

ELABORACION DE UN INMUNOGENO CONTRA CLOSTRIDIASIS (CARBON SINTOMATICO Y EDEMA MALIGNO) Y EVALUACION COMPARATIVA DE SU INMUNOGENICIDAD CON PRODUCTOS COMERCIALES. ^a

Lourdes Ontiveros Corpus ^b

Victor Tenorio Gutiérrez ^b

Alejandro Baca Rivera ^c

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue elaborar un inmunógeno contra las infecciones causadas por *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* y evaluar su capacidad inmunogénica, comparada con la de cuatro biológicos comerciales (A, B, C, D). Se elaboraron bacterinas, toxoides y bacterinas-toxoides de ambos microorganismos por inactivación con formalina. Se formaron siete grupos de cuatro cuyes cada uno, para ser inoculados con los biológicos elaborados, los productos comerciales y su grupo control. Para el desafío se determinó primero el número de esporas con el cual se obtenía un 100% de mortalidad. Las bacterinas elaboradas de cada cepa confirieron una protección del 100% al desafío con *C. septicum* y sólo un 60% con *C. chauvoei*. Los toxoides obtenidos de ambas cepas no confirieron protección, y la bacterina-toxoide elaborada sólo protegió un 20%. Los biológicos comerciales a pesar de producir un alto título de anticuerpos, no confirieron ninguna protección al desafío con *C. chauvoei*, pero con *C. septicum* se obtuvo una protección del 100%. Lo que demuestra que las cepas de *C. chauvoei* utilizadas en la producción de los biológicos no confieren protección a pesar de ser altamente inmunogénicas.

Téc. Pecu. Méx. Vol. 31 No. 1 (1993)

INTRODUCCION

El carbón sintomático se clasifica dentro de las enfermedades que producen gangrena gaseosa ³, su agente etiológico es *C. chauvoei*. Esta enfermedad afecta al ganado bovino, caprino y ovino principalmente, la vía de infección más común es la oral, aunque en ocasiones puede presentarse por vía cutánea a través de lesiones. El período de incubación en la mayoría de los casos es de uno a tres días y se manifiesta por cojeras agudas con tumefacción caliente y crepitante, posteriormente es fría; la enfermedad es mortal de 12 a 48 h después de la aparición de los primeros signos clínicos ^{2,14}.

El agente etiológico del edema maligno es *C. septicum*, que se encuentra naturalmente en el tracto gastrointestinal de los herbívoros, contaminando posteriormente las tierras y pastos. La infección natural se realiza mediante lesiones bucales o cutáneas; los signos clínicos se manifiestan por tumefacción edematosa local blanda, con gas y exudado gelatinoso y fiebre elevada ^{2,13}.

El tratamiento de las infecciones e intoxicaciones causadas por *Clostridium spp* es de valor limitado, pues en la mayoría de los casos, el curso de la enfermedad es tan rápido que los animales se encuentran moribundos o muertos antes de que el tratamiento pueda ser considerado; sin embargo todas las infecciones e intoxicaciones por *Clostridium spp* pueden ser prevenidas por inmunización ^{4,12,13}.

Durante los años de 1970-1977 el país sufrió un brote agudo de clostridiasis (car-

a Recibido para su publicación el 14 de febrero de 1992.

b CENID-Microbiología, INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. Méx. Tol. Palo Alto, D.F. 05110, Cuajimalpa.

c Laboratorios BROBEL México, D.F.

bón sintomático) que causó pérdidas cuantiosas a la ganadería nacional; y el no contar con biológicos de buena calidad permitió que el número de brotes se incrementara ¹.

Durante la epizootia, en 1976-1977 Bojorquez *et. al* ¹ evaluaron la potencia de las bacterinas existentes en el país, encontrando resultados nada halagadores, por lo que se recomendó revisar los métodos de producción y periódicamente la calidad de los productos que se distribuían contra esta enfermedad en México. Labradero *et. al* ⁶ informaron que ninguna de cinco bacterinas comerciales probadas cumplió con los requerimientos mínimos de potencia exigidos por el departamento de Control de Producción de Biológicos, Farmacéuticos, Alimentos y Equipos para Animales de la Subsecretaría de Ganadería de la Dirección General de Sanidad Animal SARH ⁸.

En México son escasos los estudios realizados sobre esta enfermedad, por lo que es necesario contar con métodos de evaluación adecuados para los productos biológicos que actualmente se expenden en el mercado nacional.

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la protección conferida por productos biológicos elaborados con *C. chauvoei* y *C. septicum* así como la de cuatro productos comerciales.

MATERIALES Y METODOS

La producción de los antígenos tanto de *C. chauvoei* como de *C. septicum* se llevó a cabo mediante la siguiente metodología.

Bacterinas. Se prepararon 500 ml de medio de Claus y Macheak ^{5,11}, los cuales se inocularon con 2.5 ml de una suspensión de esporas y se incubaron 15 h a 37 C; posteriormente se verificó la pureza del desarrollo y se inactivó con una cantidad suficiente de formaldehído, para llegar a una concentración final del 1%, manteniéndose a 37 C por 18 h. Se obtuvo el paquete celular por centrifugación, el cual se lavó tres veces con PBS, y finalmente se resuspendieron a una concentración de 1.2×10^9 células/ml, agregándosele timerosal a una concentración

de 1:10,000 para evitar contaminación.

Toxoide. El líquido sobrenadante que se obtuvo de la separación del paquete celular, se recolectó y se tomó como toxoide de cada una de las especies trabajadas.

La concentración de las bacterinas se determinó por el método del Nefelómetro de Macfarland ⁹; la concentración del toxoide se realizó por la técnica de Lowry *et. al* ⁷.

Las pruebas utilizadas para evaluar los títulos de anticuerpos fueron fijación de complemento y aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol ¹⁰. Se denominó con una letra a las bacterinas y toxoides utilizados en este estudio:

A. Bacterina Triple Comercial (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *Pasteurella*).

B. Bacterina Triple Comercial (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *Pasteurella*).

C. Bacterina Triple Comercial (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *Pasteurella*).

D. Bacterina Doble Comercial (*C. chauvoei*, *Pasteurella*).

E. Bacterina Doble Experimental (*C. chauvoei*, *C. septicum*).

F. Toxoide Doble Experimental (*C. chauvoei*, *C. septicum*).

G. Bacterina-Toxoide Experimental (*C. chauvoei*, *C. septicum*).

Se formaron 15 grupos de cuatro cuyes cada uno, con 300 g de peso por individuo, en los que se probó la potencia de cada uno de los biológicos utilizados, tomándose un grupo control para cada biológico.

Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea con 1/10 de la dosis recomendada, por el fabricante para bovinos, repitiendo esta dosis a los 7, 14 y 21 días; el desafío se realizó 14 días después de la última inoculación, con 10 DL 100 de suspensión de esporas de cada una de las especies ^{2,3}. Se consideró animal protegido

aquel que sobrevivía más de 72 h después del desafío.

Los animales se sangraron antes de cada inoculación por punción cardiaca; el suero obtenido se utilizó para realizar las pruebas serológicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se presenta el título de anticuerpos obtenidos con fijación de complemento contra *C. chauvoei*, en la cual se puede ver que a los 28 días posinoculación presenta títulos de 1:8 en las bacterinas A, B, C y E, 1:4 D y F; y 1:256 en G, encontrándose en los controles títulos 1:2.

En la figura 2 se muestra la protección al desafío con *C. chauvoei* de animales inmunizados con las bacterinas A, B, C, D, E, F y G encontrándose que el resultado general es la muerte de más de la mitad de los animales en las bacterinas A, B, C, D, F, pues sólo confirió protección E en un 60% y G en un 20%. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Bojorquez *et. al*¹, al experimentar nuevos inmunógenos contra este microorganismo.

Se observó que de los animales inmunizados con las bacterinas comerciales (A, B, C, D) que contenían *C. chauvoei* y *Pasteurella spp* ninguno sobrevivió al desafío, aún cuando presentaron título de 1:8. Resultados semejantes fueron informados en un estudio realizado por Labradero *et. al*⁶, quienes al probar cinco bacterinas comerciales semejantes a las de este trabajo encontraron que ninguna confirió protección al desafío; por lo que se recomendó revisar los métodos de producción y periódicamente la calidad de estos productos que se distribuyen contra esta enfermedad en México. Lo anterior es necesario ya que los biológicos elaborados en este trabajo no cumplieron los requisitos de protección de un 80% exigidos por el Departamento de Control de Producción de Biológicos, Farmacéuticos, Alimenticios y Equipos para Animales de la Subsecretaría de Ganadería de la Dirección General de Sanidad Animal SARH⁸. Esto no obstante que se alcanzó

una protección de un 60% con la bacterina y un 20% con la bacterina-toxoide; resultados muy por arriba de los obtenidos con los otros productos. Esto sugiere que las cepas utilizadas para la elaboración de estos productos, no conducen a la producción de anticuerpos protectores aún cuando son inmunogénicas¹⁵. Esto quizás sea debido a que las cepas presentes en el campo son diferentes en su mosaico antigénico.

En la figura 3 se muestra el título de anticuerpos contra *C. septicum* con fijación de complemento, alcanzando a los 28 días posinoculación títulos de 1:2 en D, de 1:4 en B y C; 1:8 en A, E y G, y 1:16 en F mientras que en los controles fue de 1:2.

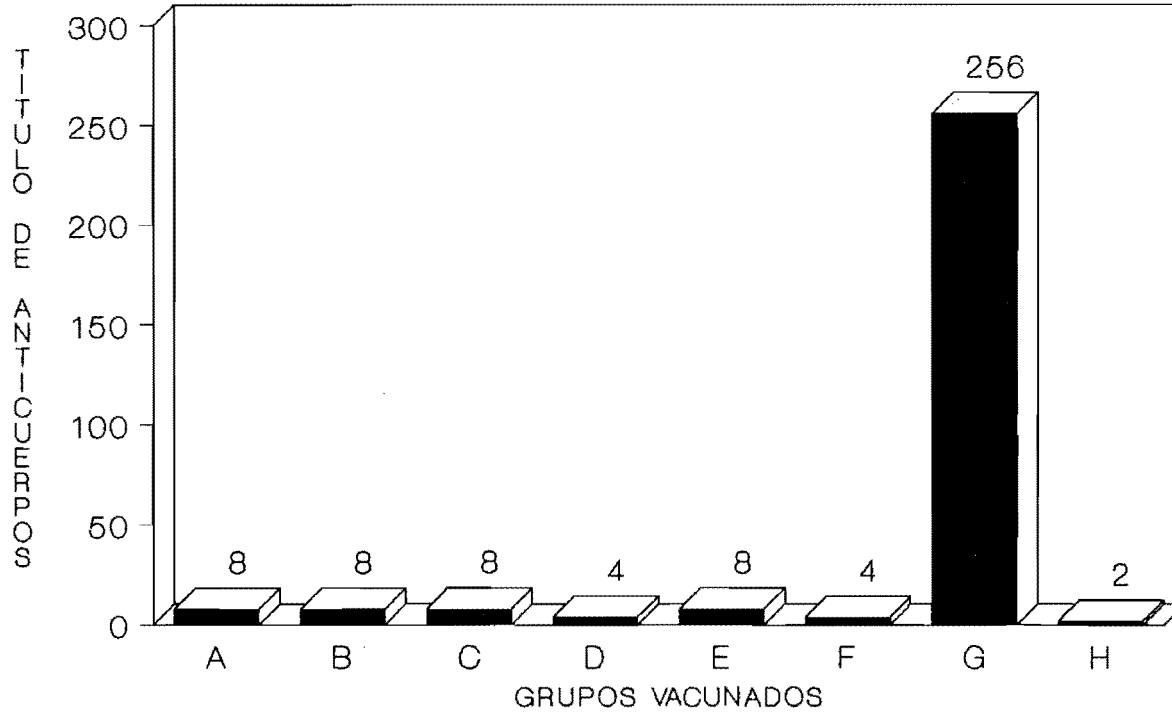
En la figura 4 se presenta la protección al desafío con *C. septicum* para las bacterinas A, B, C, E, F y G encontrándose un 100% de sobrevivencia en los animales, no siendo así para la bacterina D que contenía sólo *C. chauvoei* y *Pasteurella spp* donde se encontró que el 100% de los animales murieron al igual que en los grupos controles.

Tanto para las bacterinas comerciales como para las elaboradas en este trabajo con *C. septicum* se obtuvo un 100% de protección al desafío, no murió ningún animal, sin embargo en los animales controles murieron todos antes de las 72 h, lo cual indica que los productos elaborados contra este microorganismo son altamente eficientes.

La administración de Bacterina-Toxoide indujo poca protección y el toxoide no protegió, por lo que, para aumentar la protección hay que separar la bacteria para administrarla como inmunógeno. Ya que al parecer el toxoide tiene acción inmunodominante, pero no protectora, pues siempre que se inmuniza con este biológico se obtienen buenos títulos de anticuerpos, pero los animales no son protegidos por estos. Este fenómeno también fue observado por Bojórquez *et. al*¹.

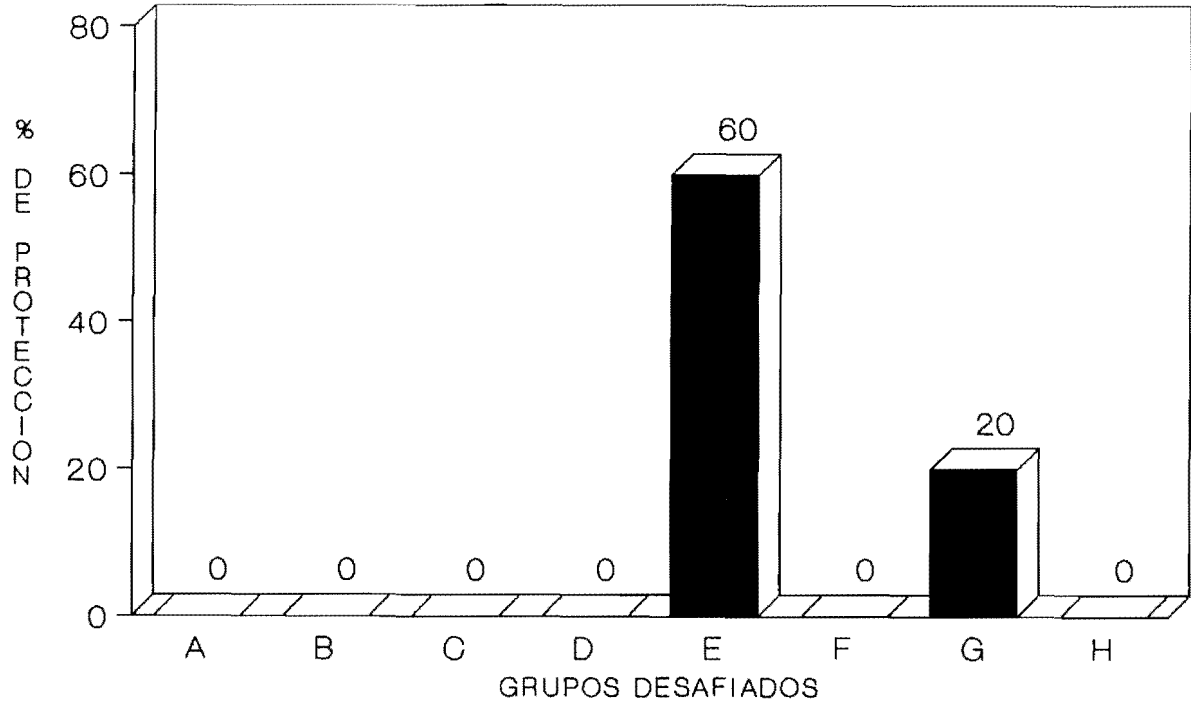
Los biológicos probados en este trabajo no confieren inmunidad cruzada. Se cree que las cepas de *C. chauvoei* utilizadas en la producción de biológicos no confieren protección a pesar de ser inmunogénicas.

FIGURA 1. TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA *C. chauvoei* CON FIJACION DE COMPLEMENTO



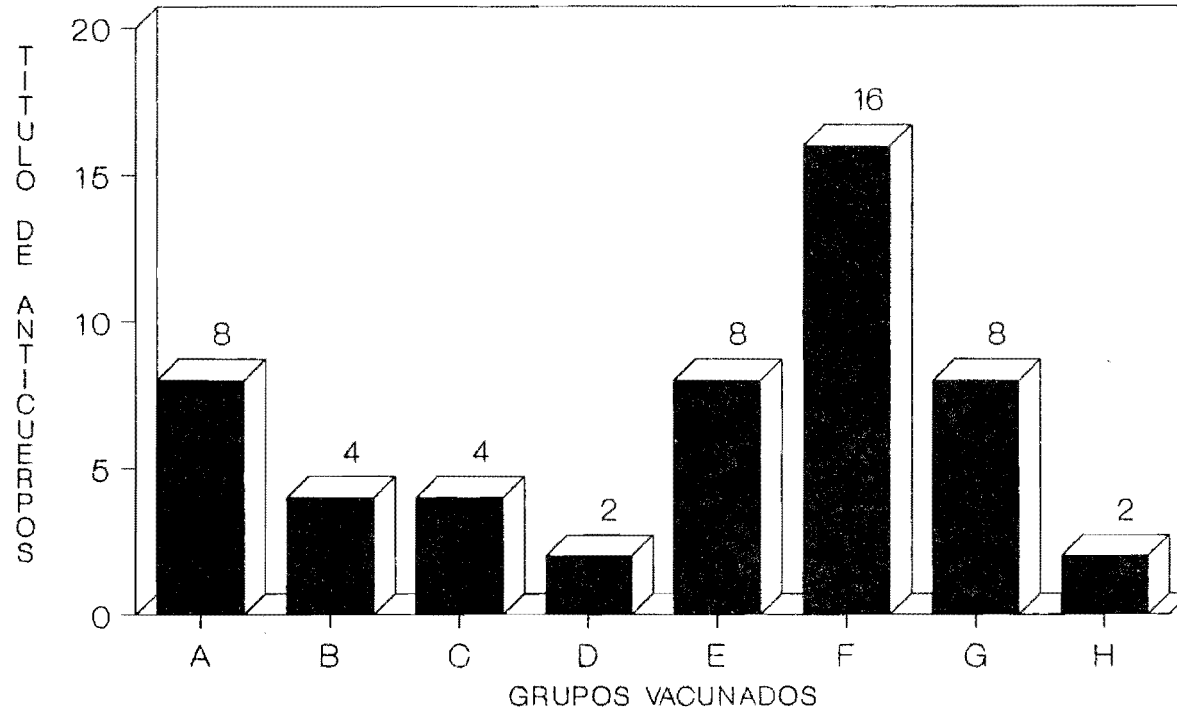
A, B, C y D Biológicos comerciales
E, F y G Biológicos experimentales
H Grupo control

FIGURA 2. PROTECCION AL DESAFIO CON
C. chauvoei



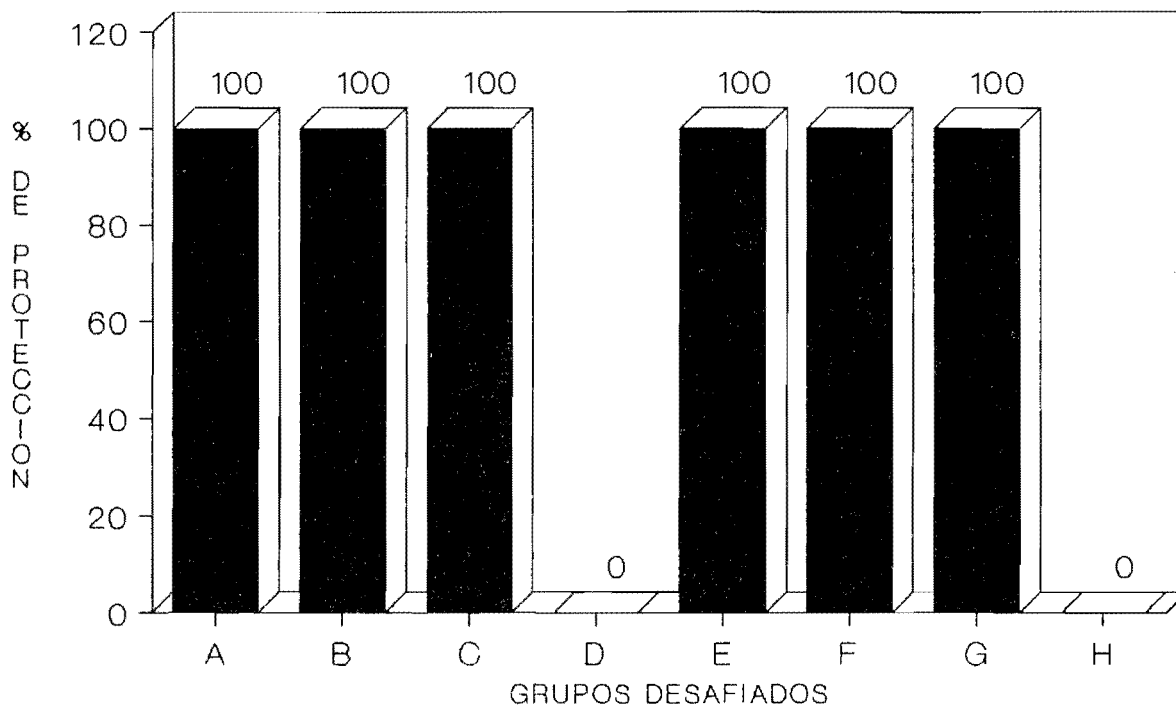
A, B, C y D. Biológicos comerciales
E, F y D Biológicos experimentales
H Grupo control

FIGURA 3. TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA *C. septicum* CON FIJACION DE COMPLEMENTO



A, B, C y D Biológicos comerciales
E, F y G Biológicos experimentales
H Grupo control

FIGURA 4. PROTECCION AL DESAFIO CON
C. septicum.



A, B, C y D Biológicos comerciales
E, F y G Biológicos experimentales
H Grupos control

En este trabajo se observó que al desafío, sólo presenta protección con las bacterinas elaboradas con las especies homólogas, y no hay protección con especies heterólogas.

Se puede concluir que los productos comerciales que se probaron en este trabajo no protegen contra carbón sintomático, no obstante de inducir títulos de anticuerpos.

Todos los biológicos, tanto comerciales como experimentales, indujeron títulos de anticuerpos y protección al desafío contra *C. septicum*.

Es necesario revisar los métodos de producción de estos biológicos, en especial los que contienen *C. chauvoei*.

SUMMARY

The aim of this work was to obtain a set of immunogens against the diseases caused by *Clostridium Chauvoei* and *C. septicum* and to evaluate its immunogenic capability. In addition, four commercial products containing these organisms were evaluated to assess their immunogenic activity. The microorganisms were inactivated with formaline and sets of bacterins, toxoids and bacterins-toxoids were developed. Seven groups of four guinea pigs each were inoculated with either the developed biologicals or the commercial products, and four animals were included as controls. Both developed bacterins gave a 100% protection against *C. septicum*, but only 60% of the animals were protected against *C. chauvoei*. The elaborated toxoids, did not confer any protection and the bacterin-toxoid vaccine protected only 20% of the vaccinated animals. Animals immunized with the commercial products produced a high antibody titer against *C. chauvoei*. However the commercial biologicals did not confer any protection against *C. chauvoei* challenge, but they did protect a 100% of the animals against *C. septicum*. It was concluded that the *C. chauvoei* strain used here to produce the bacterins did not confer any protection; however, they elicited a high antibody titer to *C. chauvoei* in the vaccinated animals.

LITERATURA CITADA

1. BOJORQUÉZ, L. SUAREZ, F. NAJERA, H. PIJOAN, C. Investigación de nuevos inmunógenos contra carbón sintomático. *Reunión Anual del Area Médica, INIP-SARH*. 1979.
2. BROWN, K.K. PARIK, R.E. STEWART, R.C. Preven-

tion of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with a multivalent bacterina-toxoid. *Veterinary Med/Small Animal Clinician*. 1976, 12, 1717.

3. CARTER, G.R. Essentials of Veterinary Bacteriology and Micology. Michigan State University Press, East Lansing, E.U. 1982, (23) 130.

4. CLAUS, K.D. KOLBE, D.R. Immunogenicity of *Clostridium septicum* in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1979, 40 (12) 1752.

5. CLAUS K. MECHEAK M. Preparation of a *Clostridium chauvoei* antigens and determination of protective immunity by plate agglutination test. *Am. J. Vet. Res.* 1972, 33 (5) 1045.

6. LABRANDERO E. y HERNANDEZ B. Evaluación de 5 bacterinas comerciales contra *Clostridium chauvoei*. *Reunión Anual del Area Médica, INIP-SARH*. 1979.

7. LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L. and RALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chemys.* 1951, (193) 265.

8. Manual de Requerimientos Mínimos para Biológicos Veterinarios, SARH, 1977.

9. MC. FARLAND, J. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacterina in suspension used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 1957, (49) 1179.

10. MANCERA M, A. et. al., 1986, "Manual de Inmunología" por Morilla G. y Bautista G. Ed. Diana.

11. SIOMORA MARTINEZ. Crecimiento de *Clostridium perfringes* en diferentes medios. *Revista de Salud Animal*. 1983, (5) 259.

12. STERNE M. "Clostridial infections". *Br. Vet. J.* 1983, 137 (5) 259.

13. STERNE, M. "Algunos aspectos del diagnóstico y control de las enfermedades por clostridios". *Veterinaria Montevideo*. 1979, 15 (70) 73.

14. TREVOR WILLIS, A. Anaerobic Bacteriology Chemical and Laboratory Practice. 3ra. Ed. London Boston. 1977.

15. WELLS, P.W. Development of a combined clostridial and *Pasteurella haemolytica* vaccine for sheep. *Vet. Rec.* 1984, (114) 266.