

11680



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN
COORDINACION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CLONACION DE ANTIGENOS DE
Clostridium chauvoei

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
(MICROBIOLOGIA)
P R E S E N T A :
MA. DE LOURDES ONTIVEROS CORPUS

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALVARO AGUILAR SETIEN

ASESORES: DR. VICTOR R. TENORIO GUTIERREZ
DRA. MIREYA G. DE LA GARZA AMAYA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

[Faint handwritten text, possibly a signature or date]

La vida no se agota, se renueva. El fin de un camino Es el comienzo de otro y así los ciclos se van sucediendo desde siempre. No temamos al cambio. La evolución es inevitable y en el crecimiento propio ésta la clave para alcanzar muchos más sueños.

Agradecimientos:

El universo solo tiene sentido cuando tenemos con quién compartir nuestras emociones.

a) Por crearme y formarme por darme todo su amor.
María Corpus Cruz. y Jesús Ontiveros Pérez.

b) Porque nos sentimos más unidos.
Estela, José, Irene, Jesús, Reina, Mario, Ismael, Isabel, Ricardo, Víctor, Silvia, José L. y Claudia.

c) Con la ternura con que me han llenado de amor.
Cristian, Daniela, Pepe, Yajaira, Ismael, Josué, Karen, Araceli, Carmina e Israel.

e) A mis amigos por haber estado, por estar, siempre conmigo.

Isaura Carolina†, Laurita, Víctor, Susy, Pedro, Arcelia, Marco Antonio, Bety, Efrén, Francisco A, Dra. Camila, Dr. Antonio, Arturo, Jorge A, Andrés, Jesús, Pilar, José Luis, Frida, Lula, Isa, Tere, Lourdes, Idalia.

A mis Asesores y comité Tutorial.

Dr. Víctor R. Tenorio, Dra. Mireya de la Garza, Dr. Francisco Suárez, Dr. Jorge Tórtora, Dra. Susana Mendoza, Dr. Andrés Rojas, y al Dr. Álvaro Aguilar Setién.
Mil gracias por sus valiosos comentarios por su apoyo y confianza.

INDICE	Página
1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
3.1 Características generales	3
3.2 Enfermedades producidas por <i>Clostridium</i>	3
3.3 Morfología colonial	4
3.4 Patogenia y cuadro clínico	6
4. Antecedentes	9
4.1 Bacterinas comerciales	10
4.2 Antígenos de <i>C. chauvoei</i>	12
5. Justificación	16
6. Objetivos	17
6.1 Objetivo principal	17
6.2 Objetivos particulares	17
7. Metas	18
8. Material y métodos	19
8.1 Cepas bacterianas	19
8.2 Medios de cultivo	20
8.3 Producción de bacterina experimental	20
8.4 Obtención de esporas de <i>C. chauvoei</i>	20
8.5 Determinación de la dosis letal 100% (DL100)	21
8.6 Prueba de potencia	21
8.7 Obtención de extractos crudos de <i>C. chauvoei</i>	22
8.8 Obtención de proteínas totales de <i>C. Chauvoei</i>	22
8.9 Método para la recuperación cuantitativa de las proteínas unidas a compuestos orgánicos	22
9. Cuantificación de proteínas	23
9.1 Obtención de sueros hiperinmunes	23
9.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)	24
9.3 Preparación de la muestra	24
9.4 Preparación de geles (PAGE-SDS) y corrimiento electroforético	24
9.5 Tinción de geles de poliacrilamida	25
9.6 Semipurificación de proteínas de membrana de <i>C. chauvoei</i> por membranas de Amicón	26
9.7 Protección conferidas por proteínas de <i>C. chauvoei</i>	26
10. Obtención de ADN cromosómico de <i>C. chauvoei</i>	27
10.1 Obtención de fragmentos de ADN cromosómico	27
10.2 Obtención del plásmido vector	28
10.3 Restricción del plásmido	28
10.4 Electroforesis de ADN	28

10.3 Restricción del plásmido	28
10.4 Electroforesis de ADN	28
10.5 Ligación	29
10.6 Obtención de células competentes	29
10.7 Transformación	29
10.8 Tamizado del banco de genes de <i>C. chauvoei</i>	30
10.9 Caracterización de los antígenos por medio de geles de poliacrilamida e inmunotransferencia	31
11. Determinación de la protección conferida en cuyos por las proteínas recombinantes	32
12. Resultados	33
12.1 Obtención de cepas bacterianas	33
12.2 Determinación de la dosis letal 100% (DL100)	33
12.3 Prueba de potencia	33
12.4 Producción de sueros hiperinmunes contra <i>C. chauvoei</i>	37
12.5 PAGE-SDS proteínas de membrana de <i>C. chauvoei</i>	37
12.6 Inmunotransferencia	37
12.7 Prueba de protección	37
12.8 Extracción de ADN cromosómico	37
12.9 Obtención de ADN de plásmido	38
13. Cuantificación de ADN de <i>C. chauvoei</i>	41
13.1 Obtención de fragmentos de ADN cromosómico	41
13.2 Obtención de vector restringido	41
13.3 Ligación de los fragmentos de ADN cromosómico y de pBluescript	44
13.4 Selección de transformantes con pBluescript	44
13.5 Tamizado de las clonas recombinantes	44
13.6 Electroforesis e inmunotransferencia	48
13.7 Determinación de la protección conferida en cuyos por las proteínas recombinantes	48
14. Discusión	51
15. Conclusiones	54
16. Bibliografía	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	34
Figura 2	35
Figura 3	36
Figura 4	39
Figura 5	40
Figura 6	42
Figura 7	43
Figura 8	45
Figura 9	46
Figura 10	47
Figura 11	49
Figura 12	50

1. RESUMEN

Las enfermedades causadas por *Clostridium spp.* son de gran importancia en nuestro país. El no contar con biológicos de alta calidad ha llevado a que el número de brotes aumente, por lo que el objetivo del trabajo fue determinar cuales eran los antígenos de *Clostridium chauvoei*, que se reconocieran principalmente por el sistema inmune de los animales, para ser clonados en *Escherichia coli*, así como conocer la capacidad inmunogénica de estos antígenos. Se trabajo con proteínas de membrana que en la prueba de inmunotransferencia reconocían principalmente bandas proteicas de 36, 46, 78, 120, 135, 156 kDa con sueros hiperinmunes contra *Clostridium chauvoei*. En la prueba de potencia en cuyes con la bacterina experimental se obtuvo una protección de un 60%, en los cuyes inoculados con proteínas de membrana de 156 kDa un 80% de protección. En este trabajo se clonó una proteína inmunogénicas de *Clostridium chauvoei* de 156 kDa utilizando el vector de clonación pBluescript. Se obtuvieron 220 clonas que contenían plásmidos con insertos de *Clostridium chauvoei*, por tamizado inmunológico, se seleccionaron 6 clonas que expresan antígenos de *Clostridium chauvoei*. Con base a los resultados obtenidos, se observó que las clonas 550 y 220 fueron identificadas como las que expresaban la proteína de 156 kDa que era reconocida con mayor intensidad por el suero hiperimune. Con la finalidad de conocer si las clonas recombinantes se pudieran utilizar como un inmunógeno contra carbón sintomático se realizó una prueba de potencia en cuyes protegiendo en un 80% al momento del desafío. Estas clonas pueden ser candidatos para la elaboración de una vacuna contra carbón sintomático, o bien pueden reforzar las bacterinas comerciales existentes.

2. ABSTRACT

Diseases in livestock caused by *Clostridium* spp are very important in Mexico. There are not vaccines of good quality, by this reason some outbreaks have appeared. The objective of this work was to determine *Clostridium chauvoei* (*C. chauvoei*) antigens, which were recognized by animal immune system, besides these antigens were cloned in *Escherichia coli*. Other purpose was to study the protective immunogenic capacity of he the antigens. In the immunoblotting with membrane protein were recognized bands of 36, 46, 78, 120, 135, 156 kDa with hyperimmune sera against *Clostridium chauvoei*. Protection assays were performed by challenging lots of guinea pigs immunized with experimental vaccine and membrane proteins. The results obtained showed that the experimental vaccine protected 60% of vaccinated guinea pigs and 80% of vaccinated with membrane proteins. One 156 kDa immunogenic protein of *Clostridium chauvoei* was cloned, using pBluescrip as a vector, 220 clones were obtained which had plasmids with *C. chauvoei* inserted; by immunologic screen were selected 6 clones that showed *C. chauvoei* antigens. The results obtained showed that clones 550 and 220 expressed the 156 kDa protein which was recognized by hyperimmune sera. In the protection assays in guinea pigs immunized with recombinant clones, the results obtained showed 80% of protection. These clones can be candidates to elaborate a vaccine against blackleg.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Características generales

Los integrantes del género *Clostridium* son bacilos anaerobios, gram-positivos, formadores de esporas, que en su mayor parte llevan en la naturaleza una existencia saprofita. Su habitat natural es el suelo y el aparato gastrointestinal del hombre y los animales, formando parte de la microbiota normal. Más de 300 especies han sido descritas y menos de una tercera parte de éstas ha sido estudiada (Willis 1979, Lennete 1980, Holt 1984, Petit. L., y col., 1999).

Algunos clostridios aerotolerantes pueden desarrollarse en medios de cultivo sólidos frescos bajo condiciones anaerobias, por lo cual se podrían confundir con algunas especies de *Bacillus* facultativos. Sin embargo, todos los miembros del género *Clostridium* forman esporas en condiciones anaerobias, pero la posición de la spora es variable. La mayoría de las especies son móviles gracias a flagelos peritricos, comúnmente no producen catalasa, mientras que los miembros del género *Bacillus* son catalasa positivos y no producen esporas en atmósfera anaerobia (Meynell 1965, Smith y Holdeman 1975, Sternee 1981).

Los *clostridium* existen en una relación simbiótica con el huésped, al 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 o destruir tejidos cuando la piel y las mucosas resultan comprometidas por cirugía, traumatismo o tumor y cuando los potenciales de oxido-reducción se reducen por isquemia, necrosis o infección, ocasionando así diversos procesos patológicos (Takeuchi, y col., 1997. Uzal y col., 2003).

3.2 Enfermedades producidas por clostridios

Las enfermedades producidas por los clostridios pueden dividirse en toxigénicas (*Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*) e histotóxicas (todas las especies del grupo de la gangrena gaseosa). Es importante resaltar que

no todas las especies de clostridios son patógenos en realidad, sólo una pequeña minoría son capaces de producir enfermedad; así los clostridios patógenos pueden ser subdivididos en tres grupos más o menos bien definidos. (Roth y col., 1995).

1) Clostridios exotóxicos. Se caracterizan por producir toxinas de gran potencia; estas toxinas son las responsables de producir la enfermedad y eventualmente la muerte, sin embargo, la bacteria en sí no es invasiva. Ejemplos de éste grupo son *Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*.

2) Clostridios invasivos de origen traumático. Este grupo incluye todos los agentes de la gangrena gaseosa del ser humano y la mayoría de dichos agentes en los animales. Sus 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 y atacan directamente al músculo con una actividad necrosante; esta diferencia le permite a estas especies ser invasivas, ya que sus toxinas van necrosando el tejido, permitiéndole de esta manera invadir estos tejidos. (Petit y col., 1990, Rood, J. 1998, Ballard y col., 1992).

3) Clostridios invasivos y de origen digestivo. Estos clostridios sólo se han demostrado de manera concluyente en animales y presentan la patogenia menos comprendida. Este grupo está representado principalmente por *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum* y algunos serotipos de *Clostridium perfringens*. En este caso las bacterias no entran a través de heridas, sino por vía oral; pasan por una fase de reproducción intestinal y por un mecanismo desconocido se trasladan a través de la sangre a sus tejidos blanco, en donde se reproducen y elaboran sus toxinas que producen la lesión (Miller y Kaper 1994, Cortiñas y col., 1998, Upadhye, A.S. y Venkatesha 2003).

3.3 Morfología colonial

Clostridium chauvoei y *Clostridium septicum* estos dos microorganismos son muy similares en sus características. Son bacilos de 3-8 X 0.6 µm con lados

paralelos y las puntas redondas. Tienen formas filamentosas, son gram positivos en cultivos jóvenes. Las esporas son ovaes y subterminales representando un limón.

Las colonias de *C. chauvoei* son pequeñas 1-2 mm de diámetro después de 48 hrs de incubación, irregulares, brillantes y semitransparentes, observándose una ligera hemólisis cuando se desarrolla en agar sangre de carnero. *C. septicum* presenta colonias pequeñas 1-2 mm de diámetro a las 24 hrs después de 48 hrs de incubación presenta un crecimiento rizoidal y se extiende por toda la superficie de la caja, presenta una B hemólisis en agar sangre de caballo.(Wong. G.A. y Roth. F., 2003).

Clostridium chauvoei y *Clostridium septicum* se diferencian por la fermentación de carbohidratos:

	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sucrosa	Salicin	H ₂ S	Indol
<i>C. chauvoei</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>C. septicum</i>	+	+	+	-	+	+	-

Los productos metabólicos producidos son: ácido acético, butírico y en menor cantidad fórmico. (Manual Bergery's). También se lleva a cabo la diferenciación con anticuerpos fluorescentes contra *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum*. (Holt 1984, Guzmán y Micalizzi 1992.).

Clostridium chauvoei y *Clostridium septicum*, producen una α -toxina que es

hemolítica y necrosante, la cual es oxígeno-estable, una β -toxina que tiene una actividad de desoxiribonucleasa, una γ -toxina que es hialuronidasa y una hemolisina oxígeno-lábil que es la δ -toxina. (Tamura, Y., y col 1992, Ballard y col., 1992, Cortiñas y col., 1998). Sin embargo la antitoxina de *C. septicum* proporciona protección homologa contra intoxicaciones por *C. chauvoei*. La antitoxina de *C. chauvoei*, no protege contra la toxina de *C. septicum*.

Es importante hacer resaltar el hecho de que el aislamiento de estos microorganismos de una muestra no constituye la presencia de la enfermedad, sino que la enfermedad se diagnóstica cuando además de la presencia del microorganismo existen signos que la caracterizan y cambios patológicos de los tejidos (Roth y Bolin, 1995).

3.4 Patogenia y Cuadro Clínico

La mancha o carbón sintomático es solamente producida por *Clostridium chauvoei*, mientras que la gangrena gaseosa puede ser producida por uno o más de los siguientes microorganismos: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi* y *C. sordelli*.

La mancha (también llamada pierna negra o carbón sintomático) es común en bovinos pero muy rara en ovinos. Se define como una enfermedad endógena, ya que las esporas de este microorganismo ingresan al animal a través de la vía digestiva, son absorbidas a nivel intestinal y llegan a la circulación sanguínea por donde se distribuyen en distintos tejidos del organismo, pero en especial en el músculo estriado. Dentro del músculo son fagocitados por los macrófagos que se encuentran normalmente en los tejidos y dentro de estos pueden sobrevivir por años. Cuando por algún motivo se produce una reducción del potencial de oxido-reducción en esta zona, las esporas germinan y se multiplican rápidamente, produciendo toxinas que producen necrosis en los tejidos del área, lo que a su vez reduce aun más la tensión del oxígeno estimulando la multiplicación de los gérmenes. Las toxinas producidas en la zona se diseminan rápidamente, a la

circulación general produciendo una toxina que lleva a la muerte del animal en pocas horas. En la práctica, las lesiones que más comúnmente predisponen la mancha o el carbón sintomático son los golpes durante los encierros o traslados.

La Gangrena gaseosa o Edema maligno se observan tanto en bovinos como en ovinos y en contraposición a la mancha o carbón sintomático, se definen como enfermedades exógenas ya que los microorganismos responsables de la misma entran siempre al microorganismo a través de heridas en la piel. Ejemplo de esto son las heridas por vacunaciones, esquilas y castración.

El curso de la mancha o carbón sintomático y del edema maligno puede ser agudo o subagudo, durando entre 6 y 24 horas. Cuando el curso es agudo, generalmente no se llegan a observar los signos clínicos. En el caso subagudo, hay fiebre, decaimiento y cuando las lesiones se encuentran en los miembros, hay claudicación seguida de postración. En las zonas con lesiones, tanto en el carbón sintomático como en edema maligno se observa tumefacción debida al edema subcutáneo y en la mayoría de los casos, a la palpación se siente crepitación producida por las burbujas de gas generado por los microorganismos actuantes. La zona afectada generalmente se presenta en tonos azulados y fría, debida a la isquemia tisular. Una delgada línea de hiperemia puede observarse, separando esta zona del tejido sano circundante. En caso de edema maligno a veces pueden encontrarse las heridas por donde se produjo la entrada de los microorganismos. (Uzal y col. 2003).

A la necropsia de la mancha o carbón sintomático y del edema maligno se observa generalmente la piel del área afectada azulada y a la palpación puede sentirse edema y crepitación. Sin embargo, es importante recordar que muchas veces las lesiones de carbón sintomático se producen en músculos que no se pueden palpar externamente tales como los músculos sublumbar, diafragma o corazón. Como norma general se acepta que la gangrena produce lesiones que afectan principalmente al tejido subcutáneo, mientras que la mancha se restringe más al músculo. Sin embargo en la

mayoría de los casos, ambos tejidos tienen algún grado de lesión en ambas enfermedades. El músculo afectado se presenta oscuro y con frecuencia se observan agujeros en el mismo producidos por gas, que le dan un aspecto de "apolillado". El líquido de las zonas lesionadas es mal oliente y en él se pueden observar burbujas de gas. En ambas enfermedades, pero particularmente en la gangrena gaseosa hay abundante edema subcutáneo que a veces desde las zonas altas de los miembros puede extenderse hasta el rodete coronario, inmediatamente por encima de la pezuña. Puede haber líquido en cavidad abdominal, torácica y pericárdica y hemorragias en superficies serosas. El diagnóstico clínico y de necropsia brinda generalmente un diagnóstico presuntivo de aceptable precisión en ambas enfermedades. Algo más de aproximación brinda la observación de improntas de la zona de la lesión, teñidas con la coloración de gram, en las que se observan bacilos gram positivos con espora terminal o subterminal. La confirmación del diagnóstico se obtiene a través de la inmunofluorescencia directa en improntas y/o del cultivo del músculo y exudados de la zona afectada. (Assis R. A, y col., 2001). Siempre conviene realizar además histopatología del músculo afectado ya que, aunque no brinda un diagnóstico definitivo, reafirma el presuntivo, en caso que no funcione el cultivo. Con el material fijado en formol enviado para histopatología, se puede realizar, además inmunohistoquímica, que se basa en la detección de los microorganismos en cortes de tejidos con anticuerpos específicos y que brinda también un diagnóstico definitivo. (Uzal y col., 2001) El diagnóstico bacteriológico se basa fundamentalmente en el aislamiento de *Clostridium chauvoei*, con la fermentación de carbohidratos especialmente la sucrosa y salicin y la prueba de inmunofluorescencia en el tejido muscular afectado y prueba de patogenicidad en animales de laboratorio. (Willis 1979, Guzmán y Micalizzi, 1992, Hamaoka y Terakado, 1993). Actualmente el diagnóstico molecular para esta enfermedad, utilizándose con éxito la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Takeuchi y col., 1997, Sasaki y col., 2001, Sasaki y col., 2002).

4. ANTECEDENTES

Vargas calculó las pérdidas producidas por estas enfermedades en 480 mil dólares anuales de 1972- 1977 en México. Posteriormente, un estudio realizado en 1990 por el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP) y la Dirección General de Sanidad Animal, señala que las enfermedades que afectan con mayor frecuencia a la ganadería productora de carne en México son brucelosis, pasteurelisis bovina, carbón sintomático, ántrax, abortos y rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR); mientras que la ganadería productora de leche es afectada con mayor frecuencia por tricomoniasis y vibriosis, además de las ya mencionadas (Ontiveros y col., 1993). En Argentina en una encuesta realizada en 1999 incluyendo la mayoría de los laboratorios de diagnóstico y/o producción de biológicos de la Red de Servicio Nacional de Sanidad Animal, los miembros de la Asociación Argentina, se verificó que del total de especímenes clínicos evaluados, fueron aislados entre otros clostridios, 23.5% de cada uno de *C. chauvoei* y *C. septicum* y *C. perfringens*. En el Brazil, según el Servicio de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Abastecimiento fueron registrados en el periodo de 1990 a 1999, 8098 focos de mancha y gangrena con 7623 muertes. (Rood. J., 1998, Assis. R. A., y col. 2001).

El tratamiento de las infecciones e intoxicaciones causadas por *Clostridium* es de valor limitado, pues los antibióticos y agentes quimioterapéuticos son de poca efectividad. Además, en la mayoría de los casos, el curso de la enfermedad suele ser tan rápido que los animales se encuentran moribundos o muertos antes que el tratamiento pueda ser considerado. De acuerdo con la literatura las clostridiasis pueden ser prevenidas eficazmente por algún tipo de inmunógeno, siempre que se cumplan los requisitos de control de calidad mínimos necesarios para todo biológico (Labranderos y Hernández, 1979, Ontiveros y col., 1993).

4.1 Bacterinas comerciales

En México, en general las bacterinas comerciales son dirigidas a proteger contra estas infecciones con diferentes tipos de biológicos:

a) *Clostridium chauvoei* (pierna negra) y *Clostridium septicum* (edema maligno), en las llamadas bacterinas dobles.

b) *Clostridium chauvoei* (pierna negra), *Clostridium septicum* (edema maligno) y *Pasteurella multocida*, en las llamadas bacterinas triples.

c) *Clostridium chauvoei* (pierna negra), *Clostridium septicum* (edema maligno), *Clostridium novyi* (hepatitis necrótica) y *Clostridium perfringens* tipo C (enterotoxemia hemorrágica) y D (riñón pulposo). Vacunas de 7 vías (Ultravac 7; UB7 y Alfa-7, A7). Todos estos biológicos son cultivos formalinizados con adyuvante de hidróxido de aluminio, oleoso, o bien registrado bajo un nombre comercial (Walter y Batty 1986, Amimoto y col., 1997, De Groot y col., 1997, Troxel y col., 1997, Cussler y col., 2002).

En el CENID-Microbiología desde hace años se sabe que a pesar de realizarse vacunaciones cada 4 ó 5 meses en algunas explotaciones, éstas no son efectivas y sí aumentan el costo de producción en las ganaderías afectadas, ya que persisten las pérdidas ocasionadas por estas enfermedades en las explotaciones ganaderas (Vargas 1979). En México, Labranderos y Hernández 1979 al evaluar la efectividad de cinco bacterinas comerciales contra carbón sintomático, de acuerdo a las normas oficiales establecidas por la Dirección General de Salud Animal de la S.A.R.H., encontraron que un producto protegió al 23% de los cuyes inmunizados en dos ocasiones y desafiados con una cepa patrón y los biológicos restantes no confirieron ninguna protección. Asimismo, Ontiveros y col. 1993, elaboraron un inmunógeno contra las infecciones causadas por *C. chauvoei* y *C. septicum* y evaluaron su capacidad inmunogénica, comparada con la de cuatro biológicos comerciales. Se prepararon bacterina, toxoide y bacterina-toxoide de ambos microorganismos. Las bacterinas elaboradas para cada cepa confirieron una protección del 100% al desafío con *C. septicum* y sólo un 60% con *C. chauvoei*. Los toxoides obtenidos no confirieron protección y

la bacterina-toxoide sólo protegió en un 20%. Los biológicos comerciales a pesar de producir títulos de anticuerpos, no confirieron ninguna protección al desafío con *C. chauvoei*, pero con *C. septicum* se obtuvo una protección del 100% por lo que se concluyó que los productos elaborados contra pierna negra no cumplieron con los requerimientos de potencia del Manual de Requerimientos Mínimos para Productos Biológicos Veterinarios vigente en la entonces S.A.R.H. (MRMBV 1977).

Con base en los resultados anteriores, Tenorio y col. 1992 realizaron perfiles electroforéticos de cepas de *C. chauvoei* y *C. septicum*, entre las que se encontraban algunas de las utilizadas en la producción de biológicos, cepa de referencia, cepa mantenida en el laboratorio y se observaron diferencias en por lo menos una banda de alto peso molecular del patrón proteico en la cepa utilizada en la producción de biológicos, de las cepas de *C. chauvoei*, mientras que en las cepas de *C. septicum* no se encontraron diferencias en el patrón electroforético. Estas proteínas de alto peso molecular, al ser transferidas al papel de nitrocelulosa, fueron reconocidas por sueros hiperinmunes elaborados previamente en conejos, lo que hace pensar que pudiera haber diferencias antigénicas entre las cepas de *C. chauvoei*. (Cato y col., 1982, Hamaoka y col., 1993, Hamaoka y col., 1994, Guzmán, S., 1998). Al igual que en México, en otros países han realizado estudios con relación a evidenciar la potencia de las vacunas contra *C. chauvoei*, debido a que se encontró que algunas vacunas conferían baja protección, lo cual puede ocasionar brotes de pierna negra (Crichton y col., 1986, Micaizzi y Guzmán, 1997, Mattar y col., 2002, Cussler. K., y col 2002).

Investigaciones realizadas por el Laboratorio Nacional de Estándares para Productos Bacterianos en Australia, al constatar la potencia de las vacunas elaboradas contra la pierna negra, demostraron que no se estaba utilizando una cepa de desafío de *Clostridium chauvoei* que cumpliera con los requisitos de potencia que marca el British Veterinary Codex para las vacunas que contienen antígenos de *Clostridium chauvoei*, que es de 10 DL₅₀ en cobayos, como modelo de evaluación en el laboratorio (Chandler y

Hamilton 1975, Crichton y col., 1986, Kojima. A., y col 2000).

Micalizzi y Stefanini 1995 al evaluar vacunas elaboradas en diferentes medios de cultivo que contenían 1- Peptona, extracto de levadura, glucosa, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Cisteína HCl 2. Peptona, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Cisteína HCl, Surgasa molase que es un producto rico en azúcares, vitaminas, contiene amino ácidos y sustancias que contienen nitrógeno, 3. Caldo de extracto de hígado y medio semi-sintético y 4. Una vacuna comercial, encontraron que el medio de cultivo era importante para el desarrollo de *C. chauvoei* y la potencia de las vacunas. Ya que el medio rico en azúcares y vitaminas fue en este estudio el que dio mejores resultados.

Los requisitos para la evaluación de vacunas contra pierna negra cada día son más rigurosos y se requiere de estándares precisos para el control y evaluación de dichos biológicos, siguiendo este control se reduce mucho la utilización de vacunas con baja potencia las cuales podrían ser las responsables de los brotes de pierna negra (Chandler y Hamilton, 1975, Crichton y col., 1986, White y col., 1986, Walter y col., 1986, Micalizzi y Guzmán, 1995, Di Genaro y col., 1998, Sasaki. Y., y col 2001).

En México se está utilizando una vacuna elaborada con 7 antígenos de diferentes especies de *Clostridium* en bovinos productores de carne se encontró una respuesta inflamatoria en el sitio donde fue administrada la vacuna, con relación al grupo control. También se observó que los animales que recibieron la vacuna dejaron de consumir alimento. Además las indicaciones para esta vacuna son administrar una segunda dosis 30 días después de la primera dosis. Estos resultados indican un efecto potencial negativo en la administración de estas vacunas llamadas de " 7 vías" (Geral y col., 1993, De Groot y col., 1997).

4.2 Antígenos de *C. chauvoei*

Por muchos años se han utilizado vacunas contra *Clostridium chauvoei*, elaboradas con una suspensión de células formalinizadas, sin embargo desde 1971 muchos investigadores se han abocado a estudiar diferentes

antígenos de *C. chauvoei*, ya que se ha observado que de las cepas utilizadas en la producción de vacunas, algunas son más inmunogénicas que otras (Chandler y Gulasekharam 1971, Chandler, H.M., 1975), lo que se ha relacionado con cepas de diferente virulencia; esto puede deberse a la existencia de diferentes antígenos en las cepas de *Clostridium chauvoei*, ya que se ha reportado la acción protectora de antígenos flagelares y somáticos (Stebenson y col., 1980, Tamuara y Tanaka, 1984, 1987, Tamuara y col., 1992, Hamaoka y col., 1993, Hamaoka y col., 1994). Los antígenos flagelares han sido estudiados en la protección de ratones a la infección con *C. chauvoei*.

Tamuara y Tanaka 1987 encontraron que estas proteínas conferían inmunidad al desafío debido a la acción opsonizante de los anticuerpos antflagelares producidos y esta inmunidad podía ser transferida a otro animal en forma pasiva. Estos estudios se han realizado utilizando cepas flageladas y mutantes no flageladas, con el fin de conocer el papel de estos apéndices en la respuesta inmune (Chandler y Gulasekharam, 1971, Chandler, H.M., 1975, Hamaoka y Terakado, 1993). Otros estudios se han abocado en conocer la inmunogenicidad de los antígenos somáticos de *C. chauvoei*, ya que se han encontrado en electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS proteínas características de la especie y otras que varían de cepa a cepa (Poxton. I.R., 1981, 1984). Dentro de los antígenos, somáticos y flagelares se ha descrito que son altamente antigénicos y se presume que la inmunidad conferida en los animales es primordialmente debida a ellos (Claus y Mecheak, 1972, Hamaoka y col., 1993, 1994). Algunos de estos antígenos somáticos son termo-estables los cuales corresponden a proteínas de membrana y otros termo-lábiles que se encuentran en la pared celular (Wiley y Schneewind, 1999). En pruebas de inmunofluorescencia se encontró que poseen antígenos comunes entre las especies de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* y que no son detectadas en la prueba de aglutinación con antígeno soluble (solubilizado con EDTA) (Hamaoka y Terakado, 1993).

Es preciso conocer cuáles son las proteínas de superficie que son reconocidas por sueros hiperinmunes y determinar su capacidad inmunogénica en animales de laboratorio, por lo que es necesario aislarlas y tenerlas en cantidad suficiente, para realizar los ensayos tendientes a conocer sus propiedades inmunogénicas.

La obtención de estas proteínas y su posible utilización como inmunógenos, podría ser un camino para mejorar la protección de los animales contra la pierna negra.

Las técnicas experimentales de ingeniería genética y biotecnología pueden ofrecer soluciones potenciales al problema como el aquí planteado, ya que presentan actualmente metodología que lleva a una mejor selección de antígenos (Dailey y Schloemer, 1988, Arnon y Regenmortel, 1992, Michal y col., 1993, Little. M., y col. 1993). Mediante esta tecnología es posible clonar y producir los antígenos relevantes de un microorganismo patógeno en otro que no lo sea y que no esté relacionado con el primero. Como de los microorganismos donde se hace la clonación se conocen sus mecanismos de regulación, se logran obtener grandes cantidades del antígeno clonado (Bolívar Z.F., 1979, Helfman y col., 1983, Geral y col., 1993, Miller y Kaper, 1994, SasaKi. Y., y col 2002).

Para la obtención de antígenos por ingeniería genética es necesario contar primero con un banco o biblioteca de genes. Un banco genómico es un conjunto de clonas que contienen fragmentos de DNA que juntos representan todo el genoma del microorganismo en estudio. A través de un número suficientemente grande de clonas, se puede pensar que la secuencia que codifica para el antígeno importante del mismo esté presente en alguna de las clonas (Dailey y Schloemer 1988, Tenorio 1990).

Recientemente las vacunas de DNA tienen un gran avance sobre las vacunas convencionales, aunque la producción de anticuerpos y la protección conferida a menudo no son adecuados particularmente en las vacunas elaboradas a partir de un solo plásmido (Caselli. E., y col. 2005).

Se debe considerar algunos aspectos sobre la efectividad de una vacuna:

- a) La cobertura de inmunización en la población bovina.
- b) Baja producción de respuesta humoral cuando se utilizan vacunas elaboradas con un solo plásmido.
- c) Estas vacunas requieren de la aplicación de un refuerzo para obtener una mejor respuesta humoral y celular. (Freede. M., Aguado. MT. 2005).

5. JUSTIFICACIÓN

Clostridium chauvoei es el agente causal del carbón sintomático en los bovinos y ocasionalmente en ovinos, es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en la ganadería nacional. El empleo de bacterinas comerciales contra carbón sintomático protege en cierta medida a los animales, pero a pesar de realizarse vacunaciones periódicas estas no son efectivas y se presentan brotes en la población bovina lo que aumenta el costo de producción. Por lo que es importante desarrollar nuevos inmunógenos que logren una mejor protección contra el carbón sintomático en el ganado.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar cuáles son los principales antígenos de *Clostridium chauvoei* que son reconocidos por el sistema inmune de los animales, con fin de clonar uno de ellos en *Escherichia coli*, así como conocer la capacidad inmunogénica del antígeno seleccionado en animales de laboratorio

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la Dosis letal al 100% en cuyes con la cepa de desafío que se utilizará para evaluar la inmunidad inducida por los diferentes inmunógenos.
- 2) Producir sueros hiperinmunes específicos contra los principales antígenos de *C. chauvoei*.
- 3) Identificar y purificar los principales antígenos de *C. chauvoei* reconocidos por los sueros hiperinmunes.
- 4) Determinar la protección conferida en cuyes por estas proteínas, en comparación con las bacterinas comerciales.
- 5) Clonación de proteínas de *C. chauvoei* que confieran mejor protección en los cuyes, en *E. coli* y que estas clonas expresen estas proteínas.
- 6) Determinar la protección conferida en cuyes por la proteína recombinante.

7. METAS

- 1) Contar con una Dosis Letal 100% que pueda ser utilizada para el control de los biológicos de *C. chauvoei*.
- 2) Conocer si se reconocen los mismos antígenos en las cepas de *C. chauvoei* utilizadas en la producción de biológicos que en las cepas de campo.
- 3) Conocer el grado de protección de estas proteínas para su posible utilización como inmunógenos.
- 4) Contar con un banco genómico y obtener las clonas que expresen las proteínas inmunogénicas de *C. chauvoei*.

8. MATERIALES Y METODOS

FASE I

8.1 Cepas bacterianas.

Las cepas de *Clostridium chauvoei* (CH56) mantenida en el laboratorio, la utilizada para la producción de biológicos (CH4), aislada de un caso de pierna negra en el estado de Chiapas (CH3008).

Estas cepas fueron identificadas y caracterizadas por medio de su morfología colonial. Desarrolladas en agar sangre y atmósfera anaerobia a 37 C, colonias pequeñas 1-2 mm de diámetro después de 48 hrs de incubación, irregulares, brillantes y semitransparentes. Observándose una ligera hemólisis cuando fueron cultivadas en agar sangre de carnero, fermentando la glucosa, lactosa, maltosa sucrosa, con la producción de ácido sulfídrico sin la producción de indol. (Manual Bergery's) y confirmado por anticuerpos fluorescentes contra *Clostridium chauvoei* (Holt 1984, Guzmán y Micalizzi 1992.).

También se reprodujo la enfermedad en forma experimental en cobayos, los cuales fueron inoculados con 1 ml de un cultivo fresco de 24 horas de *Clostridium chauvoei*.(CH56),(CH 4), (CH 3008) en la cual se observo edema y la muerte después de 24 horas. Observándose una considerable formación de gas en el tejido. En el postmortem se encontró un edema sanguinolento de rojo muy oscuro que se difundió en el sitio de la inoculación hacia el abdomen, los músculos cerca del sitio de la inoculación se encontraron de un color rojo muy oscuro y con una gran cantidad de gas en el tejido lográndose aislar el *Clostridium chauvoei* del corazón y del hígado en particular. (Holt,J.G., 1984, Guzmán y Micalizzi, 1992.)

Para los desafíos de los animales, se utilizó la cepa de referencia (ATTC 10092) que cuenta con todos los requisitos del Manual de Requerimientos Mínimos para Productos Biológicos Veterinarios SARH. (MRM 1977).

La cepa utilizada para la transformación fue *Escherichia coli* DH5 α que tiene el fenotipo r- , m+, lac Z-(Hanahan 1983), del cepario del laboratorio de bacteriología del CENID-Microbiología.

8.2 Medios de cultivo

Para el mantenimiento de las cepas de *C. chauvoei* se utilizaron los medios de Carne cocida (Meynell G.G.1965, Claus y Mecheack, 1972), y para el desarrollo masivo de *C. chauvoei* se utilizó el medio de Smith Holdeman (Smith y Holdeman, 1975), ya que este permite tener una mayor cantidad de células sin esporular. Para el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α se utilizó el medio de Luria-Bertrani (LB) y para las células transformadas al medio LB y el Agar McConkey, ambos con ampicilina (Theron y Cloete, 2000).

8.3 Producción de bacterina experimental

Se inoculó la cepa de *C. chauvoei* mantenida en el laboratorio(CH 56), en medio de Smith-Holdeman y se incubó a 37C, durante 48 hr. Después de esto se adicionó formaldehído a una concentración final de 0.5% y se mantuvo a temperatura ambiente durante 72 horas. El cultivo se centrifugó a 2 500 X g durante 20 min y las células se lavaron con PBS pH 7.2. Finalmente se suspendieron las células en el mismo amortiguador y la concentración fue igual al de las bacterinas comerciales (2×10^9 m.o/ml). Ésta se ajusto por medio del tubo 3 del nefelometro de MacFarland, adicionando adyuvante de Hidróxido de Aluminio al 0.1%. Bacterinas comerciales (Gera.L., y col., 1994. Claude Leclere., 2003)

8.4 Obtención de esporas de *C. chauvoei*

La cepa de referencia (ATCC 10092) fue desarrollada en medio de Maloy en forma masiva con el fin de tener una gran cantidad de células, las cuales se lavaron con PBS. Estas células se resuspendieron en glicerol al 100% y se mantuvieron en agitación constante durante 15 días a temperatura ambiente. Después de este tiempo se verificó la presencia de esporas por medio de la tinción de Schaeffer y Fulton que consiste en cubrir la laminilla con solución acuosa de verde de malaquita al 5% y calentar hasta formación de vapor durante un minuto, lavar bajo agua corriente, contrastar con solución acuosa

de safranina al 0.5% durante 15 seg. lavar con agua y escurrir los cuerpos bacterianos se tiñen de azul, las esporas de rojo, posteriormente se cuantificaron por medio de la técnica del número más probable de esporas la cual consiste en hacer diluciones logarítmicas en medio de Maloy en una serie de 5 repeticiones por dilución incubándose por 18 hrs a 37 C. y posteriormente haciendo la lectura de desarrollo de cada uno de los tubos y por medio de tablas definidas se determino el número más probable de esporas (Meynell G.G.,1972, Cowan y Steel's 1979, Chirton y col., 1986).

8.5 Determinación de la dosis letal 100% (DL₁₀₀)

La dosis letal se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Reed-Muench, utilizando cobayos de 350~450 gramos de peso (Chirton y col., 1986). Se preparó una suspensión de esporas con la cepa (ATCC 10092) (Amimoto y col., 2001) mezclada con una solución de CaCl₂ al 5% en una relación 2:1. Se administró 1 ml por vía intramuscular y se cuantificaron las muertes que se presentaron durante 3 días posteriores al desafío (Cameron y col., 1986, Amimoto y col., 1997).

8.6 Prueba de potencia.

Se utilizaron 15 cobayos del mismo sexo con un peso de 350 a 450 gr., cinco se utilizaron como testigos y diez de estos se vacunaron con 1 ml de bacteria experimental 2×10^9 m.o/m, equivalente a 1/5 parte o la mitad de la dosis bovina, por vía subcutánea, en el cuello atrás de la oreja. Veinte días después se les aplicó una segunda dosis. Catorce días después de la última vacunación todos los animales se desafiaron intramuscularmente con una suspensión de esporas (0.5 ml de CaCl₂ al 5%), 10 dosis letales mínima (MLD) (1.2×10^3 número más probable) de la cepa de *Clostridium chauvoei*, (ATCC 10092), estos animales fueron observados diariamente durante siete días después del desafío.

La prueba se consideró satisfactoria cuando por lo menos el 80% de los animales testigos murieron y el 80% de los vacunados sobrevivieron

(Chiirton y col., 1986, Ontiveros y col., 1993).

8.7 Obtención de extractos crudos de *C. chauvoei*

Las cepas de *C. chauvoei* mantenida en el laboratorio (CH56), la utilizada para producción de biológicos (CH4) la cepa aislada de campo en el estado de Chiapas (CH3008) y cepa de referencia (ATCC 10092) se cultivaron por separado y fueron cosechadas en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (PBS), La suspensión bacteriana fue centrifugada a 6 000 X g durante 15 min. y ajustadas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm a una concentración de 10^8 m.o/ml (Webster y Frank, 1985, Poxton I.R., 1984, Tenorio y col 1992).

8.8 Obtención de proteínas totales de *C. chauvoei*

El paquete celular se sonicó (ULTRASONIC PROCESOR Continued), utilizando 10 pulsaciones de 10 segundos cada uno y se centrifugó a 6 000 X g por 15 minutos para la remoción de restos celulares. (Beckman L8-M). El sobrenadante se separó, correspondiendo al sedimento a las proteínas totales. La pastilla se resuspendió en PBS pH 7.2 por medio de un homogenizador manual, se hicieron alícuotas de 20 ml, guardándose a -70°C hasta el momento de su uso.(Helenius y Simons, 1975).

8.9 Método para la recuperación cuantitativa de las proteínas unidas a compuestos orgánicos

A 100 μl de proteínas totales se le agregaron 400 μl de metanol, se homogenizaron y se centrifugaron por 10 segundos a 10 000 X g. Después se le agregaron 100 μl de cloroformo y nuevamente se homogenizó y se centrifugó.

Para la separación de la fase orgánica se adicionaron 300 μl de agua destilada, se agitó y centrifugó por un minuto a 10 000 X g. La fase superior se removió cuidadosamente y se desechó. A la fase restante le fueron adicionados 300 μl de metanol, se agitaron y centrifugaron por dos minutos a

10 000 X g. El sobrenadante fue removido y el paquete de proteínas, se secó bajo flujo de aire y se guardó a -70°C hasta su uso (Wessel.D., y Fluge. U.I., 1983).

9. Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas totales fue determinado por colorimetría, utilizando el método de microtitulación de Bradford (Bradford, 1976). Cada vial de proteína se solubilizó con 100 μl de amortiguador. Se construyó una curva de referencia con albúmina sérica bovina de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS. 10 μl de muestra de proteína fueron mezclados con 190 μl de reactivo de Bradford. Esto se realizó para los extractos crudos y proteínas de membrana de las cepas de *C. chauvoei*. La lectura se realizó en un lector de microplacas de ELISA (Immunoskan plus) a 405 nm.

Para conocer la concentración de proteína de cada una de las muestras, se correlacionó la absorbancia obtenida con la proteína en la curva estándar de albúmina sérica bovina. El cálculo matemático que se utilizó para obtener la cantidad de proteína en los 10 μl de muestra fue la regresión lineal.

9.1 Obtención de sueros hiperinmunes.

Se siguió el mismo calendario de inoculaciones tanto para la Bacterina experimental y de proteínas de membrana.

Se formaron grupos de dos conejos Nueva Zelanda de 2 kg de peso. Estos animales se inocularon en 4 ocasiones con 1 ml de la bacterina experimental (CH56) por vía subcutánea, con 2×10^9 mo/ml, el inóculo fue estandarizado en un nefelómetro de Mc Farland más adyuvante completo de Freund. A intervalos de cuatro días entre cada dosis aplicada. Se sangraron a los animales vía intracardiaca, cuatro días después de la última inoculación, y por centrifugación a 1320 X g durante 15 min se obtuvo el suero, el cual se conservó en congelación a -20°C en alícuotas de un mililitro en tubos de plástico debidamente identificados. Los sueros obtenidos se titularon por la prueba de fijación de complemento, esta prueba consiste en trabajar con

diluciones dobles del suero a titular en microplacas de 96 pozos, con un primer sistema antígeno-anticuerpo y el complemento, incubando a 37 C por 45 min y un sistema indicador, formado por los glóbulos rojos de ovino y la hemolisina, (sistema hemolítico) incubando a 37 C por 30 min después de este tiempo se centrifugan las placas a 1000 X g durante 10 min leyendo al 50% hemólisis. (Chadler H.M. 1992, Ontiveros y col., 1993).

9.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida Dodecil sulfato de sodio (PAGE- SDS)

La separación de las proteínas, se llevó a cabo en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) en condiciones no reductoras, por el método de Laemmli, 1970, de forma que las posiciones de las diferentes proteínas en gel fueran en función de sus tamaños moleculares. Para ello se empleó una cámara de electroforesis vertical con placas de 8 x 10 cm (Gibco MiniV8).

9.3 Preparación de la muestra

Basándose en la concentración de la proteína, se calculó la concentración necesaria de la proteína 10 µl que se colocó por pozo en el gel de poliacrilamida. Equivalente cada uno de estos volúmenes a una concentración de proteína de 10 µg/µl. Para cada cantidad de muestra se agregó un volumen igual de amortiguador de muestra (Tris, SDS, Glicerol y Pironina) y un amortiguador de lisis (PMSF, PHMB, Leucopectina y EDTA) se colocó en Baño María a ebullición, durante cinco minutos, para lograr la desnaturalización de la proteína en presencia de SDS, posteriormente se agregó 2-Mercapto-etanol en un 10% del volumen total de la muestra y se colocó en Baño María a ebullición durante un minuto.

9.4 Preparación de los geles (PAGE-SDS) y corrimiento electroforético

Se prepararon geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio al 10, 12.5 y 15%, (Laemmli, 1970). Entre las placas de vidrio, se colocó el gel de

corrimento. Para obtener una óptima resolución de proteínas, se preparó el gel concentrador, el cual se colocó en la parte superior del gel de corrimento. Después de polimerizar, el gel fue colocado en la cámara de electroforesis que contenía amortiguador de corrimento. Se retiró cuidadosamente el peine y se colocaron los marcadores de peso molecular con rango de 9.5 a 207 kDa y las muestras en cada pozo de los extractos crudos y proteínas de membrana de cepas de *C. chauvoei* mantenida en el laboratorio (CH56), la utilizada para producción de biológicos (CH4) la cepa aislada de campo en el estado de Chiapas (CH3008) y cepa de referencia (ATCC 10092).

De cada corrimento que se realizó, se hicieron dos geles, uno para ser teñido con Azul brillante de Coomassie R-250 y el otro para la inmunotransferencia. La masa molecular aparente de la proteína fue determinada por comparación con la movilidad relativa de los marcadores de los pesos moleculares estándares (Weber y Osborn 1969). Para la inmunotransferencia, las proteínas fueron transferidas según la técnica descrita por Towbin y col. (1979) a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Gibco. USA) empleando el Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad, USA). Para la identificación inmunogénica se usó un suero hiperinmune policlonal, producido en conejo con título de 1:512 a la prueba de fijación de complemento y como anticuerpo secundario proteína A conjugada con peroxidasa 1:1500 (Sigma Chemical Co). (Cleveland y col., 1997).

9.5 Tinción de geles de poliacrilamida

Después de finalizar la electroforesis, uno de los geles fue colocado en un recipiente que contenía solución Azul brillante de Coomassie R-250 en un volumen suficiente para cubrir el gel completamente, la tinción se llevó a cabo por 24 horas en agitación. Posteriormente, el exceso de colorante del gel se eliminó con solución desteñidora, hasta lograr apreciar con claridad las bandas proteicas y fue conservado en ácido acético al 10%.

El peso molecular de las proteínas fue estimado por su posición en el gel, comparado con un estándar de proteínas conocido (marcador de peso molecular), corrido en el mismo gel, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf.

9.6 Semipurificación de proteínas de membrana de *C. chauvoei* por Membranas de Amicón

Se realizó una semipurificación de proteínas de membrana mayores de 100 kDa por medio de membranas de Amicon (centriplus YM 100), que tiene la finalidad de separar por medio de centrifugación por 90 minutos a 1320 X g separando las proteínas menores de 100 kDa, después todo lo que no se filtro se paso a otro tubo centrifugando por 10 minutos a 1320 X g obteniéndose todo lo que no se filtro proteínas mayores de 100 kDa en una centrifuga JOVAN GR 2022 y posteriormente separándolas por electroelución (Shelley y col., 1986, Maniatis y col., 1989).

9.7 Protección conferida por proteínas de *C. chauvoei*

Se siguió el método recomendado por el MRM para biológicos elaborados con *C. chauvoei*. Se formaron grupos de 20 cuyes cada uno, los cuales se inocularon por vía subcutánea con: i) Bacterina experimental 1ml de una mezcla de 500 µl de una suspensión de células de *C. chauvoei* estandarizadas a 2×10^9 mo/ml más 500 µl de hidroxido de aluminio al 0.1% (adyuvante); ii) Proteínas de 156 kDa, 50 µg/µl de proteínas de *C. chauvoei* más 500 µl de hidroxido de aluminio al 0.1% (adyuvante). iii) Bacterina experimental enriquecida con proteínas de 156 kDa de *C. chauvoei*; 500 µl. iv) 500 µl de solución salina fisiológica más 500 µl de hidroxido de aluminio al 0.1% (grupo control).

Se administró un refuerzo a los 14 días de la primera inoculación en la mitad de los animales de cada grupo. Después de 14 días de la última inoculación todos los animales se desafiaron con 10 DL₁₀₀ y se registraron las muertes en los tres días posteriores al desafío. Tomando en cuenta los resultados

obtenidos se eligieron las proteínas que dieron una mejor protección, las cuales se clonaron posteriormente (Cameron y col., 1986, Crichton y col., 1986, Amimoto y col 1997).

FASE II

10. Obtención de ADN cromosómico de *C. chauvoei*

De un cultivo masivo de *C. chauvoei* se separaron las células, las cuales se resuspendieron en 5 ml de una solución Tris-EDTA, 50 mM de pH 8.0 a la cual se le adicionaron 10mg/ml de lisozima a 4 C por 45 min. Después se le adicionó 1 ml de solución STEP (SDS 0.5%, Tris 50mM (pH 8.0), EDTA 0.4 M (pH 8.0) y proteínasa K 1 mg/ml); se incubó a 50 C durante 1 hora, posteriormente se hizo una extracción con 6 ml de fenol amortiguado con Tris-HCl, se mezcló y se centrifugó a 1320 X g por 15 min. A la fase acuosa se le adicionó un décimo de volumen de acetato de potasio 3M y se precipitó el material genético con dos volúmenes de etanol. El material genético se resuspendió en 5 ml de solución TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) a la que se le agregaron 10 µg/ml de RNAsa por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó un volumen igual de cloroformo, se emulsificó la solución y se centrifugó a 1320 X g por 15 min, separando la fase acuosa, se realizó una segunda extracción con fenol, y el DNA se precipitó con acetato de potasio 3M pH 5.0 y dos volúmenes de etanol. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se visualizó en geles de agarosa al 0.7% (Maniatis y col 1989, Theron y Cloete 2000).

10.1 Obtención de fragmentos de ADN cromosómico.

El DNA cromosómico fue cortado con la endonucleasa *Sau3AI*. Con el fin de obtener fragmentos con un tamaño promedio de 2000 pares de bases (2 Kpb) que no fuera demasiado grande para el vector, se realizó una cinética de restricción, en la cual se vario el tiempo de acción de la enzima para determinar el tiempo de acción del tamaño de los fragmentos deseados (Maniatis y col., 1989, Kojima y col., 2000).

10.2 Obtención del plásmido vector

Se utilizó como vector para la amplificación de los diferentes segmentos genómicos de *C. chauvoei* el plásmido pBluescript que contiene como marcadores genéticos la resistencia a la ampicilina y la complementación para que la cepa receptora pueda utilizar la lactosa (Davis y col., 1986, Helfman y col., 1983). El plásmido se extrajo de la cepa de *E. coli* DH5 α por medio de la técnica de lisis alcalina descrita por Birnboim y Doly, 1979, que se describe a continuación:

Un cultivo de 5 ml de *E. coli* DH5 α en desarrollo logarítmico se centrifugó y el paquete celular se suspendió en 400 μ l de solución I: Tris 25mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0), y glucosa 50 mM, a 4 C durante 5 min. Posteriormente se agregaron 400 μ l de la solución II: NaOH 0.2M y SDS 1 %, se agitó suavemente hasta tener una solución translúcida. Posteriormente se adicionaron 300 μ l de acetato de potasio 3 M pH 5.0 agitándose suavemente hasta formar un coágulo blanquecino. Después se congeló en hielo seco-etanol y se centrifugó a 7 500 X g por 20 min. El sobrenadante se separó y se le adicionaron dos volúmenes de etanol frío, se centrifugó a 5 500 X g y se decantó el etanol, finalmente el precipitado se disolvió en TE.

10.3 Restricción del plásmido

El plásmido pBluescript fue cortado con la enzima *Bam*HI, ya que este plásmido tiene un solo sitio de restricción para esta enzima, además los extremos cohesivos producidos por esta enzima son complementarios a los producidos por la enzima *Sau* 3AI utilizada en la restricción del DNA cromosómico.

10.4 Electroforesis de ADN

Los DNAs tanto de plásmidos como de fragmentos de restricción del cromosoma se separaron y observaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.6%. Estos geles se prepararon fundiendo la agarosa en TAE (Tris base

40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM pH 8) y se colocaron 15 ml en una minicámara para geles submarinos. Una vez gelificada la agarosa, se depositaron las muestras previamente mezcladas con 1 μ l de colorante de cargado tipo III (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30% en agua bidestilada estéril). Posteriormente se aplicó una carga de potencial de 70 Volts/cm dejándose correr durante 70 min, se tiñó por 5-8 min por inmersión en una solución de 5 μ g/ml de bromuro de etidio y se eliminó el exceso de bromuro de etidio con agua. Finalmente se observó con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Maniatis y col 1989).

10.5 Ligación

Los fragmentos de DNA de *C. chauvoei* y el plásmido linearizado se unieron mediante la acción de la DNA ligasa del fago T4, durante 16 horas a 4 C. Estos DNAs se pusieron en la mezcla de ligación en una relación 3:1 (DNA cromosómico -DNA plásmido) (Hanahan y col 1983, Hackett y col 1988).

10.6 Obtención de células competentes

En 5 ml de medio LB se desarrolló *E. coli* DH5 α hasta tener una absorbancia a 590 nm de 1.0 (fase exponencial tardía). Con 1 ml de esta suspensión se inocularon 50 ml de medio LB a 37 C con agitación hasta que el cultivo llegó a su fase exponencial temprana (aproximadamente de 0.3-0.4 DO a 590 nm). Posteriormente se centrifugaron las células a 2 500 x g por 10 min y se resuspendieron con CaCl₂ 0.1 M estéril a 4 C, a un 40% del volumen inicial y se mantuvieron en hielo por 20 min, se centrifugaron a 2500 g por 10 min y se suspendió el paquete celular en CaCl₂ 0.1 M frío a un 5% del volumen anterior. Estas células se mantuvieron a 4 C durante 16 hr (Cepaldo y col., 1974,).

10.7 Transformación

Con el producto de la ligación se llevó a cabo la transformación utilizando células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*. Para esto se pusieron 100

ng de DNA ligado con 100 μ l de células competentes en hielo por 20 min. Se les provocó después un choque térmico a 42 C por 2 min, después de lo cual se les agregó 1 ml de caldo LB precalentado a 37 C, y se sembraron en placas de agar LB con 100 μ g/ml de ampicilina para seleccionar las células transformadas.

Esta transformación se llevó a cabo manteniendo una relación de una bacteria por copia de plásmido. La selección de las células transformadas se realizó en Agar MacConkey con ampicilina, ya que el plásmido pBluescript confiere resistencia a este antibiótico. Se seleccionaron las clonas que presentaron resistencia a la ampicilina y que no fermentaron la lactosa (Miller y Kaper, 1994).

10.8 Tamizado del banco de genes de *C. chauvoei*

En papel filtro de nitrocelulosa (0.45 μ , Millipore), se tomaron las clonas de placas de agar LB con ampicilina. Las clonas se replicaron en papel de nitrocelulosa hasta tener un diámetro de 1-2 mm, entonces los filtros fueron removidos del agar y expuestos a vapores de cloroformo por 15 a 20 minutos (técnica de lisis in situ de Helfman y col. 1983). Después cada filtro se trató individualmente con 10 ml de tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, MgCl 5 mM, 1 μ g/ml de DNAsa y 40 μ g/ml de lisozima y 3% de BSA. Los filtros fueron agitados suavemente durante toda la noche con la solución anterior a temperatura ambiente, posteriormente se mantuvieron en Tris salino (Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, NaCl 150 mM) durante toda la noche, para remover todos los dentritus bacterianos y se frotó suavemente con un dedo cubierto con un guante. Es conveniente adsorber estos sueros con lisados de la bacteria huésped y de especies bacterianas relacionadas. El lisado se preparó desarrollando la cepa de *E.coli* DH5 α (500 ml) hasta la fase estacionaria y por centrifugación se obtuvo el paquete celular, el cual se resuspendió en agua desionizada (5 ml) y se mantuvo en baño María durante 5-10 minutos. Un mililitro de este lisado se utilizó para adsorber 100 ml de suero diluido (1:100), durante 2 hr a 4°C.

Una vez adsorbido el suero se quitaron los restos celulares por centrifugación 10 000 X g. Cada filtro fue incubado por una hora a temperatura ambiente con 8 ml de suero adsorbido, con agitación suave. Seguido de la incubación con el primer anticuerpo, los filtros se lavaron con Tris-salino a temperatura ambiente (cinco cambios de 20-30 min cada lavado).

Posteriormente se incubó cada filtro con el segundo anticuerpo que fue proteína A conjugada con peroxidasa (Sigma), diluida con 10 ml de Tris salino con 3% BSA. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, los filtros fueron nuevamente lavados con Tris salino (cinco cambios); y puestos en contacto con la solución reveladora (diamino bencidina y peróxido de hidrógeno) durante una hora con agitación suave.

Una vez detectada una colonia positiva en el primer tamizado, ésta fue aislada y nuevamente replicada en nitrocelulosa, que sirvió como plantilla para replicarla en placa de agar; por otro lado este filtro sirve para confirmar el aislamiento al realizar nuevamente todo el procedimiento del tamizado y asegurar que la colonia produjo la proteína detectada (Helfman 1983, Tenorio 1990).

10.9 Caracterización de los antígenos por medio de geles de poliacrilamida-SDS e inmunotransferencia.

Ya purificada la clona, ésta se desarrolló hasta fase estacionaria en 3-4 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml), 1-1.5 ml de cultivo fueron centrifugados (microfuga, Sorvall), el medio fue desechado y el botón se resuspendió en 200 µl de amortiguador de muestra, agregándole ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) 2 mM, etilen glicol-bis(Baminoetil eter)-N,N,N',N'-ácido tetra acético (EGTA) 2 mM y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 2 mM. El tubo se puso a baño María por 3 min y las proteínas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) al 10% y 12% con SDS al 0.25% (Laemmli, 1970). Comúnmente entre 5 y 10 µl del lisado bacteriano (25 µg) fueron suficientes para observar las proteínas por

tinción con Azul brillante de Coomassie R-250. Para la identificación de las proteínas de 156 kDa de *Clostridium chauvoei* expresados por estas clonas, las proteínas separadas por PAGE-SDS se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se incubaron con sueros hiperinmunes contra proteína de membrana de *Clostridium chauvoei* según el procedimiento descrito por Towbin y col., 1979, Little y col., 1993).

11. Determinación de la protección conferida en cuyes por la proteína recombinante

Se formaron grupos de 20 cuyes cada uno, los cuales se inocularon por vía subcutánea con 500 μ l de una mezcla de 250 μ l (10 μ g/ μ l) de proteínas recombinantes más 250 μ l de hidróxido de aluminio al 0.1% (adyuvante). Grupo1) Con la proteína recombinante 220 más adyuvante; Grupo2) Proteína recombinante 550 más adyuvante Grupo 3) Solución salina fisiológica más adyuvante (control).

Se administró un refuerzo a los 14 días de la primera inoculación en la mitad de los animales de cada grupo. Después de 14 días de la última inoculación todos los animales se desafiaron con 10 DL₅₀ y se registraron las muertes en los tres días posteriores al desafío (Chadler H.M. 1992, Ontiveros y col., 1993).

12. RESULTADOS

12.1 Obtención de las cepas bacterianas

Se obtuvieron extractos crudos y proteínas de membrana de cepas de *Clostridium chauvoei*. La cepa (CH56) mantenida una en el laboratorio, la (CH4) utilizada en la producción de biológico, la cepa aislada (CH3008) de un caso en el estado de Chiapas y la cepa de referencia (ATCC 10092). Los extractos crudos se les realizó geles de poliacrilamida SDS, encontrándose diferencias en su perfil proteico principalmente en proteínas de 156, kDa de peso molecular con relación a una cepa productora de biológicos (Figura 1).

12.2 Determinación de la dosis letal 100% (DL₁₀₀)

Siguiendo el procedimiento descrito por Reed-Muench, se preparó una suspensión de esporas con la cepa ATCC 10092. Se encontró obteniendo que 10 esporas de la cepa estudiada son capaces de matar a un cuye (DL₁₀₀). Esta dosis se utilizó para evaluar la inmunidad inducida por los diferentes inmunógenos.

12.3 Prueba de potencia

El 80% de los animales vacunados con la bacterina experimental con *Clostridium chauvoei* (CH56) sobrevivieron, al desafío de la cepa de referencia y por otro lado los animales utilizados como control murieron todos (100 %) al desafío con la misma cepa.

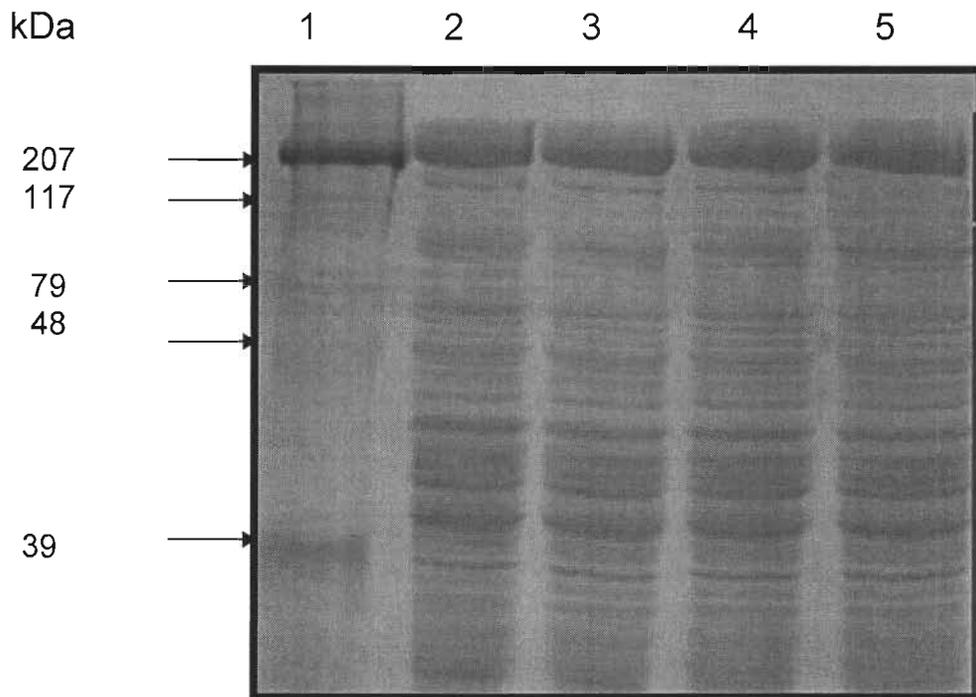


Figura.1 Gel de poliacrilamida-SDS 12 % Carriles 1) marcador de peso molecular, 2) Extracto crudo de Cepa de referencia ATCC de *C. chauvoei* (10092), 3) Extracto crudo de Cepa 3008 de *C. chauvoei*, aislada de un caso de pierna negra en el estado de Chiapas, 4) Extracto crudo de Cepa CH56 de *C. chauvoei* mantenida en el laboratorio y 5) Extracto crudo de Cepa CH04 de *C. chauvoei* utilizada en la producción de Biológicos. Teñidos con Azul de Coomasie.

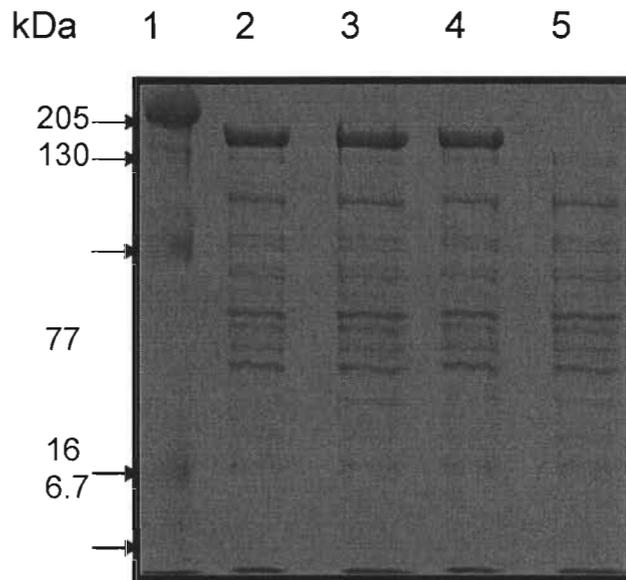


Figura 2. Gel de poliacrilamida-SDS 12 % Carriles 1) marcador de peso molecular, 2) Proteínas de membrana Cepa de referencia ATCC de *C. chauvoei* (10092), 3) Proteínas de membrana Cepa 3008 de *C. chauvoei*, aislada de un caso de pierna negra en el estado de Chiapas, 4) Proteínas de membrana Cepa CH56 de *C. chauvoei* mantenida en el laboratorio y 5) Proteínas de membrana de Cepa CH04 de *C. chauvoei* utilizada en la producción de Biológicos. Teñidos con Azul de Coomasie.

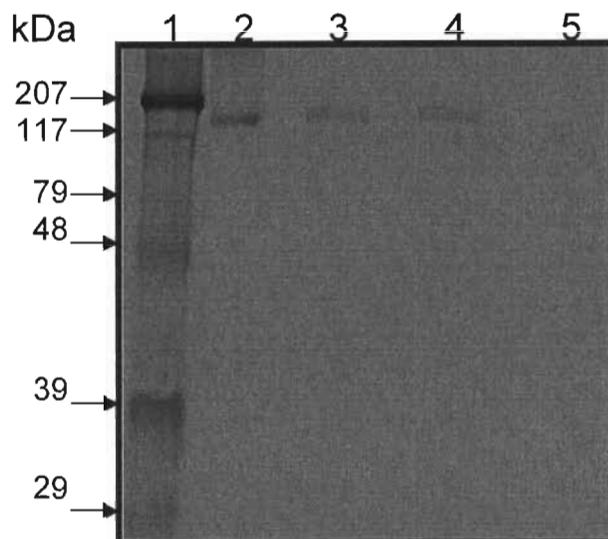


Figura 3. Inmunotransferencia Carriles 1) Marcador de peso molecular, 2) Proteínas de membrana de cepa de referencia ATCC de *C. chauvoei* (10092), 3) Proteínas de membrana de cepa 3008 de *C. chauvoei*, aislada de un caso de pierna negra en el estado de Chiapas, 4) Proteínas de membrana de cepa CH56 de *C. chauvoei* mantenida en el laboratorio y 5) Proteínas de membrana de Cepa CH04 de *C. chauvoei* utilizada en la producción de Biológicos. Teñidos con diamino bencidina.

12.4 Producción de sueros hiperinmunes contra *C. chauvoei*

Se determinó el título de anticuerpos por medio de la prueba de fijación de complemento. Obteniendo título de 1/512 en el suero hiperinmune obtenido, el cual se utilizó en la prueba de inmunotransferencia.

12.5 PAGE-SDS proteínas de membrana de *C. chauvoei*

Se observaron por medio de la tinción de Azul brillante de Coomasie el perfil de electrofóretico de cada uno de los proteínas de membrana de las cepas utilizadas de *C. chauvoei* en base al marcador de peso molecular, siendo las más evidentes las de 28, 41, 56, 64, 135, 156 y 200 kDa (Figura 2).

12.6 Inmunotransferencia

Los resultados obtenidos en el análisis de inmunotransferencia empleando anticuerpos policlonales contra células completas de *C. chauvoei* (CH56), revelando con 3'3' diaminobencidina, se observó una fuerte reacción con las proteínas de aproximadamente 135 y 156 kDa. (Figura 3).

12.7 Pruebas de protección

Se elaboró una bacterina experimental de *C. chauvoei* la cual en una prueba de potencia protegió solo al 60% de los animales inmunizados.

Los inmunógenos con la proteína de 156 kDa de *C. chauvoei* protegieron al momento del desafío en un 80%. Con los inmunógenos que contenían proteína de 135 kDa se obtuvo una protección del 20% (Figura 4).

12.8 Extracción de ADN Cromosómico

El ADN cromosomal se observó mediante el examen de los geles con luz ultravioleta (Figura 5). La cantidad de ADN cromosomal extraído correspondió a cantidades que van de los 600 a los 730 µg/µl.

12.9 Obtención de ADN de plásmido

Una vez extraído el plásmido por medio de lisis alcalina, se corrió un gel de agarosa al 0.6% con el ADN obtenido y se observó en el transiluminador de luz ultravioleta (Figura 6)



Figura 4 1) Bacteria experimental, 2) Proteínas de membrana 156 kDa, 3) Proteínas de membrana 156 más kDa Bacteria experimental, 4) Proteínas de membrana 135 kDa, Grupo 5) control.

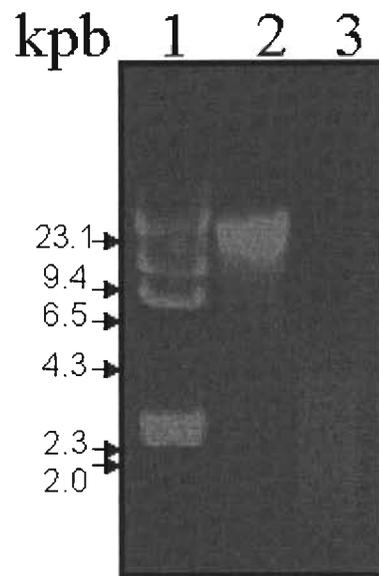


Figura 5. ADN cromosómico de *C. chauvoei* digerido con *Sau* 3AI
Carriles 1) Marcador de tamaño λ *Hind* III; 2) ADN cromosómico; 3)
ADN cromosómico digerido con *Sau* 3AI.

13. Cuantificación de ADN

La lectura obtenida en el espectrofotómetro a 260 nm para la muestra de ADN cromosómico de *Clostridium chauvoei* fue de 0.292 y la dilución que se realizó de la muestra fue 1/50, por lo tanto la concentración fue:

Concentración de ADN = Densidad óptica x dilución x 50 µg/µl.

Concentración de ADN = 0.292 x 50 x 50 = 730 µg/µl

Para la muestra pBluescript la lectura en el espectrofotómetro fue de 0.270, y esta se trabajó de la misma forma que el ADN cromosómico, por lo tanto:

Concentración pBluescript = 0.270 x 50 x 50 = 675 µg/µl

13.1 Obtención de fragmentos de ADN cromosómico

En la Figura 7 se muestra el resultado del ensayo de la cinética de restricción con la enzima *Sau* 3AI, por medio de la cual se seleccionó el tiempo de 20 minutos, ya que fue a este tiempo cuando se obtuvieron los fragmentos del tamaño promedio deseado (2 Kpb).

13.2 Obtención del vector restringido

El plásmido pBluescript fue restringido totalmente con la enzima *Bam* HI, en su sitio único de restricción, como se observa en (FIG 6). Una vez abierto el plásmido varió su patrón de corrimiento en la electroforesis, encontrándose sólo una banda de aproximadamente 3.5 kpb, lo que indica que se tiene la forma de plásmido lineal que es la deseada para la construcción del banco.

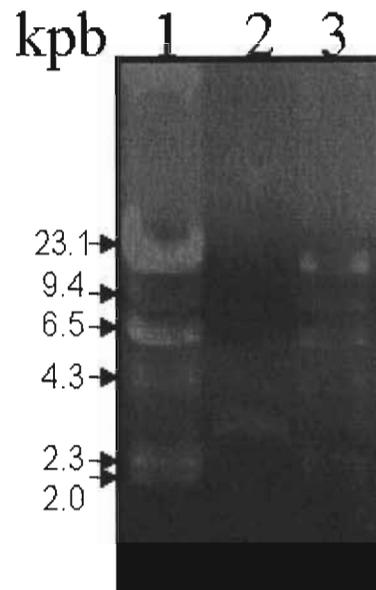


Figura 6. ADN cromosómico de *C. chauvoei* digerido con *Sau* 3AI Carriles 1) Marcador de peso molecular λ *Hind* III; 2) ADN cromosómico; 3) ADN cromosómico cortado con *Sau* 3AI.

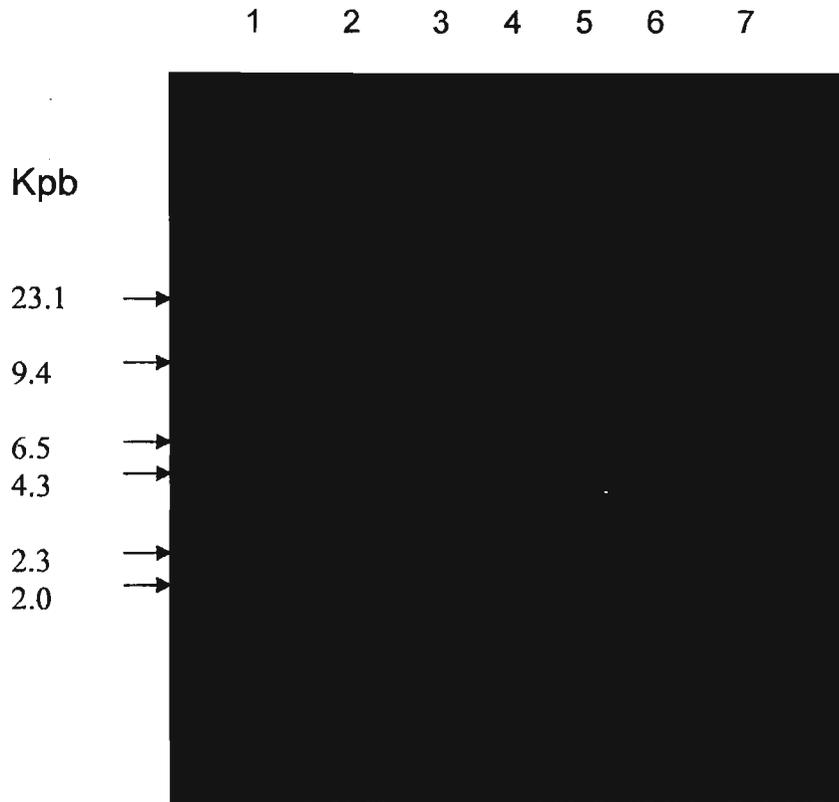


Figura 7 Carril 1) λ *Hind* III, 2)DNA de *C. chauvoei* cortado con *Sau* 3A I a diferentes tiempos (minutos) 0,3) 5, 4) 10, 5) 15, 6) 20, 7) 25, 8)30.

13.3 Ligación de los fragmentos de ADN cromosómico y de pBluescript

Para la obtención de los plásmidos recombinantes se utilizaron los fragmentos de 2 Kpb de tamaño promedio del ADN cromosómico y el plásmido linealizado, en una relación vector:inserto de 1:3. Una vez ligados los fragmentos y el plásmido se obtuvo la genoteca de *Clostridium chauvoei* (Figura 8).

13.4 Selección de transformantes con pBluescript recombinado

Las clonas seleccionadas en agar Mc Conkey con ampicilina, el cual tiene lactosa como fuente de carbono y rojo neutro como indicador de pH Tomándose de aquí las clonas lactosa negativas (colonias blancas) como portadoras de plásmidos con inserto de DNA heterólogo, mientras que las clonas lactosa positivas (colonias rosas) sólo fueron transformadas por plásmido recircularizados (Figura 9).

La transformación se llevo a cabo utilizando como vector pBluescript se realizó tres veces y en cada una de ellas se obtuvo un promedio de 3000 células transformadas. De estas clonas, aproximadamente el 28% contenían plásmidos con inserto de *Clostridium chauvoei* ($Lac^- Ap^r$), siendo este el porcentaje esperado, ya que el plásmido pBluescript se recirculariza durante la ligación entre un 60 a 70%.

13.5 Tamizado de las clonas recombinantes

A todas las clonas seleccionadas que presentaron resistencia a la ampicilina y no fermentaron la lactosa, se les sometió al tamizado inmunológico y con esta prueba se seleccionaron 6 clonas (*E. coli* DH5a-042, 081, 200, 220, 550 y 777), sobresaliendo el reconocimiento de dos de ellas por el suero hiperinmune (*E. coli* DH5a-220 y 550) (Figura 10).

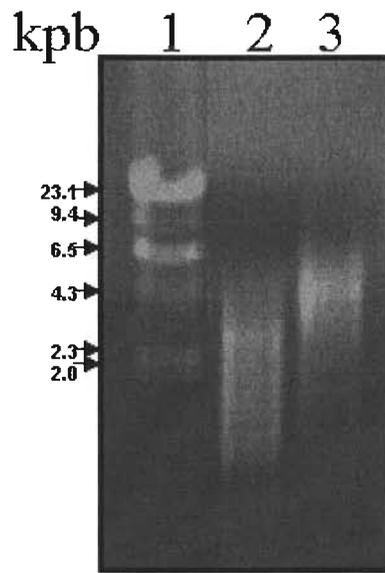


Figura 8. .Construcción de la genoteca; Carriles 1) Marcador de peso molecular λ *Hind* III; 2) Mezcla de ambos ADNs restringidos; 3) Mezcla de ambos ADNs restringidos + ligasa T4 (Genoteca de *C. chauvoei*)



Figura. 9 Desarrollo de colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el resultado de la ligación de DNA cromosómico de *C. chauvoei* con el plásmido pbluescript en medio de Mc Conckey con ampicilina colonias lactosa negativas (colonias blancas), colonias lactosa positivas (colonias rojas).

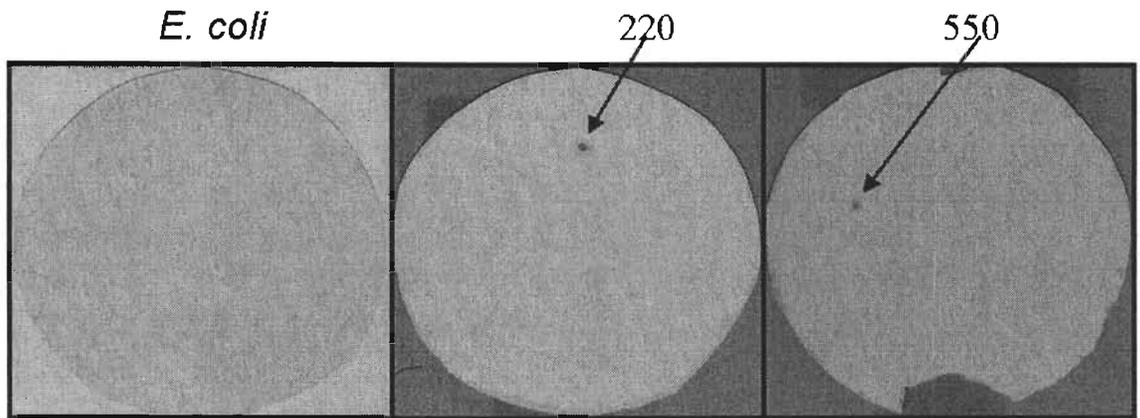


Figura 10. Tamizado inmunológico de clonas recombinantes. Control negativo a *E.coli* DH5 α , Selección de dos clonas positivas en papel de nitrocelulosa, clonas 220 y 550. Como primer anticuerpo se utilizó el suero policlonal contra extractos totales de *C. chauvoei* absorbido con lisados de *E. coli* DH5 α y como segundo anticuerpo proteína A conjugada con peroxidasa.

13.6 Electroforesis e inmunotransferencia

Las proteínas recombinantes de las 6 clonas fueron separadas por PAGE-SDS al 10% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Como primer anticuerpo se utilizó suero hiperimmune contra *Clostridium chauvoei* y como segundo anticuerpo proteína A conjugada con peroxidasa. Después de realizar el corrimiento electroforético y la transferencia en dos de las clonas la 220 y 550 se reconoció una proteínas de 156 kDa de peso molecular (Figura 11). Estos resultados sólo se encontraron con los extractos crudos de las clonas ya que en el sobrenadante no reconocieron ninguna proteína.

13.7 Determinación de la protección conferida en cuyes por las proteínas recombinantes

Los resultados que se obtuvieron en la protección conferida por las dos clonas recombinantes Grupo1) Con las clona recombinante 220 más adyuvante; Grupo2) Clona recombinante 550 más adyuvante que expresaron la proteína de 156 kDa de *C. chauvoei* protegieron al momento del desafío a 16 de los cuyes por lo que la protección fue de un 80%, mientras que en el grupo Grupo3) Solución salina fisiológica más adyuvante(control) 20 cuyes (100%) murieron al momento del desafío (Figura 12).

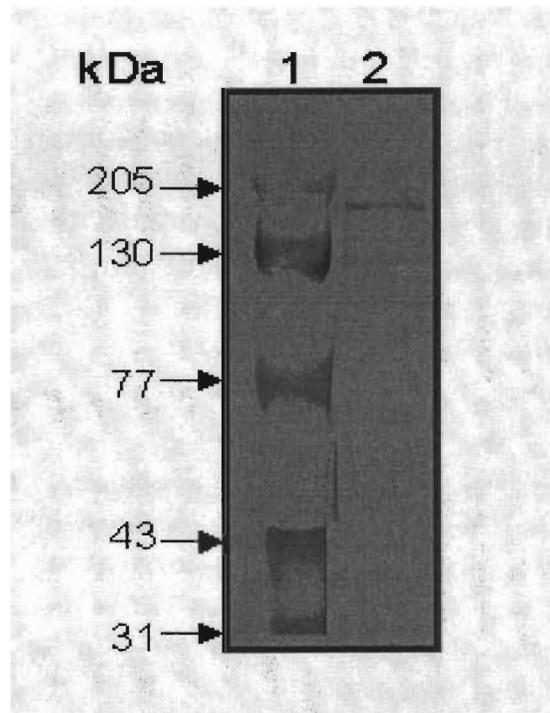


Figura.11 Inmunotransferencia de extractos totales de la proteína recombinante 550

Carriles: 1) Marcador de peso molecular; 2) Extractos totales de la proteína recombinante 550.

**PROTECCIÓN CONFERIDA EN CUYES AL DESAFÍO CON CLONAS
RECOMBINANTES DE *C. chauvoei***

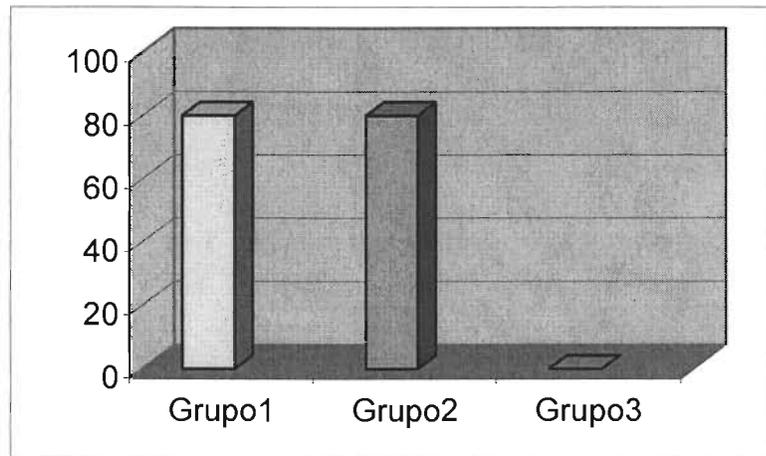


Figura. 12 1) *E. coli* DH5 α 220, 2) *E. coli* DH5 α 550,
3) control (SSF).

14. DISCUSIÓN

En este trabajo se clonó una proteína de membrana de *Clostridium chauvoei* de 156 kDa que es reconocida claramente, por los sueros hiperinmunes de conejo, en inmunotransferencia y que en la prueba de potencia protegió al 80% de los cuyes.

Tenorio y col. (1992) realizaron perfiles electroforéticos de extractos totales de diferentes cepas de *C. chauvoei* y *C. septicum*, entre las cuales se encontraban algunas que se utilizan en la producción de biológicos. Se llevaron a cabo con estos perfiles electroforéticos con la finalidad de conocer las diferencias existentes, encontrándose diferencias en una de las cepas de *C. chauvoei* utilizada en la producción de biológicos en por lo menos una banda de alto peso molecular, mientras que en las cepas de *C. septicum* no se encontraron diferencias en el perfil electroforético en ninguna de las cepas utilizadas. Por otro lado Cato y col. (1982) encontraron similitud en el peso molecular de antígenos solubles extraídos con EDTA de 70 cepas de diferentes especies de *Clostridium* utilizando antisuero homólogo, demostrando que existen antígenos compartidos entre el género, pero que al análisis de sus patrones de proteínas permite una rápida diferenciación entre especie, lo que concuerda con el trabajo de Tenorio y col. (1992) y los encontrados en este trabajo al realizar los perfiles electroforéticos de extractos totales y de proteínas de membrana de cada uno de las cepas de *C. chauvoei* (CH56, CH04, CH3008 y ATCC10092). Además en la cepa CH04, que se utiliza para la producción de biológicos, la ausencia de una banda de alto peso molecular.

Se han probado diferentes proteínas de *C. chauvoei* como inmunógenos y entre estas la flagelina, ya que se ha demostrado que las cepas flageladas son más virulentas que las aflageladas. Basándose en esto DiGenaro y col (1998) obtiene por cuatro diferentes métodos antígenos flagelares los cuales son reconocidos por sueros hiperinmunes de ratón, pero no realizaron estudios sobre la protección conferida por estos antígenos. Kojima A. y col.

(1999) purificaron y caracterizaron la flagelina de la cepa Okinawa de *C. chauvoei*, por medio de una centrifugación diferencial con Cloruro de Cesio y realizando perfiles electroforéticos encontraron una banda mayor de 46 kDa que correspondió al monómero de la FliC y dos bandas menores de 73 y 100 kDa que se trataba de polímeros de la proteína. La composición amino terminal de esta flagelina es similar a la flagelina de *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis*. Posteriormente Kojima y col. (2000) clona *fliC* en *E. coli* utilizando el producto de la clonación como inmunógeno en ratones encontrando que FliC induce una pobre protección al desafío.

En contraste con los resultados obtenidos por Kojima en este trabajo se clonó el gen que codifica para una proteína de membrana de 156 kDa que es reconocida claramente en el análisis de inmunotransferencia, con los sueros hiperinmunes de conejo y que en la prueba de potencia protegió al 80% de los cuyes al desafío, lo que demuestra que esta proteína es un buen candidato para la elaboración de biológicos contra la pierna negra. Al realizar los corrimientos electroforéticos de los extractos de membrana se encontraron proteínas que presentaban bandas bastante evidentes al ser teñidas con Coomassie, como las mayores de 200 kDa, pero al ser enfrentadas a los sueros hiperinmunes no fueron reconocidas, mostrando con esto su baja inmunogenicidad y por lo tanto no pueden ser considerados antígenos, en cambio la proteína recombinante seleccionada en el trabajo (156 kDa) no obstante presentar una baja concentración en los geles de poliacrilamida es claramente reconocida por los anticuerpos. Leclerc. C. 2003 observo que la liberación en la identificación de antígenos inmunodominantes puede ser el mejor blanco para la inducción de protección contra los patógenos, ya que esta limitado a los genes que son expresados en cultivos in vitro del patógeno. Por otro lado Baca (1987) evaluó bacterinas y toxoides de *C. chauvoei* encontrando que los títulos de anticuerpos producidos por los toxoides fueron significativamente más altos que los producidos por las bacterinas, pero al desafío los anticuerpos inducidos por los toxoides no protegieron a los animales, demostrándose con

esto que existen algunas proteínas que inducen una respuesta inmune pero que no es protectora, lo cual no sucede con la proteína recombinante obtenida, ya que esta confiere un 80% de protección.

Con respecto a la proteína de 135 kDa que también se evaluó, esta fue poco evidente en los extracto membranales y en la inmunotransferencia medianamente reconocida, por lo que no fue sorprendente que al desafío sólo protegiera en un bajo porcentaje a los animales, encontrándose que no era un buen inmunógeno.

La utilización de clonas recombinantes en la obtención de antígeno presenta varias ventajas: 1) El cultivo de *E. coli* es más accesible en su manejo que el de *Clostridium chauvoei* ya que para su desarrollo no es necesario una atmósfera anaeróbica o medios de cultivo con reductores de crecimiento como la glucosa y la cisteína, que limitan la cantidad de células en el cultivo. 2) El vector es multicopia y por lo tanto produce una mayor cantidad de antígeno, que la cepa de *Clostridium chauvoei* en condiciones normales. 3) No es necesario purificar el antígeno ya que los extractos totales de la clona de *E. coli* pueden ser utilizados como antígenos.

Con lo que se puede sugerir que esta tecnología del ADN recombinante es una buena alternativa para la obtención de nuevos biológicos contra carbón sintomático.

La utilización de esta proteína recombinante podría ser el primer paso en el diseño y desarrollo de nuevas vacunas contra carbón sintomático en México.

15. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron 3000 clonas que contenían plásmidos con insertos de *Clostridium chauvoei* y por tamizado inmunológico, se seleccionaron 2 clonas que expresaban antígenos de *Clostridium chauvoei*.

2. Con base a los resultados obtenidos, se establece que la detección de las clonas 220 y 550 fueron identificadas como las que expresaban una proteína de 156 kDa, que es reconocida con mayor intensidad con el suero policlonal.

3. La clona 550 es un candidato para la elaboración y evaluación de un inmunógeno contra carbón sintomático.

4. En las pruebas de potencia se obtuvo una protección del 80% en animales inmunizados con la proteína recombinante, superando a la protección conferida por las vacunas comerciales.

16. BIBLIOGRAFIA

- Willis, A.T. 1979. Anaerobic bacteriology: Clinical and laboratory practice. 3^a edición, Butherworths.
- Lenete, E. 1980 Manual of clinical microbiology. 3^a Edición, American Society for Microbiology.
- Holt, J., G., 1984 Bergey's manual of systematic bacteriology. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore USA.
- Petit, L., Giber, M., Popoff, M. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Elsevier Science.
- Meynell, G.G. 1965. Theory and practice in experimental bacteriology. Cambridge at the University Press.
- Smith, L.D., Holdeman, L.V. 1975. The pathogenic anaerobe bacteria. Charles C. Thomas. 2nd. Ed. Springfiel, Ill.
- Sterne, M., 1981. Clostridia Infection. Br Vet. J. 137 5:443-453.
- Takeuchi, S., Hashizume, N., Kinoshita, T., Kaidoh, T., Tamura, Y. 1997. Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. J. Vet. Med. Sci. 59(9) 853-855.
- Uzal, F.A., Paramidani, M., Assis, R., Morris, W., Miyakawa, M.F. 2003. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. Vet. Records 1:134-136.
- Roth, J.A., Bolin, C. A. 1995 Virulence mechanisms of bacterial pathogenesis, American Society for Microbiology.
- Rood, J. 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Amm. Rec. Microbiol. 52:333-360
- Ballard, A., Bryant, D., Stevens, D., Tweten, K. 1992. Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. Infection and Immunity. 784-790.
- Miller, L.M., Kaper, B.J. 1994 Molecular genetics of bacteria pathogenesis. American Society for Microbiology.
- Upadhye, A.S., Venkatesha, M.D. 2003. Anaerobes in health and disease of

animals.<http://www.indiaveterinarycommunity.com/profperspective/featuredarticle/j.../art-upadhye.as>.

Cortiñas, T.I., Mattar, M.A., Guzmán, A.M. Alpha and beta toxins activities in regional strains of *Clostridium chauvoei*. <http://www.anaerobe.org/ao98/sspp.ntm>

Guzmán A, Micalizzi, B. 1992. Diagnóstico de la mancha por inmunofluorescencia directa en médula ósea de bovino. Rev. Latin-amer. Microbiol. 34: 87-89.

Cortiñas, T.I., Micalizzi, B., Guzmán, A. 1994. Influence of cultura conditions on growth and protective antigenicity of *Clostridium chauvoei*. J. Appl. Bact. 77, 382-387.

Tamura, Y., Kijima, M., Yamamoto, K., and Yoshimura, H. 1992. Partial characterization of the hemolysin produced by *Clostridium chauvoei*. J. Vet. Med. Sci. 54(4) 777-778.

Assis, R. A., Lobato, F., Dias, L., Uzal, F., Martins, N., Silva, N. 2001. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. Rev. de Med. Vet. 82(2) 68-70

Hamaoka. T., Terakado. N. 1993. Demonstration of antigens on cell surface of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* by indirect-immunofluorescence assay. J. Vet. Med. Sci 56(2) 371-373.

Sasaki Y., Kojima A., Auki H., Ogikubo Y., Takikawa, N., Tamura Y 2002. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. Veterinary Microbiology. 2002, 86: 3, 257-267.

Sasaki. Y., Kojima, A. Auki, H., Ogikubo, Y., Takikawa, N., Tamura, Y. 2002. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* type A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. Vet. Microbiol. 86 257-267.

Vargas L. J., 1977. Citado por Bojorquez, N.L. Pierna negra y edema maligno. XIV Reunión Anual, Sección trópico. Jal. Ver. Imprenta Arana. p

78-83 México, D.F.

Ontiveros, C. L., Tenorio, G. V., Baca, R. A. 1993. Elaboración de un inmunógeno contra clostridiasis (Carbón Sintomático y Edema Maligno) y evaluación comparativa de su inmunogenicidad con productos comerciales. Tec. Pec. 31(1)25-32

Labranderos E. Hernández B. 1979. Evaluación de 5 bacterinas comerciales contra *Clostridium chauvoei*. Reunión Annual del Área Médica INIP-SARH.

Walter, P.D., Batty I. 1986. The use and standardization of multicomponent veterinary vaccines. Dev Biol Stand 65 227-236.

Amimoto, K., Sasaki, O., Isogai, M., Kitajima, T., Oishi, E., Okada, N., Yasahura, H., 1997. The protective effect of *Clostridium novyi* type B Alpha-Toxoid against challenge with spores in Guinea pigs. J. Vet. Med. Sci. 60(6): 681-685.

De Groot, B. D., Dewey, C.E., Griffin, D.D., Perino, L: J., Moxley, R.A., Hahn, G. L. 1997. Effect of booster vaccination with a multivalent clostridial bacterin-toxoid on sudden death syndrome mortality rate among feedlot cattle. JAVMA 211(6)749-753.

Troxel, T.R., Gadberry, M. S., Wallace, W.T., Kreider, D.L., Shockey, E.A., Colburn, E.A., Widel, P., Nicholson. Y. 2001. Clostridial antibody response from injection site lesions in beef cattle, long-term response to single or multiple dosis, and response in newborn beef calves. J. Anim. Sci. 79:2558-2564.

Cussler, K., Borrmann, E., Werner, E. 2002. Progress in the replacement of animal experiments in the quality control of clostridial vaccines. Dtsch tierarztl Wochenschr. 109(4): 172-177.

Manual de requerimientos mínimos para biológicos veterinarios. S.A.H.R. 1977.

Tenorio G. V., Ontiveros, C. L., Zárate, V. J. 1992. Análisis protéico de diferentes cepas de *Clostridium chauvoei*. Reunión de Investigación Pecuaria en México.

Cato, P.E., Hash. D.E., Holdeman. V.L., Moore, W.E., 1982. Electrophoretic

- study of *Clostridium* species. J. Clin. Microb. 15(4) 688-702.
- Hamoaka. F., Mori. Y., Terakado.N., and Nakamura. S. 1993. Similarity in the EDTA-soluble antigens of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. J. Gen Microbiol.139, 617-622.
- Hamoaka. T., Terakado. N., Nakamura, S. 1994. Diversity in molecular mass of the common EDTA soluble antigen of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. Microbiol- Immunol 38(2) 149-152.
- Guzmán, S. Immunological study of *Clostridium chauvoei* strains in San Luis. www.anaerobe.org/ao98/sspp.ntm
- Crichton, R, Harriss, D.A., and Mckay. D. J. 1986. Standards for *Clostridium chauvoei* vaccine. The relationship between the response of guinea pigs and sheep following vaccination and challenge with virulent *Clostridium chauvoei*. Aust. Vet. J. Vol 63 (3) 68-70.
- Micalizzi, B., Guzmán, A. 1997. Immunogenecity of an extract of *Clostridium chauvoei* in guinea pigs. Clin. Infect. Diseas.25(2) 5571-5572.
- Mattar, M.A., Cortiñas, T., Guzmán, A.M.S. 2002. Immunogenic protein variations of *Clostridium chauvoei* cellular antigens associated with the culture growth phase. FEMS Immunol Med. Microbiol . 33(1) 9-14.
- Chandler, H. M., Hamilton, R.C. 1975. The preparation of immunogenic cell wall from a higly protective strain of *Clostridium chauvoei*. *Gen Microbiol* .88(1)27-35.
- Micalizzi, B., Guzmán, A. 1995. Use of sugarcane molasses for culture of *Clostridium chauvoei* . Clin. Infect. Diseas. 20 (suppl2) 5382-5383.
- Di Genaro, M., Micalizzi, B., Guzmán, A. *Clostridium chauvoei*: immunological characterization of tour antigenic preparations. <http://www.anaerobe.org/ao98/sspp.ntm>
- White, V.J., Sojka, M.J. 1986. Immunoelectrophoresis in quality control of veterinary clostridial products. Dev Biol Stand 64 119-127.
- Walter, P.D., Batty I. 1986. The use and standardization of multicomponent veterinary vaccines. Dev Biol Stand 65 227-236.
- Gerald L. Hazelbaver, Howard C. Berg and Philip Matsumura. 1993. Bacterial

Motility and Signal Transduction. Cell, vol. 73, 15-22.

De Groot, B. D., Dewey, C.E., Griffin, D.D., Perino, L. J., Moxley, R.A., Hahn, G. L.. 1997. Effect of booster vaccination with a multivalent clostridial bacterin-toxoid on sudden death syndrome mortality rate among feedlot cattle. JAVMA 211(6)749-753.

Chandler. H.M., Gulasekharam, J. 1971. Removal and separation of flagella from cells of *Clostridium chauvoei* and preparation of a pure flagella suspension. Nature 230(5289) 121-122.

Chandler H.M. 1975. Rabbit immunoglobulin responses to the flagella, somatic and protective antigens of a highly protective strain of *Clostridium chauvoei*. Infection and Immunity 12(1) 143-147.

Tamura, Y., Tanaka., S. 1987. Opsonic activity of anti-flagellar serum against *Clostridium chauvoei* by mouse polymorphonuclear leucocytes. Vet. Microbiology 14:81-86

Hamoaka. F., Mori. Y., Terakado.N., and Nakamura. S. 1993. Similarity in the EDTA-soluble antigens of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. J. Gen Microbiol.139, 617-622.

Hamoaka. T., Terakado. N., Nakamura, S. 1994. Diversity in molecular mass of the common EDTA antígeno soluble of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. Microbiol- Immunol 38(2) 149-152.

Stevenson, J.R., Stonger, K.A. 1980. Protective cellular antigen of *Clostridium chauvoei*. Am. J. Vet. Res. 41(4) 650-653.

Tamura,Y., Kijima, M., Ohishi, K., Takahashi, T., Suzuki, S, Nakamura, M. 1992. Antigenic analysis of *Clostridium chauvoei* flagella with protective and non-protective monoclonal antibodies. J. Gen. Microbiol. 138 537-542.

Tamura, Y., Pijama, M., Auki, A., Ogikubo, Y., Takahashi, T. 1995. Reversible expresión of motility and flagella in *Clostridium chauvoei* and their relationship to virulence. Microbiol. 141 605-610.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Chandler, H. M., Hamilton, R.C. 1975. The preparation of immunogenic cell wall from a highly protective strain of *Clostridium chauvoei*. *Gen Microbiol* 88(1)27-35
- Poxton. I.R. 1981. Immunological analysis of the EDTA-soluble antigens of *Clostridium difficile* and related species. *J. Gen. Microbiol.* 122:41-46.
- Poxton. I.R. 1984. Demonstration of the common antigens of *Clostridium botulinum*, *C. sporogenes* and *C. novyi* by an enzyme-linked immunosorbent Assay and electroblot transfer. *J. Gen Microbiol.* 130 975-981.
- Claus, K.D., Mecheak, M. E. 1972. Preparation of a *Clostridium chauvoei* antigens and determination of protective immunity by plate agglutination tests. *Am. J. Vet. Res.* 33(5)1045-1050.
- Dailey. C. D., Schloemer. H. R. 1988. Cloning and expression of secreted antigens of *Clostridium difficile* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 56(6) 1655-1657
- Arnon, R. M., Regenmortel, V. 1992. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J.* 6:3265-3274.
- Michael, J., Mahan, J., Slauch, J., Mekalanous. 1993. Selection of Bacterial Virulence Gene That are specifically induced in Host Tissues. *Science* 259 686-688.
- Bolivar, Z.F. 1979. Recombinación *in vitro* de ácidos nucleicos: Ingeniería Genética Molecular. *Rev. Rat-amer. Microbiol.* 21:37-55
- Helfman, D.M., Féramisco, J.R., Fiddes, J.C., Thomas, G.P., Hughes, S, 1983. Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct immunological screening of a DNA expression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* No. 80, pag. 31-35, 1983.
- Miller, L.M., Kaper, B.J. 1994 Molecular genetics of bacteria pathogenesis. American Society for Microbiology.
- Dailey. C. D., Schloemer. H. R. 1988. Cloning and expression of secreted antigens of *Clostridium difficile* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*

56(6) 1655-1657.

Tenorio, G.V. Construcción de un banco genómico de *Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 1. Tesis Maestria, FES-Cuautitlán UNAM, 1990

Caselli. E., Boni.M., Di Luca D., Salvatori. D., Vita A.2005. A combined bovine herpesvirus 1 gB-gD DNA vaccine induces immune response in mice. *Com.Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Vol 28, 2:155-166.

Meynell, G.G. Theory and practice in experimental bacteriology. Cambridge at the University Press. 1965.

Crichton, R, Harriss, D.A., and Mckay. D. J. 1986. Standards for *Clostridium chauvoei* vaccine. The relationship between the response of guinea pigs and sheep following vaccination and challenge with virulent *Clostridium chauvoei*. *Aust. Vet. J.* Vol 63 (3) 68-70.

Amimoto, K., Oishi, E., Yasahura, H., Sasaki, O., Katayama, S., Kitajima, T., Izumida, A., Hirajar, T. 2001. Protective effects of *Clostridium sordelli* LT and HT toxoids against Challenge with spores in Guinea Pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 63(8):879-883.

Cameron, C.M., Botha, W.J.S and Schoeman, J.H. 1986. Immunization of guinea-pigs and cattle with a reduced dose *Clostridium chauvoei* vaccine produced in a semi-synthetic medium. *Ondersteport J. Vet. Res.* 53 51-53.

Amimoto, K., Sasaki, O., Isogai, M., Kitajima, T., Oishi, E., Okada, N., Yasahura, H., 1997. The protective effect of *Clostridium novyi* type B Alpha-Toxoid against challenge with spores in Guinea pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 60(6): 681-685.

Webster, A.C., Frank, C.L. 1985. Comparison of immune response stimulated in sheep, rabbits and guinea pigs by the administration of multi-component clostridial vaccines. *Aust Vet J.* 62(4) 112-114.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding Anal. Biochemistry. 72:248-254.

Laemmli, U.K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, No. 227, pag. 680-685.

Towbin, H., Staehelin. T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

Cleveland D.W, Stuart G. Fischer. Marc W. Kirschner, Ulrich H. Laemmli. 1997. Peptide Mapping by limited proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis The Journal of. Biological Chemistry. Vol. 22 No. 3 1102-1106.

Shelley, R.H., Rasburn, B., Matthews, R.C., Tabaqchali, S. 1986. Immunoblotting to demonstrate antigenic and immunogenic differences among nine standard strains of *Clostridium difficile*. J. Clinical Microbiol. 24(3) 384-387.

Maniatis, T., Fritsch, E. And Sambrook, J., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. York, USA.

Theron, J., Cloete, T.E. 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. Clin. Rev. Microbiol. 26(1) 37-57.

Kojima, A., Uchida, I., Sekizaki, T., Sasaki, Y., Ogikubo, Y., Kijima, M., Tamura, Y. 2000. Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*. Vet. Microbiol. 76: 359-372.

Davis, L., Dibner, M., Battey. 1986. J. Basic methods in molecular biology. Elsevier, N. York, USA.

Birmboim, H., Doly, D. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Acids Res. 7(6) 1513-1523.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Echerichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.

Cepaldo, F.N. Ramsey, G. and Barbour, S. 1974. Analysis of the growth of recombination-deficient strain of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 106:204-212.

Little, M., Fuchs, P., Breitling, F., Dubel, S. 1993. Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology. *Tibtech* 11 3-5.

Kojima, A., Amimoto K, Ohgitam T., Tamura, Y. 1999. Characterization of Flagellin from *Clostridium chauvoei*. *Vet. Microbiol.* 67: 231-237.

Kojima-A; Uchida-I; Sekizaki-T; Sasaki-Y; Ogikubo-Y; Tamura-Y. 2001 Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. *Veterinary-Microbiology.* 78: 4, 363-371.

Baca Rivera Jesús Alejandro. Tesis que para obtener el grado de licenciatura. Elaboración de un inmunógeno contra Clostridiosis (Carbón Sintomático y Edema Maligno) y evaluación comparativa de la inmunogenicidad en los productos comerciales. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM. (1987).

Schocken Iturrino RP., Neves EB., Gama L FSAM., Carvalho ACFB., Avila FA; Schocken PF., Berchielli SCP. 2000. Presence of viable spores of bacteria of the genus *Clostridium* in muscle and liver of bovine slaughtered for consumption. *Ars Veterinaria.* 2000, 16: 2, 109-111.

Claude Leclere. 2003. New approaches in vaccine development. *Com. Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* Vol 26, 5:329-341.

Frede. M. and Aguado T. 2005 Need for new vaccine formulation and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews.* Vol 57.3:325-331.