacterinas probadas cumple con los requisitos mínimos de potencia exigidos por el Departamento de Control de Productos Biológicos, Farmacéutico, Alimenticios y Equipos para Animales, de la Subsecretaría de Ganadería, Dirección General de Sanidad Animal (30).

Paralelamente Bojorquez 1979 (3), realiza un estudio de nuevos inmunógenos contra carbón sintomático y obtiene un 60 % de protección con una bacterina elaborada a partir de células lavadas de Clostridium chauvoei; la bacterina-toxoide protegió en un 20 % y el toxoide no protegió,

Posteriormente Baca en su trabajo en 1987 (1), evaluó cuatro productos comerciales de bacterinas triples que contenían: Cl. chauvoei, Cl. septicum y Pausterella sp; bacterinas dobles: Cl. chauvoei y Cl. septicum, encontrando a casi 10 años de trabajo publicado por Labranderos (1), que los resultados muestran semejanza entre ambos ya que no hubo una adecuada protección.

En el mismo trabajo de Baca 1987 (1), se elaboró un inmunógeno contra carbón sintomático con cepas de Cl. chauvoei y Cl. septicum, encontrándose que la bacterina protegió en un 60 %, la bacterina-toxoide en un 20 % y el toxoide no confirió ninguna protección.

Las cepas empleadas en ésta investigación, tuvieron un desarrollo de 48 horas, observándose que no todas tenían el mismo crecimiento, lo que nos conduce a corroborar que existen cepas estrictamente anaerobias y fastidiosas.

También se determinó que la concentración proteica varía entre cepa y cepa.

Con respecto al corrimiento electroforético, fué necesario ajustar las condiciones mediante ensayos previos, desde probar la concentración del gel, hasta las cantidades adecuadas de muestra para el corrimiento.

En la figura No. 3 se muestra el corrimiento electroforético de las cepas de Cl. chauvoei y de Cl. septicum analizadas en éste trabajo y en la cuál se logra observar diferentes bandas. Todos los carriles mantienen bandas en común de bajo peso molecular que se encuentran entre 40 y 50 KD. de peso molecular. Sin embargo la misma figura 3, muestra que hay una banda que no es común a todas que se encuentra entre 160 y 150 KD. de peso molecular, lo cuál nos podría sugerir que hay diferencias antigénicas entre cepas de Cl. chauvoei mantenidas en el laboratorio y cepas de Cl. chauvoei utilizadas en la producción de biológicos y por lo tanto podemos especular que ésta podría ser una de las múltiples causas por las cuales los biológicos comerciales no protegen adecuadamente.

Cabe señalar que éste es uno de los primeros trabajos realizados en México, que por medio de geles de poliacrilamida se analizó el perfil electroforético de diferentes cepas de Cl. chauvoei y así poder determinar las diferencias entre las dichas cepas.

No obstante que en éste trabajo no se utilizaron cepas de casos clínicos, Ramírez 1991 (28) sugiere que se requieren estudios epidemiológicos en áreas geográficas pequeñas para poder contar con muestras representativas de los problemas, esto es, con pocas horas de haber muerto ó enfermos, con el fin de evitar contaminaciones postmortem, y de ésta forma aclarar la importancia de Cl. chauvoei y Cl. septicum productores de miositis.

Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos y aunados a los que Baca (1) en 1987 reportó, Cl. septicum, no presentó diferencia en el corrimiento electroforético y en la evaluación de las bacterinas confiere un 100 % de protección, lo cuál nos conduce a inferir que ésta especie es muy similar entre cepa y cepa; sin embargo los resultados de Cl. chauvoei muestran ésta diferencia.

Por último, se puede decir que es posible, que de ésta investigación se tome en consideración sus resultados para trabajos posteriores, en los que consecuentemente, con la ayuda de la inmunotransferencia con sueros hiperinmunes ó sueros de animales



infectados, se logre determinar la banda de diferencia existente en el análisis electroforético de las cepas de Cl. chauvoei y poder lograr de ésta forma que los biológicos elaborados mejoren en su protección, ya que como se mencionó anteriormente, ésta puede ser una de las múltiples causas por la cual los biológicos que contienen Cl. chauvoei no protegen adecuadamente.

## 6.0 CONCLUSIONES

- 1.- Se encontró que la cepa de Clostridium chauvoei utilizada en la producción de biológicos, presenta diferencia en una proteína de elevado peso molecular (150-160 KD.).
- 2.- Las cepas de Clostridium septicum analizadas no presentan ninguna diferencia en sus patrones proteicos, ya que ésta especie es muy similar entre cepa y cepa.
- 3.- La inmunidad contra Clostridiasis depende de la patogenicidad de la especie.
- 4.- Para aumentar la protección de los productos biológicos elaborados contra carbón sintomático y edema maligno hay que separar la bacteria de su medio de cultivo para poderla administrar como inmunógeno.

## 7.0 RECOMENDACIONES

- 1.- Revisar periódicamente los métodos de producción y la calidad de los productos biológicos comerciales que se distribuyen contra éstas enfermedades en México.
- 2.- Evaluar constantemente la incidencia de la enfermedad.
- 3.- Se sugiere utilizar cepas de Clostridium en la elaboración de productos biológicos contra éstas enfermedades (carbón sintomático y edema maligno) involucradas en la zona geográfica afectada.

## 8.0 BIBLIOGRAFIA.

1.-Baca, R.A.:Elaboración de un inmunógeno contra clostridiasis en animales (carbón sintomático y edema maligno) y evaluación comparativa de la inmunogenicidad con los productos comerciales. Tesis de Licenciatura. FES-C. UNAM. (1987).

2.-Berkhoff, G.A. and Redenberg, J.D.:Isolation and identification of anaerobes in the veterinary diagnostic laboratory. Am. J. Vet. Res. 38: 1069-1074 (1977).

3.-Bojórquez, N.L.:Investigación de nuevos inmunógenos contra carbón sintomático. Reunión Anual del Area Médica. (INIP). SARH. Dic. (1979).

4.-Bradford, M.N.:A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976).

5.-Brander, C.G. and Ellis, P.R.:The control the disease. Animal and human healt. Baillere and Tindal. London (1977).

6.-Brewer, J.H. and Alleir, D.L.:Disponible hidrogen generator. Science 147: 1033-1034 (1965).

7.-Claus, K.D. and Kolbe, D.R.:Immunogenicity of Clostridium septicum in guinea pigs. Am. J. Vet. Res. 40, 12: 1752-1756 (1965).

8.-Cottral, E.G.:Manual of standardized methods for veterinary microbiology. Cornell University Press. Ithaca (1978).

9.-Duncan, I.F.:Liver biopsy and black diseases in a sheep. Aust. Vet. J. 61, 8: 272-273 (1984).

10.-Gibbons, Medicina y cirugía de los bovinos. La Prensa Mexicana. (1970).

11.-Glastonbury, J.R.W. et. al.:Clostridial miocarditis in lambs. Aust. Vet. J. 65, 7: 208-209 (1988).

12.-Green, D.S. et al.:Injection onsite reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. Vet. Rec. 120, 18: 435-439 (1987).

13.-Helfman, D.M. and Hughes, S.H.:Use of antibodies to screen cDNA expression libraries prepared in plasmid vectors. Methods in Enzimology. 12: 451-457 (1989).

14.-Hearing, V.J.:Molecular weigh stimation of triton X-100, solubilized proteins by poliacrilamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 72: 113-117 (1976).

15.-Holdeman, L.V.:Anaerobe laboratory manual. 4th. Ed. V. p. Politechnic Institute and State University. Blaksburg, Virginia (1997).

16.-Jensen, R. and Brinton, L.S.:Diseases of sheep. 2nd. Ed. Lae & Febiger Edition. Philadelphia, USA. (1978).

17.-Knott, K.L; Erwin, G.G.; Classick, L.J.:Benefints of a clostridial vaccination program in feetlot catte. Vet. Med. 80, 6: 95-97 (1985).

18.-Labrandero, E. y Hernández, O.:Evaluación de cinco bacterinas comerciales contra Clostridium chauvoei . Resúmenes de la Reunión Anual. Sección Area Médica. INIP. SARH. pp48. México, D.F. (1979).

19.-Laemmli, U.K. (1970).:Citado por Mayer, R.J. and Walker, J.H.:Sodium- dodecil sulphate poliacrilamida gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252, 1102-1106 (1977).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 20.-Lozano, E.A.:Inactivation of Clostridium haemolyticum toxic fluids and their antigenicity. Can. J. Comp. Med. 41: 188-194 (1977).
- 21.-Malone, F.E.; Mc Parland, P.S.; O'Hagan, J.:Pathological Changes in the pericardium and meninges of catte associated with Clostridium chauvoei. Vet. Rec. 118, 6: 151-152 (1986).
- 22.-Mc Intosh, J. and Fildes, P.:Citado por Smith, L.DS.:The patogenic anaerobic bacteria. 2nd. Ed. Butterworths. London (1977).
- 23.-Mussa, R.S.:Antigenic formulae for Clostridium chauvoei. J. Path. and Bacteriol. 77: 341-350 (1959).
- 24.-Nerving, R.M.; Maloy, S.E.;Claus, K.D. and Kolbe, D.R.: Clostridium septicum infection in cattle in the United State. J. Am. Vet. Med. Ass. 1979. 5: 579 (1981).
- 25.-Nicolet, J. and Krawinkler, M.:Poliacrilamide electrophoresis of whole-cell proteins of porcine strais of Haemophilus. Int. J.Sys. Bact. 30: 1 (1980).

26.-Ontiveros, C.L.:Memorias del congreso de Buiatria.  
CENID-Microbiología. SARH. Ver., México (1991).

27.-Piojan, P. y Tortora, J.:Principales enfermedades de los  
ovinos y caprinos. UNAM. México. Cuautitlan Izcalli (1986).

28.-Ramírez, P.C.:Aislamiento e identificación de clostridios  
productores de miositis en el noreste de México. Tesis  
Profesional de Maestría. UNAM. México (1991).

29.-Rapp, V.J.; Munson, R.S. and Ross, R.F.:Outer membrane  
proteins profiles of H. pleuroneumoniae. Inf. Imm. 52, 2: 414-420  
(1986).

30.-Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos:  
Requerimientos mínimos de calidad que deberan llenar los  
productos para uso veterinario. Dirección General de Sanidad  
Animal. México, D.F. (1971).

31.-Seifert, H.S.H.; Bohnel, H.; Bonje.; Ebrech, A.; Kuenheim,  
U. Wech.:A new method for differentiating patogenic anaerobes.  
Animal Research and Development. 12: 88-107 (1980).



32.-Seifert, H.S.H. and Bohnel, H. Ranaivoson.: Profilaxis of anaerobic infections of ruminants in Madagascar by the intradermal application of ultrafiltered toxoids from local strains of clostridia. Animal Research and Development. 19: 67-82 (1984).

33.-Smith, H.A. and Jones, T.C.: Patología veterinaria. Ed. UTHEA. S.A. de C.V. México, D.F. (1980).

34.-Smith, L.D.S. and Holdeman, L.V.: The pathogenic anaerobe bacteria. Charles C. Thomas. Springfield, III (1968).

35.-Smith, L.D.S. and Holdeman, L.V.: The pathogenic anaerobe bacteria. Charles C. Thomas. 2nd. Ed. Springfield, III (1975).

36.-Starmartin, N. and Ungureanu, C.: Epizootiologic des clostridiasis. Bull. Off. Int. Epizoot. tomo 67: 1283-1292 (1977).

37.-Sterne, M.: Clostridia infection. Br. Vet. J. 137, 5: 443-453 (1981).

38.-Sterne, M. and Batty, I.: Pathogenic clostridia. Butterworths. London (1975).

39.-Sterne, M. and Warrack, G.H.:Citado por Smith, L.DS. and Holdeman, L.V.:The patogenic anaerobe<sup>a</sup> bacteria. Charles C. Thomas. 2nd. Ed. Springfiel, III (1975).

40.-Sutter, V.L.; Citron, D.M.; Edelstein, M.A.C. and Finegold, S.M.:Wadsworth anaerobic bactoriology manual. 4th. Ed. Star Publishing Company. UCLA. USA: (1978).

41.-Thompson, R.V.; Batty, I.; Thompson, A.; Kerry, J.B.; Epps, B.H.G.; Citado por Smith , L. DS. and Holdeman, L.V.:The patogenic anaerobic bacteria. 2nd. Ed. Charles C. Thomas. Springfiel III (1975).

42.-United States Departament of Agriculture: Veterinary biologic products. Licenses and Permittees. Veterinary Services. Hyattsville, Md. (1985).

43.-Vargas, L.J. Citado por Bojórquez, N.L.:Pierna negra y edema maligno. XIV Reunion Anual Sección Trópico. Jal. Ver. Imprenta Arana. pp 78-83 México, D.F. (1977).

44.-Vilchis, M.C; Susana, M.; rosales, B.C.; Aguilar, S.A.; Vargas, L.J.; Peña, M.I.; Jorge, G.M. y Batalla, C.D.: Estudio epizootiológico de la rinotraqueitis infecciosa bovina en ganado productor de leche y productor de carne. Técnica Pecuaria en México. 49: 106-115 (1985).

45.-Weber, K. and Osborn, I.M.: The reability of molecular weight determination by dodecil-sufate-poliacrilamide.gel electrophoresis. J. of Biological Chemistry. 224:4406-4412 (1969).

46.-Williams, B.M.: Clostridial miositis in casttle. Bacteriology and gross pathology. Vet. Rec. 100. 5: 90-91 (1977).

47.-Willis, A.T.: Anaerobic bacteriology: Clinical and laboratory practice. 3rd. Ed. Butterworths. London (1977)