

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**"RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN BOVINOS VACUNADOS CONTRA
Clostridium chauvoei, USANDO UNA VACUNA COMERCIAL"**

Por

**BERMÚDEZ TORRES, Juan Ignacio
FRANÇA FERREYRA, Stefanía
MALAQUIN DUTRA da SILVEIRA, Carlos Alfonso**

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

.....
Dr. Uruguaysito Benavides

Segundo Miembro (Tutor):

.....
Dr. Milton Cattáneo

Tercer Miembro:

.....
Dr. Carolina Acevedo

Fecha:1/10/2013.....

Autores:

.....
Juan Ignacio Bermúdez Torres

.....
Stefanía França Ferreyra

.....
Carlos Alfonso Malaquin Dutra da Silveira

AGRADECIMIENTOS

1. Dres. Milton Cattáneo y Julián Bermúdez por su dedicación y colaboración permanente.
2. Laboratorios SANTA ELENA S.A por su especial disposición y por facilitarnos el material necesario para el presente experimento.
3. Ing. Alfredo Leániz (Establecimiento MACONDO) por su apoyo, generosidad y contribución.
4. Ing. Quim. Leonardo Acosta de Laboratorios SANTA ELENA S.A por su contribución en el diseño estadístico de la prueba.
5. Dra. Adriana Perera (DILAVE) por su especial disposición.
6. A todo el personal del establecimiento MACONDO de Florida, por su permanente colaboración y disposición en el desarrollo experimental de la tesis.
7. Grupo de Trabajo del laboratorio del Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria por ayudarnos y facilitarnos la utilización de los instrumentos en las distintas tareas.
8. A todos de los integrantes del Grupo de Producción Animal 2011.
9. A nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional recibido durante la realización de la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	7
1 RESUMEN.....	8
2 SUMMARY.....	8
3 INTRODUCCIÓN.....	9
3.1 GENERALIDADES SOBRE CLOSTRIDIOSIS.....	9
3.1.1 ENTEROTOXEMIA.....	10
3.1.2 EDEMA MALIGNO.....	11
3.1.3 HEPATITIS NECRÓTICA INFECCIOSA.....	11
3.1.4 HEMOGLOBINURIA BACILAR.....	12
3.1.5 TÉTANOS.....	12
3.1.6 BOTULISMO.....	13
3.2 CLOSTRIDIUM CHAUVOEI.....	13
3.2.1 CLASIFICACIÓN Y MORFOLOGÍA.....	13
3.2.2 LA ENFERMEDAD.....	14
3.2.3 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	15
3.2.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	19
3.2.5 CLOSTRIDIOSIS EN URUGUAY.....	21
4 CALIDAD DE LAS VACUNAS UTILIZADAS EN LA..... PROFILAXIS DE LAS CLOSTRIDIOSIS EN EL URUGUAY.....	22
4.1 PARÁMETROS QUE SE EVALÚAN PARA LA ACEPTACIÓN DE..... UNA VACUNA COMERCIAL.....	24
4.1.1 PRUEBA DE POTENCIA O EFICACIA INMUNOLÓGICA PARA..... C. CHAUVOEI.....	24
5 RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN BOVINOS..... CON ANTÍGENO DE C. CHAUVOEI.....	25
6 HIPÓTESIS.....	26
7 OBJETIVOS.....	27
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	27
7.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27

8	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
8.1	PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO AGLUTINANTE.....	27
8.1.1	CEPA.....	27
8.1.2	MEDIO DE CULTIVO.....	27
8.1.3	PREPARACIÓN DEL CULTIVO.....	27
8.1.4	ESTANDARIZACIÓN DEL ANTIGENO AGLUTINANTE.....	28
8.2	ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA CEPA A.....	
	UTILIZAR EN LA VACUNA.....	28
8.3	DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN PLACA.....	28
8.3.1	FUNDAMENTACIÓN DE LA TÉCNICA.....	28
8.3.2	PROCEDIMIENTO.....	28
8.3.3	INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA.....	29
8.4	DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE.....	
	ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES VACUNADOS.....	29
8.4.1	ANIMALES, PLAN DE VACUNACIÓN Y SANGRADOS.....	29
8.4.2	VACUNA.....	29
8.5	ANÁLISIS DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS.....	30
9	RESULTADOS.....	30
9.1	PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO AGLUTINANTE.....	30
9.2	ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE.....	
	LA CEPA DE C.CHAUVOEI.....	31
9.3	DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN.....	32
9.4	DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE.....	
	ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES VACUNADOS.....	33
9.4.1	TÍTULOS DE ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES CONTRO.....	33
9.4.2	TÍTULOS DE ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES VACUNADOS.....	33
9.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.....	34
9.5.1	PRUEBA T ($P < 0,05$).....	35
9.5.2	VALOR MEDIO DE OBTENCIÓN DE AGLUTINACIÓN.....	35
10	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	36
11	BIBLIOGRAFÍA.....	37
12	ANEXOS.....	41

12.1	EVALUACIÓN DE BIOLÓGICOS EN EL URUGUAY.....	41
12.1.1	PROCEDIMEINTOS PARA EL REGISTRO..... DE RODUCTOS VETERINARIOS.....	41
12.1.2	DOCUMENTACIÓN NECESARIA PARA..... PRODUCTOS BIOLÓGICOS.....	41
12.1.3	PRUEBAS QUE SE REALIZAN.....	42

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS	Página
Cuadro 1 Clasificación de <i>C. perfringens</i> de acuerdo con las principales toxinas consideradas como importantes factores de virulencia.....	10
Cuadro 2 Pruebas bioquímicas de los Clostridios.....	17
Cuadro 3 Enfermedades clostridiales diagnosticadas en Uruguay.....	21
Cuadro 4 Vacunas clostridiales registradas en nuestro país.....	22
Cuadro 5 Prueba de desafío en cobayos	25
Cuadro 6 Diluciones de los sueros.....	29
Cuadro 7 Registro de vacunación y sangrado del grupo control.....	30
Cuadro 8 Resultados del primer sangrado.....	33
Cuadro 9 Resultados del segundo sangrado.....	33
Cuadro 10 Resultados del tercer sangrado.....	34
Cuadro 11 Títulos del inverso del volumen de suero.....	34
FIGURAS	
Figura 1 Lesiones de mancha en bovinos.....	15
Figura 2 Colonias de <i>Clostridium chauvoei</i>	16
Figura 3 Inmunofluorescencia directa de <i>Clostridium chauvoei</i>	18
Figura 4 PCR de <i>Clostridium chauvoei</i> (516 pb) y <i>Clostridium septicum</i> (270 pb).....	18
Figura 5 <i>C. chauvoei</i> en músculo estriado por inmunohistoquímica(Flecha).....	19
Figura 6 Observación de flagelos de <i>C. chauvoei</i> por microscopía electrónica.....	31
Figura 7 Observación de flagelos de <i>C. chauvoei</i> por microscopía electrónica.....	32
Figura 8 Técnica de aglutinación en placa.....	32
Gráficos	
Gráfico 1 Títulos del inverso del volumen de suero.....	35

1 RESUMEN

Clostridium chauvoei es causante del carbunco sintomático o mancha en bovinos. La enfermedad está presente en Uruguay y se estima una pérdida de US\$ 100 millones anuales en el sector ganadero debido a la no prevención contra las enfermedades clostridiales. La hipótesis de este trabajo es que la vacuna en estudio produciría anticuerpos en concentración protectora contra *Clostridium chauvoei*. Por este motivo el objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta de anticuerpos contra *Clostridium chauvoei* en bovinos vacunados con una nueva vacuna comercial en desarrollo, utilizando la técnica de aglutinación en placa. Se utilizaron n= 20 bovinos, cruce, hembras de entre 6 y 8 meses edad, sin vacunación previa contra *Clostridium chauvoei*. Se dividieron al azar en dos grupos de n=10 cada uno. El grupo 1 fue el testigo al cual se lo vacunó con un placebo. El grupo 2 fue el grupo vacunado al cual se le inoculó con 5 mL de la vacuna a testear. Ambos grupos se revacunaron a los 20 días. La prueba de aglutinación se realizó en placa de vidrio en donde se mezclaron diferentes volúmenes de suero frente a 50 µL de antígeno patrón. El título del suero fue la mínima cantidad que aglutinó 50 µL de antígeno. Se consideró un título protector cuando 0.5 µL o menos del suero problema aglutinaron 50 µL del antígeno estandarizado. Los animales vacunados presentaron títulos protectivos a los 20 días de la revacunación. Con los datos obtenidos podemos asegurar, con un 95 % nivel de confianza, que las medias de los títulos entre los sangrados fueron significativamente distintos ($P = <0,05$). La vacuna generó anticuerpos protectivos contra *C. chauvoei* confirmando la hipótesis planteada.

2 SUMMARY

Black leg is produced by *Clostridium chauvoei*, causing important economic losses, in our country there are estimated about US\$ 100 million annually due to the lack of prevention of clostridial diseases. The hypothesis of this study was to evaluate whether the study vaccine would produce antibodies in protective concentration against *Clostridium chauvoei*. Therefore the aim of this work was to study the antibody response against *Clostridium chauvoei* in cattle vaccinated with a new commercial vaccine in development, using the agglutination technique. We used n = 20 bovines, crosse breed, females between 6 and 8 months old, with no previous vaccination against *Clostridium chauvoei*. They were divided randomly into two groups of n = 10 each. Group 1 was the control which was vaccinated with a placebo. Group 2 was the vaccinated group which was inoculated with 5 mL of the vaccine tested. Both groups were boosted after 20 days. The agglutination test was performed on a glass plaque where different serum volumes were mixed against 50 µL of standard antigen. The serum title was the minimum amount that agglutinated 50 µL of antigen. Title was considered protective when 0.5 µL or less of the problem serum agglutinated 50 µL of the standardized antigen. Vaccinated animals showed protective titles 20 days after revaccination. With the data obtained we can say with 95% confidence level that the averages of the titles between bleedings were significantly different ($P = <0.05$). The vaccine induced protective antibodies against *Clostridium chauvoei* confirming the hypothesis.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 GENERALIDADES SOBRE CLOSTRIDIOSIS

Las clostridiosis son enfermedades toxico-infecciosas, producidas por bacterias del género *Clostridium*, caracterizadas por requerir condiciones de anaerobiosis para su crecimiento y desarrollo, poseer una forma bacilar, con esporas generalmente deformantes, y tomar positivamente la coloración de Gram. Son telúricos, nitrificantes y productores de gas. Son enfermedades conocidas desde la antigüedad y se caracterizan por ser súbitas, con alta tasa de prevalencia y mortalidad (alta tasa de letalidad). (De Freitas, 1987; Radostits, 2002; Uzal, 2008).

Las especies de *Clostridium* son patógenos que se caracterizan por la capacidad de sintetizar exotoxinas capaces de modificar la fisiología y la funcionalidad de las células del organismo huésped, provocando alteraciones bioquímicas en su estructura (Radostits, 2002). Luego de ser secretadas al medio que rodea la bacteria son absorbidas por el medio interno (toxemia), alcanzando zonas de acción específica y ejerciendo su acción patógena mediante alguno de estos procedimientos:

- Hidrolizando componentes esenciales de la integridad de los tejidos, como la lecitina y el colágeno
- Alterando la permeabilidad capilar y produciendo como consecuencia edemas
- Hemólisis
- Hidrolizando las uniones trabeculares de los tejidos a través de hialuronidasas
- Produciendo neurotoxinas que bloquean la liberación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas (De Freitas, 1987).

Según su capacidad invasiva las especies clostridiales se separan en dos grupos:

- No invasoras o toxi-infecciosas, caracterizadas por tener poco poder de multiplicación en tejidos vivos, y ser productoras de toxinas muy potentes. Dentro de ellos están incluidos los agentes causales de tétanos y botulismo.
- Invasoras, con gran capacidad para colonizar tejidos, productoras de toxinas de variada potencia sin llegar a la toxicidad de los agentes no invasores. Incluye a las especies causantes de mancha, edema maligno, enterotoxemia, etc. (Uzal, 2008).

Se destacan dos características propias de las clostridiosis: no se transmiten por contacto directo, o sea que son enfermedades infecciosas no contagiosas; y tienen incidencia esporádica o enzoótica, variando según parámetros regionales, climáticos, de manejo, alimenticios o sanitarios. Se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y en el tracto digestivo de los rumiantes sanos. Están difundidas por todo el mundo, y existen regiones en las que ciertas especies son enzoóticas. El carácter ubicuo de estos microorganismos hace que la erradicación de las enfermedades por las especies de *Clostridium* sea prácticamente imposible y necesite un control mediante medidas profilácticas. Las esporas de clostridios tienen distinta presencia en el suelo, habiendo especies como el *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) que se encuentra en todos los suelos, o especies como el *Clostridium tetani* (*C. tetani*) que se encuentra con mayor prevalencia en tierra cultivada.

Afortunadamente, las enfermedades de este grupo son únicas entre las bacterias porque se pueden evitar eficazmente en casi todas las situaciones mediante la vacunación y medidas de manejo (Sterne, 1981; De Freitas, 1987; Radostits, 2002; Uzal, 2008).

Existen en la literatura distintas clasificaciones de las enfermedades histotóxicas producidas por clostridios. Aquí presentamos una clasificación basada en el tipo de enfermedad producida (Uzal, 2013).

1. Grupo mancha/gangrena gaseosa
Enfermedades producidas por *Clostridium chauvoei* (*C. chauvoei*), *Clostridium septicum* (*C. septicum*), *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), *Clostridium novyi* (*C. novyi*), *Clostridium sordellii* (*C. sordellii*).
2. Grupo infecciones hepáticas
Enfermedades causadas por *C. novyi*
Enfermedades causadas por *Clostridium piliforme* (*C. piliforme*)
3. Grupo neurotóxicas
Enfermedades causadas por *Clostridium tetani* (*C. tetani*)
Enfermedades causadas por *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*)

3.1.1 ENTEROTOXEMIA

Enterotoxemia es el término empleado para denominar aquellas enfermedades causadas por las toxinas de los diferentes tipos de *C. perfringens* dentro del intestino. Existen 5 tipos diferentes de *C. perfringens*; A, B, C, D y E productores cada uno de ellos de 4 toxinas principales, alfa, beta, épsilon e iota. Cada tipo está asociado con una infección entérica específica que varía con cada animal. Estas toxinas junto a la enterotoxina y la toxina beta 2 son consideradas como importantes factores para la virulencia de este agente. ^{(Cuadro 1).}

Cuadro 1. Clasificación de *C. perfringens* de acuerdo con la producción de las principales toxinas (Silva, 2006).

	Toxina alfa	Toxina beta	Toxina épsilon	Toxina iota	Toxina Beta 2	Enterotoxina
<i>C. perfringens</i> tipo A	X				X	X
<i>C. perfringens</i> tipo B	X	X	X			X
<i>C. perfringens</i> tipo C	X	X			X	X
<i>C. perfringens</i> tipo D	X		X			X
<i>C. perfringens</i> tipo E	X			X		X

El *C. perfringens* tipo A produce la toxina alfa siendo asociado a gangrena gaseosa y dolencias entéricas de animales domésticos. El tipo B produce toxinas alfa, beta, épsilon y está asociado a enterotoxemia y disentería en corderos. *C. perfringens* tipo C, productor de toxinas alfa y beta, es la causa primaria de enteritis necrótica en lechones con edades entre 0 a 2 semanas y de enterotoxemia en rumiantes. El *C. perfringens* tipo D productor de toxinas alfa y épsilon es la causa más común de enterotoxemia en ovinos y caprinos. El tipo E produce toxinas alfa e iota y está asociado a enterotoxemia en los animales domésticos. Otro factor de virulencia importante es la enterotoxina que es producida por todos los tipos de *C. perfringens* principalmente por el tipo A y también la toxina beta 2,

fuertemente asociada a dolencias clostridiales en animales domésticos (De Freitas, 1987; Silva, 2006; Uzal, 2008)

3.1.2 EDEMA MALIGNO

El edema maligno es también conocido como Flemón caseoso, Paragangrena gaseosa, Paragangrena cefálica, Matlazáhuatl (Costa del Golfo de México), Gangrena traumática, Carhunco parasintomático, y Miositis clostridial (Runnells, 1968).

Es una patología causada por uno o más de los siguientes microorganismos: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. perfringens*, *C. sordellii* y *C. novyi* (Uzal, 2008).

Aparece de forma esporádica y siempre relacionada a un traumatismo, accidental o quirúrgico, que es la puerta de entrada de la infección y crea las condiciones ambientales de crecimiento bacteriano. Las heridas muy penetrantes acompañadas por un traumatismo grave proporcionan las condiciones más favorables para el crecimiento de los anaerobios. Afecta todas las especies animales y todas las categorías (Radostits, 2002).

La mayoría de los casos se observan como animales encontrados muertos en las 12-18 horas que siguen a un evento de castración, descole, esquila, balneación o cualquier otro tipo de traumatismo. En algunos casos se pueden observar signos clínicos como debilidad, temblores musculares, cojera e hinchazón de la zona afectada. Esta generalmente se presenta con tono azulado y fría debida a la isquemia tisular, con una delgada línea hiperémica que la separa del tejido normal (Uzal, 2008).

El edema es serosanguinolento y puede tener burbujas de gas, pero los músculos no están afectados. La piel de la zona afectada toma un color morado gangrenoso y se observan edemas subcutáneos e intermusculares gelatinosos. Las cavidades peritoneal y torácica están cubiertas por un exudado serosanguinolento (Mareco, 2008).

3.1.3 HEPATITIS NECRÓTICA INFECCIOSA

El agente causal de la hepatitis necrótica infecciosa ó "Enfermedad Negra" (Black disease), es el *C. novyi* tipo B que afecta ovinos, bovinos y cerdos. Tiene una prevalencia mayor en ovinos, caracterizada por su aparición repentina y su ausencia de síntomas ya que los animales enfermos aparecen muertos. Lo poco que se puede observar es un gran decaimiento, hipertermia, inmovilidad, diarrea, coma y muerte. Afecta preferentemente a ovinos adultos, mayores de un año de edad y bien alimentados, siendo muy rara su aparición en corderos. Se presenta preferentemente en otoño e invierno en áreas bajas y húmedas, donde hay más posibilidades de infectarse con metacercarias de *F. hepática*. Las esporas ingresan naturalmente con los alimentos y son transportadas al hígado, bazo y médula ósea, donde se alojan de forma latente, particularmente en la cápsula de Glisson alrededor del parénquima hepático. En condiciones normales las esporas no pueden germinar debido a la alta oxigenación de estos tejidos. Sin embargo, frente a una injuria hepática disminuye la irrigación sanguínea y cae el potencial redox, creando las condiciones adecuadas para la invasión del microorganismo (De Freitas, 1987; Radostits, 2002).

Otros predisponentes de la infección son la alta infestación por quiste hidático, cisticercosis por *Cysticercus tenuicollis*, tenias como *Thysanosoma actinoides*, factores químicos y plantas tóxicas que dañen el hígado. La ictericia es raramente observada, ya que se necesitan más horas de las que normalmente sobreviven los animales para que los pigmentos biliares se hagan visibles en los tejidos (Radostits, 2002; Uzal, 2008).

A la necropsia pueden observarse descargas sanguinolentas por nariz, ano y vulva, y una

gran ingurgitación de los vasos sanguíneos subcutáneos, que le da color negro a la cara interna de la piel. Los músculos abdominales están cubiertos por un exudado gelatinoso y se encuentra un abundante fluido seroso o serosanguinolento en las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica. El hígado presenta congestión, de color rojo oscuro, y áreas focales de necrosis de color gris amarillento, rodeadas por una zona hiperémica de color rojo brillante. Las lesiones hepáticas pueden ser visibles en la superficie de la cara diafragmática del órgano, pueden estar en la profundidad y pasar desapercibidas a no ser que se hagan cortes seriados en el órgano, o pueden no estar presentes. Es habitual encontrar signos de una invasión reciente de *Fasciola hepática* en los canalículos biliares. Es posible también encontrar focos necróticos en riñones (De Freitas, 1987; Robles, 1998; Radostits, 2002)

3.1.4 HEMOGLOBINURIA BACILAR

Es una enfermedad aguda y fatal, producida por *C. haemolyticum*, de aparición poco frecuente en ovinos, siendo más común de encontrar en bovinos. Se presenta preferentemente en verano y otoño, en regiones bajas y húmedas. Su ocurrencia está dada después de algún daño tisular hepático, como consecuencia de la infestación masiva de *Fasciola hepática*. Su patogenia y sintomatología es similar a la de la hepatitis necrótica, apareciendo además hay ictericia, anemia y hemoglobinuria. El desarrollo de un trombo organizado en una rama subterminal de la vena porta produce el gran infarto isquémico que caracteriza a esta enfermedad. La mayoría de las bacterias se aloja en este infarto, y en condiciones anaerobias liberan sistemáticamente toxinas neurotóxicas y hemolíticas, que causa la toxemia, lesión vascular generalizada y hemólisis intravascular (Radostits, 2002).

Es común encontrar animales muertos, sin observarse sintomatología. En el cuadro anatomopatológico se destaca la coloración icterica en toda la carcasa, edema gelatinoso cubriendo el subcutáneo, la vejiga con contenido de color rojo, los riñones cubierto por petequias y el intestino delgado con intensas hemorragias. La lesión característica de la hemoglobinuria es el infarto isquémico del hígado. Pueden existir uno o más infartos de forma triangular en cualquier parte del hígado, de color cobre, rodeados por una zona de hiperemia, y tiene aspecto general de necrosis local (De Freitas, 1987; Radostits, 2002; Uzal, 2008).

3.1.5 TÉTANOS

Es una enfermedad infecciosa grave, con alta tasa de mortalidad, causada por la toxina de *C. tetani*. Se relaciona la enfermedad a un proceso traumático contaminado que permite que las esporas germinen en un medio adecuado de tensión reducida de oxígeno lográndose la proliferación masiva del agente y la producción de la toxina. Los factores que favorecen o predisponen su aparición son todas las heridas por esquila, castración, destete, inyecciones mal aplicadas o con instrumentos sucios, balneaciones post esquilas, utilización de anillos para castración, cambio de dentición, etc. Los bacilos del tétanos permanecen localizados en el lugar de introducción y no invaden los tejidos adyacentes. Estos microorganismos proliferan y producen tetanolisina y tetanoespasmina. La tetanolisina promueve la necrosis tisular local mientras que la tetanoespasmina se difunde a la circulación sistémica absorbiéndose por linfa y sangre, o neural a través de los nervios periféricos llegando a las neuronas motoras del cuerno ventral de la médula espinal por transporte retrógrado intraaxonal (De Freitas, 1987; Radostits, 2002).

El mecanismo de acción de la tetanoespasmina sobre el sistema nervioso consiste en el

bloqueo del impulso nervioso espontáneo a nivel presináptico, que provoca la liberación de los neurotransmisores GABA y glicina, con la consiguiente desinhibición de las neuronas motoras. El efecto es una contracción espasmódica de los músculos de la zona afectada, frecuentemente la cabeza y la nuca, extendiéndose luego a los miembros y generalizándose a todo el cuerpo. Al comienzo de la enfermedad los animales se presentan envarados y con una hiperestesia manifiesta a los sonidos y golpes, con espasmos musculares en los párpados y en la nuca, protrusión del tercer párpado y blefaroespasmos. A medida que avanza el cuadro las contracciones comienzan a generalizarse, hay opistótonos, trismo maxilar, incapacidad para masticar y deglutir, fiebre y postración. Presentan intensos temblores tónico clónicos de las extremidades seguidas de períodos de relajación. Adoptan en esta fase una expresión ansiosa y disneica, sobreviniendo la muerte por asfixia entre las 12 y 18 hs de comenzados los síntomas, con marcada hipotermia. No existen alteraciones macroscópicas en el examen post mortem, sólo se puede llegar a observar la herida que sirvió de puerta de entrada. La mortalidad es del 80% (De Freitas, 1987; Radostits, 2002; Mareco, 2008).

3.1.6 BOTULISMO

Es una enfermedad producida por la ingestión de la toxina del *C. botulinum*, caracterizada por desencadenar un cuadro de parálisis motora de consecuencias fatales. Existen 6 tipos toxigénicos: A, B, C, D, E, F, siendo los más relevantes en mamíferos los tipos C y D. Su acción farmacológica es la misma pero se diferencian serológicamente.

El agente se encuentra en el suelo, principalmente en áreas endémicas, y en el tracto gastrointestinal de los animales. La mayor concentración está en cadáveres, carroña, y materia orgánica en descomposición. Estas condiciones constituyen un hábitat ideal para las esporas, con activa multiplicación y producción de grandes cantidades de toxina de altísimo poder letal. Es una enfermedad típica del bovino que pasta en zonas carentes de fósforo y que come huesos. Es rarísima en ovinos y en caprinos, al punto de no haber sido diagnosticada en ovinos en Argentina ni en Uruguay; esto se puede deber a que los desbalances carenciales en ovinos son muy difíciles de encontrar. Se produce la enfermedad por consumir pequeñas cantidades de toxina, se absorbe por la sangre y es llevada al sistema nervioso, provocando una parálisis flácida y causando la muerte del animal por asfixia (De Freitas, 1987; Radostits, 2002; Mareco, 2008).

3.2 CLOSTRIDIUM CHAUVOEI

3.2.1 CLASIFICACIÓN Y MORFOLOGÍA

Este microorganismo pertenece al *Phylum Firmicutes*, Clase *Clostridia* del orden de los *Clostridiales*, de la familia de las *Clostridiaceae* y del género *Clostridium*. Son bacilos anaerobios Gram positivos y se caracterizan por su forma alargada, cuya longitud es de 3 a 8 µm, es de bordes redondeados y móvil gracias a los flagelos peritricos que posee, no tiene cápsula, pero sí esporas ovales y subterminales. La forma vegetativa de *C. chauvoei* tiene dos antígenos aglutinantes, el antígeno somático O estable al calor (heat-stable) común a todas las cepas y el antígeno H lábil al calor (heat-labile) de los cuales hay dos tipos (Moussa, 1959; Martínez, 2011).

3.2.2 LA ENFERMEDAD

Una de las principales enfermedades en las que se encuentra involucrado *C. chauvoei* es en el carbunco sintomático; la cual también es conocida como carbón, pierna negra, mal de paleta, gangrena enfisematosa o pernera. Esta enfermedad es una infección caracterizada por ser febril, enzoótica, que afecta al ganado vacuno, habitualmente en edades entre los 6 meses a 2 años de edad y con un buen estado corporal; por ello tiene un gran impacto en la economía.

Afecta principalmente las zonas de mayor masa muscular como lo son las caderas, hombros, dorso y cuello. Los animales llegan a presentar fiebre alta, cojera asociada con fluctuaciones, crepitación y en la mayoría de los casos termina con la vida del animal en un periodo de 1 a 3 días después de la aparición de los síntomas. La forma de ingreso de *C. chauvoei* al organismo; es comúnmente por vía oral, a través de algunas heridas predisuestas en la mucosa de los animales, o al consumir agua o pastos contaminados con esporas de esta bacteria que al llegar a las mucosas se distribuyen, por vía hematógena, a diferentes órganos y tejidos del organismo, como el cuello y miembros posteriores.

Debido a la presencia de magulladuras del músculo, ejercicio excesivo, indigestión aguda o cualquier proceso que desvitalice al tejido, se generan las condiciones adecuadas para su crecimiento, por la presencia de glucógeno del musculo y un pH alcalino. Una vez que las condiciones son alcanzadas, se genera la forma vegetativa de esta bacteria, donde se producen toxinas y otras enzimas, cada una con un fin específico, aunque en general causan una severa inflamación del musculo, hemorragia, edemas gaseosos, degeneración celular a consecuencia de la mionecrosis, y aumento de la temperatura corporal, alrededor de los 40°C (Figura 1). Finalmente, hay una bacteriemia que se da únicamente en la fase final de la enfermedad y que conlleva a la muerte del animal. Este se encuentra en posición decúbito lateral con el miembro afectado extendido y rígido, se produce putrefacción y meteorismo post mortem con exudado espumoso que sale del ano y la nariz. Se nota un olor rancio como de ácido butírico y se puede notar la producción de gas en el hígado.

Si se llegará a detectar algún síntoma de aletargamiento del animal y se ubicara el lugar de la infección, están indicadas las dosis masivas de antisuero y antibióticos como la penicilina en dosis de 20000 a 30000 UI/Kg de peso vivo en forma local y parenteral. Es conveniente lavar la herida, inyectar peróxido de hidrógeno y colocar compresas frías en el área.

Debido a que es muy difícil detectar algún síntoma de manera oportuna, la forma más adecuada para controlar los índices de incidencia de la enfermedad es con el esquema de vacunación con las bacterinas comerciales, en donde se menciona que se debe vacunar al segundo mes y revacunar al tercer mes de vida; pero se recomienda que cada establecimiento deba diseñar una estrategia acorde con el tipo de explotación y sus condiciones de manejo, ya que de esto dependerá la predisposición que tengan los animales a enfermarse; por ejemplo, en ganado de cría, la vacunación de refuerzo a los vientres un mes antes del parto para transferir inmunidad a los terneros a través del calostro, o se da la aplicación de una tercera dosis de vacuna a todos los terneros que se destetan, para garantizar que todos los terneros nacidos en esa época hayan recibido por lo menos 2 dosis (Robles, 1998; Uzal, 2008; Cattáneo & Bermúdez, 2010; Tizard, 2009; Songer, 2010; Larson, 2011; Martínez, 2011).



Figura 1. Lesiones de mancha en bovinos. (Bermúdez, 1997).

3.2.3 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

3.2.3.1 REMISIÓN DE MUESTRAS

Para llevar a cabo la confirmación del agente etiológico que está involucrado en la enfermedad, se debe hacer una toma de muestra, la cual se debe recolectar inmediatamente después de la muerte del animal y almacenarse en las condiciones apropiadas hasta su uso, con el fin de evitar errores, debido al crecimiento de bacterias invasoras y dar falsos positivos. Por ejemplo, *C. septicum* puede ser un invasor post-mortem, porque no requiere condiciones de anaerobiosis estrictas y prolifera en el organismo ya muerto por *C. chauvoei*, y si la toma de muestra no se realiza rápidamente únicamente se llegara a detectar a la bacteria invasora, dando resultados erróneos.

Las muestras a enviar son trozos de tejido afectado y tejido sano refrigerado entre + 4 y - 8 °C para diagnóstico bacteriológico y en formol al 10 % para histopatología (Quinn, et al., 1994, Popoff & Bouvet, 2009).

3.2.3.2 CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

C. chauvoei es una bacteria anaeróbica estricta, esto quiere decir que requiere una atmósfera con una tensión de oxígeno inferior a 0.5% que para lograrla se necesita de sistemas generadores de anaerobiosis en los que se encuentran los sistemas Gas-Pak. Cuando son cultivados en agar sangre, las colonias son pequeñas, planas, transparentes con presencia de un halo de hemólisis (Cattaneo & Bermúdez, 2010; Martínez, 2011).

Los medios de cultivo que se emplean para anaerobios tienen una alta proporción de peptonas e hidratos de carbono, ya que su metabolismo es más exigente que el de bacterias facultativas y requieren factores de crecimiento como la hemina y vitamina K, ya sea en medio líquido o sólido; por ejemplo, el caldo tioglicolato y el agar sangre más los suplementos anteriormente mencionados. Sus productos de fermentación son el ácido acético, propiónico y butanol (Cattaneo & Bermúdez, 2010; Martínez, 2011).

3.2.3.3 SIEMBRA Y AISLAMIENTO

Para la recuperación de bacterias del género *Clostridium* a partir de muestras clínicas, se pueden utilizar los siguientes medios: agar sangre para anaerobios, agar Brucella, agar sangre PEA, agar Schaedler, agar sangre para anaerobios CDC, etc. Es conveniente incluir un medio con yema de huevo para investigar la producción de lipasa y lecitinasa y un medio líquido de enriquecimiento, como el Cooked meat. La incubación se hará a 37°C en anaerobiosis (cámaras, jarras o bolsas con generadores de atmósfera anaerobia). Las colonias son hemolíticas y aspecto crateriforme. ^(Figura 2) (Quinn, et al., 1994, Popoff & Bouvet, 2009)

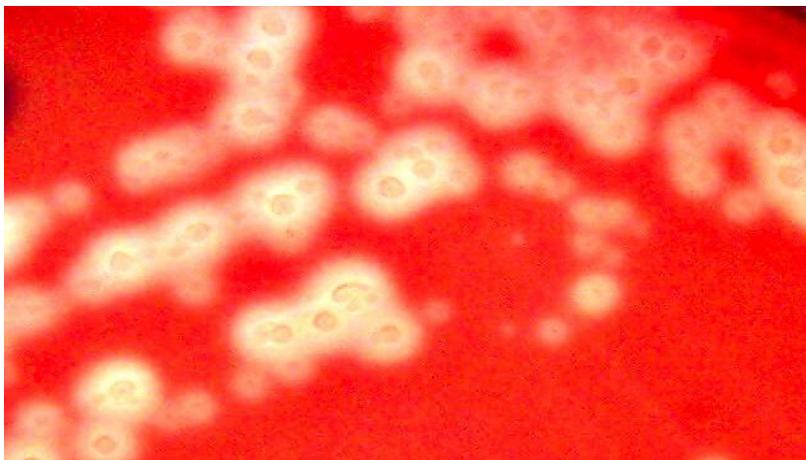


Figura 2. Colonias de *Clostridium chauvoei* (Cattáneo, 2013).

3.2.3.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

La identificación de las bacterias anaerobias depende no sólo de su citomorfología sino también de su patrón metabólico, es decir de su capacidad para fermentar diversos azúcares, producción de ciertos metabolitos, hidrólisis de algunos compuestos como esculina o la determinación del perfil de ácidos grasos producidos como producto final de la fermentación de la glucosa. Cada bacteria o grupo de bacterias tiene un perfil enzimático y por lo tanto su perfil de capacidad de comportamiento bioquímico lo que permite identificar usando tablas o cuadros que muestran el comportamiento de cada género y especie (Martínez, 2011; Rodríguez-Cavallini, 2011).

Las comúnmente usadas para el género *Clostridium* son la determinación de lecitinasas y lipasas en yema de huevo, hidrólisis de gelatina, digestión de la leche, producción de indol y fermentación de carbohidratos (Cuadro 2), (Martínez, 2011; Rodríguez-Cavallini, 2011).

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas de los Clostridios.

Especie	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Salicilina	H ₂ S	Gelatina	Indol	Leche
<i>C. chauvoei</i>	+	+	+	-	+	+	-	Acidificada
<i>C. septicum</i>	+	+	+	+	+	+	-	Acidificada
<i>C. novy</i> tipo B	+	+	+	-	+	-	-	Digerida
<i>C. perfringens</i>	+	+	+	-	+	+	-	Muy fermentada
<i>C. hemolyticum</i>	+	-	-	-	+	+	+	Acidificada
<i>C. tetani</i>	-	-	-	-	+/-	-	-	Sin cambio
<i>C. botulinum</i>	+	+	-	-	+	+	-	Acidificada

3.2.3.5 TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Un modo rápido de identificar a *C. chauvoei* es por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa, que consiste en enfrentar anticuerpos contra *C. chauvoei* conjugados con isotiocianato de fluoresceína a criosecciones de los tejidos afectados y observar fluorescencia específica al microscopio de luz ultravioleta ^(Figura 3) (Assis, 2001; Tizard, 2009; Martínez, 2011; Cattáneo, 2011).

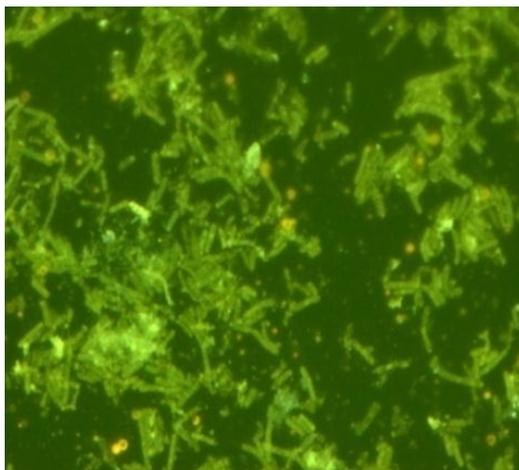


Figura 3. Inmunofluorescencia directa de *Clostridium chauvoei* (Cattáneo, 2013).

3.2.3.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se ha desarrollado las técnicas de PCR multiplex, PCR taqman, y real time PCR en donde es posible detectar *C. chauvoei* y *C. septicum* los cuales pueden ser encontrados en asociación en los distintos cuadros de mionecrosis en diferentes especies animales ^(Figura 4) (Assis, 2008; Lange, 2010; Cattáneo; 2011; Garofolo, 2011).

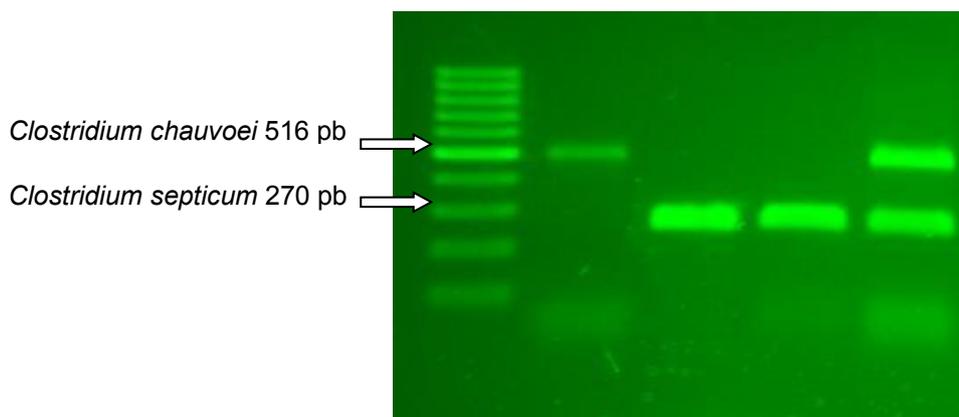


Figura 4. PCR de *Clostridium chauvoei* (516 pb) y *Costridium septicum* (270 pb) (Cattáneo, 2013).

3.2.3.7 INMUNOHISTOQUÍMICA

La técnica de inmunohistoquímica se basa en la detección de los microorganismos en cortes de tejidos con anticuerpos específicos y brinda también un diagnóstico definitivo (Figura 5) (Uzal, 2010).



Figura 5. *C. chauvoei* en musculo estriado por inmunohistoquímica (Flecha) (Uzal, 2013).

3.2.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Hay muchas causas de muerte súbita en la especie bovina, y es por eso que pueden ser muchos los diagnósticos diferenciales para la enfermedad causada por el *C. chauvoei*, resultando difícil la diferenciación (Garofolo et al., 2011, Uzal, 2013). Entre los diagnósticos diferenciales más importantes se destacan la electrocución por rayo, el carbunco bacteriano, el saturnismo agudo (intoxicación por plomo), intoxicaciones por plantas hepatotóxicas, la tetania de la lactación, también otras clostridiosis como el edema maligno o gangrena gaseosa, enterotoxemias y hemoglobinuria bacilar entre otras causas de muerte súbita. Detallándose a continuación algunas de las más significativas.

3.2.4.1 EDEMA MALIGNO

El caso del edema maligno (gangrena gaseosa) es una infección de heridas agudas a diferencia de la mancha que no tiene puerta de entrada. Es causada por microorganismos del género *Clostridium* entre ellos también *C. chauvoei*. Como característica de esta enfermedad se observa inflamación aguda en el lugar de la infección y toxemia intensa (Radostits, 2002; Garofolo et al., 2011; Uzal, 2013).

3.2.4.2 OTRAS CLOSTRIDIOSIS

La hepatitis infecciosa necrosante es producida por *C. novyi* tipo B, mientras que la hemoglobinuria bacilar es producida por el tipo D del mismo microorganismo, también llamado *C. haemolyticum*. La hepatitis infecciosa necrosante es una enfermedad que se presenta generalmente en ovinos, mientras que la hemoglobinuria bacilar lo hace en los bovinos generalmente después de una injuria en el hígado y muy comúnmente asociada a *Fasciola Hepática*. Esto no quiere decir que no puedan presentarse en ambas especies con muerte súbita, es por ello que pueden llegar a ser diferenciales de “mancha”. La enterotoxemia producida por *C. perfringens* se presenta como una enfermedad gastrointestinal en

bovinos. No es claro el rol que juega el microorganismo y a su vez se posee poca información, pero algunos autores lo citan como posible diagnóstico diferencial de muerte súbita (Uzal, 2013).

3.2.4.3 ELECTROCUCIÓN POR RAYO

Suele manifestarse con quemadura en el pelo y antecedentes de tormenta en la región. (Garofolo et al., 2011).

3.2.4.4 CARBUNCO BACTERIDIANO

El Carbunco, Antrax o Pústula Maligna es causado por el *Bacillus anthracis*. Esta es una bacteria grande, Gram positiva y formadora de endosporas frecuentemente encontrada en muestras ambientales y en tejidos corporales expuestos al O₂. Es una enfermedad caracterizada por presentar septicemia y muerte repentina, con salida de sangre por los orificios corporales del cadáver. Son signos aparentes de esta enfermedad la incapacidad de la sangre para coagular, la esplenomegalia y la ausencia de rigidez cadavérica. La “mancha” o carbunco sintomático sobreagudo es a veces confundido con Carbunco o antrax, pero el *C. chauvoei* se observa casi exclusivamente en animales jóvenes (hasta 2 años) y además se caracteriza por tumefacciones crepitantes que no existen en el carbunco (Riet et al., 1998; Radostits, 2002).

3.2.4.5 SATURNISMO Y TETANIA HIPOMAGNESÉMICA

El saturnismo al igual que la tetania hipomagnesémica aparecen con signos manifiestos de tipo nervioso, y presentan un cuadro necrótico completamente distinto al presentado en el caso de las Clostridiosis (Riet et al., 1998; Radostits, 2002).

3.2.4.6 METEORISMO

En el caso de los animales que aparecen muertos por meteorismo agudo se puede observar la marcada distensión abdominal y corrimientos serosanguinolentos por todos los orificios corporales, siendo también diferencial del carbunco. Casi siempre pueden valorarse las probabilidades en pro y en contra de cada uno de estos procesos y un caso de duda puede recurrirse a los exámenes de laboratorio (Radostits, 2002).

3.2.5 CLOSTRIDIOSIS EN URUGUAY

La mayoría de las enfermedades clostridiales que afectan a bovinos y ovinos fueron identificadas en nuestro país. Los primeros aislamientos de *C. chauvoei* fueron realizados por el Dr. Casas Olascoaga en el año 1961 y el Dr. Leaniz en el 1964. En el cuadro 3 se detallan los aislamientos clostridiales realizados en Uruguay hasta la fecha. (Com. pers. Dr. Julián Bermúdez, 2013)

- Cuadro 3. Enfermedades clostridiales diagnosticadas en Uruguay.

ENFERMEDAD	AGENTE ETIOLOGICO	AISLAMIENTO Y/O IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE	ESPECIE	OCURRENCIA EN URUGUAY
Mancha	<i>Clostridium chauvoei</i>	Dr. Casas Olascoaga, 1961- Dr. Leaniz, 1964	Bovino 6 meses -2 años	XXXX
Gangrena gaseosa	<i>Clostridium chauvoei</i>	Dr. Casas Olascoaga, 1961- Dr. Leaniz, 1964	Bovino - ovino	XXXX
	<i>Clostridium septicum</i>	Dr. Casas Olascoaga, 1961- Dr. Leaniz, 1964	Bovino - ovino	XX
	<i>Clostridium sordellii</i>	Dr. Quiñones - 1992	Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	Dr. Leaniz, 1964	Bovino	X
Enterotoxemias	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	Dres. Cattáneo-Bermúdez, 2013	Ovino	X
		Dres. Cattáneo-Dutra-Bermúdez, 2013*	Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo B	Dres. Cattáneo-Bermúdez, 2013 Beta toxina positivo (sin publicar)	Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo C			
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo D	Dr. Casas Olascoaga, 1961-Dr. Leaniz, 1964	Ovino	XXXX
<i>Clostridium sordellii</i>	Dr. Bermúdez, 1997 (sin publicar)	Bovino	X	
Hepatitis necrótica	<i>Clostridium novyi</i> tipo B	Dr. Casas Olascoaga, 1961-Dr. Leaniz, 1964	Ovino	XX
Hemoglobinuria Bacilar	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Dres. Perdomo – Carreto, 1984	Bovino	XX
Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>	Dr. Bermúdez, 1981 (sin publicar) (clínica e identificación de toxina)	Bovino	X
	<i>Clostridium tetani</i>	Dr. Bermúdez, 1981 (clínica e identificación de la toxina)	Ovino	XXXX
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i> tipo D	Dr. Bermúdez, (clínica y presencia de toxina)	Bovino	XX

*Caso de yeyunitis hemorrágica en bovino (primera identificación).

XXXX: MUY FRECUENTE
 XXX: MEDIANAMENTE FRECUENTE
 XX: POCO FRECUENTE
 X: ESPORÁDICO

Bermúdez & Cattaneo 2013

En Uruguay se estima una pérdida de US\$ 100 millones anuales en el sector ganadero debido a la no prevención contra la clostridiosis, provocando pérdidas importantes para la ganadería, para todo el complejo de la carne y para la economía del país. Se estima que de un total del 3% de muertes a nivel nacional, la tercera parte son debidas a las clostridiosis. Al precio del ganado gordo se podría decir que las pérdidas ascienden a lo antes mencionado (Hugo Montaner, Presidente de la Cámara de Especialidades Veterinarias, El Observador, 2011).

Desde el punto de vista legal no es obligatorio la vacunación contra Carhunco sintomático en nuestro país, pero un decreto del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) del 31 de julio del 2012 hace referencia al control sanitario de los campos de recría en donde especifica la vacunación de todos los animales que ingresan a este tipo de establecimientos contra carhunco sintomático y el egreso de estos con el certificado extendido por el Veterinario de libre ejercicio que haga constar dicha vacunación (MGAP, 2012).

4 CALIDAD DE LAS VACUNAS UTILIZADAS EN LA PROFILAXIS DE LAS CLOSTRIDIOSIS EN EL URUGUAY

Considerando que el uso de vacunas en la profilaxis de las clostridiosis es el único método viable y económico para el control de estas enfermedades, el éxito en el mismo depende de tener vacunas de alta calidad. Es por esto que la Dirección General de Servicios Ganaderos dispone de los mecanismos legales para asegurar la calidad de los biológicos utilizados en el país.

En el cuadro 4 se describen las vacunas clostridiales registradas frente al MGAP.

Cuadro 4. Vacunas clostridiales registradas en nuestro país.

Laboratorio	Nombre	Composición	Adyuvante	Estado	Dosis	Vía	Especie
Bayer	BAY BAC VISION MC	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2 mL	SC	Bovinos, ovinos y caprinos
	BAY BAC VISION EMG PLUS	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B y D, <i>perfringens</i> D	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
2 mL					SC	Ovinos y caprinos	
Biogénesis	BIOCLOSTRIGEN J5	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>perfringens</i> C y D, <i>E. coli</i> J5	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Ovinos
	POLICLOSTRIGEN	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> C y D, <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i> y <i>E. coli</i> J5	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
Hipra -Invet	TOXIPRA-S7	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> , <i>perfringens</i> B, C y D, <i>sordellii</i>	Oleosa	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Ovinos
Merial	SINTOXAN 9th	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> B y D, <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i> y <i>tetani</i>	Acuoso	Inactivada	3 mL	SC	Bovinos, caprinos y ovinos

	ULTRAVAC	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D</i>	Acuoso	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Caprinos y ovinos
Microsules	CLOSTRIDIAL H+HEMOGLOBIN URIA	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Doble emulsión	Inactivada	-	-	Bovinos
Nutritex	CARBUMAN	<i>Bacillus anthracis y Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	SC	Bovinos, ovinos y suinos
	MANCHA Y GANGRENA GASEOSA PLUS	-	-	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
Pfizer	ULTRACHOICE 8	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi, perfringens C y D, sordellii, haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	2 mL	SC	Bovinos
					1 mL	SC	Ovinos
Rosenbusch	BACTERINA HEMOGLOBINURI ABACILAR	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
	IR9	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi A, B y D perfringens B, C y D,</i>	Acuoso	Inactivada	-	-	Bovinos, caprinos y ovinos
	MANCHA, GANGRENA GASEOSA Y ENTEROTOXEMIA	<i>Clostridium chauvoei, septicum, perfringens C y D</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
Santa Elena	DUPLEX	<i>Bacillus anthracis y Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2 mL	SC	Bovinos y suinos
					1 mL	SC	Ovinos
	CLOSTRISAN	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Caprinos y ovinos
	CLOSTRISAN 9+T	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens A, B, C y D, sordellii, haemolyticum y tetani</i>	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Caprinos y ovinos
	CLOSTRISAN Adyuvac	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum</i>	Oleoso	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
	CLOSTRISAN T	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum y tetani</i>	Acuoso	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
2 mL					SC	Caprinos y ovinos	
TETANIC	<i>Clostridium tetani</i>	Acuoso	Inactivada	3 mL	SC	Bovinos	
				2 mL	SC	Caprinos y ovinos	
Uruguay	CARMANVET	<i>Bacillus anthracis y Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	-	Bovinos, caprinos, ovinos y suinos
	POLIVET	Mancha, gangrena gaseosa y otras clostridiosis	-	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
	TETANIVET	<i>Clostridium tetani</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos, caprinos y ovinos

Fuente: Vademécum de especialidades veterinarias. 2012.

4.1 PARÁMETROS QUE SE EVALÚAN PARA LA ACEPTACIÓN DE UNA VACUNA COMERCIAL

- **Esterilidad (solo en casos de vacunas inactivadas):**

La esterilidad es la ausencia de organismos vivos, en el caso de los productos inactivados, debe estar libre de virus, bacterias, hongos y micoplasmas.

Se realiza a través de métodos microbiológicos verificando ausencia de crecimiento para aerobios, anaerobios y hongos. Medios usados: Caldo TSA (Tryptosa Soya Agar), Saboraud, Tioglicolato. Se incuba a 37°C aerobios, 25°C hongos, se observa durante 14 días.

Las vacunas cumplen con las especificaciones de esterilidad si luego de concluido el período de incubación no se observan crecimiento de microorganismos. Si el resultado es positivo o dudoso se efectuará un segundo ensayo y si no se observa crecimiento el producto cumple.

Si se observa nuevamente turbidez se envía a bacteriología con el fin de saber que contaminante está presente.

- **Inocuidad en cobayos:**

La inocuidad es una propiedad que deben poseer los productos biológicos para no producir efectos adversos generales y locales.

Se inocula 1/5 de la dosis aplicada para bovinos o 1/2 de la dosis para ovinos por vía s/c y se observa durante 7 días no debiendo observarse signos locales o generales de importancia. Si se presentan reacciones desfavorables atribuibles al producto se repite la prueba.

- **Toxicidad a doble dosis en cobayos.**

En caso de *C. chauvoei* sería conveniente controlar todas las series, aunque en estos casos las muestras se evalúan de lotes al azar si son laboratorios nacionales (por razones operativas) y se realiza la prueba en todos los lotes de las vacunas importadas.

4.1.1 PRUEBA DE POTENCIA O EFICACIA INMUNOLÓGICA PARA *C. CHAUVOEI*

La potencia de una vacuna es la capacidad de proteger a los animales vacunados produciendo una respuesta inmunológica protegiendo al animal contra la enfermedad. Existen métodos validados para medir esa potencia en animales de laboratorio que están correlacionados con las pruebas en animales de destino.

El método utilizado a nivel nacional y del MERCOSUR es el siguiente. (OIE, 1996; Mercosur, 1997).

1. Vacunación y revacunación a los 21 días 10 cobayos con 1/5 de la dosis utilizada para bovinos.

2. Desafío en 8 cobayos: 14 días después de la revacunación se descarga 100 dosis letales DL 50 contenidas en 0,5 ml vía I/M.
3. Paralelo a esto se le inocula la misma dosis de DL 50 a 5 cobayos como grupo testigo (sin vacunar).
4. La suspensión utilizada para el desafío es un cultivo vivo de *C. chauvoei*, cepa MT2 (volumen 0,25 ml de la dosis compuesta por el antígeno y 0,25 ml de cloruro de calcio al 10%) inoculada por vía I/M.
5. Los animales inoculados se observan diariamente durante 3 días.
6. Interpretación de resultados: para que la prueba sea válida al menos el 80% de los controles deben morir al menos en los 3 días posteriores al desafío.
Para validar el test el 80% de los animales vacunados deben sobrevivir, si mueren 3 o más cobayos el ensayo se considera insatisfactorio. En caso que mueran hasta 2 cobayos del grupo vacunado es posible proceder a una re prueba. Se repite el procedimiento y los criterios de aprobación son los siguientes: los controles muere el 80% dentro de los 3 días posteriores al desafío. ^(Cuadro 5) Si esto se cumple se procede a la evaluación estadística de los resultados.

Cuadro 5. Prueba de desafío en cobayos.

Nº cobayos vacunados	Nº acumulado cobayos vacunados	Nº acumulado cobayos muertos para un ensayo satisfactorio	Nº acumulado cobayos muertos para un ensayo insatisfactorio	Controles muertos
8	8	1 o menos	3 o más	80%
8	16	4 o menos	5 o más	80%

La cepa de referencia utilizada para el desafío es la cepa MT 2 (Potencia $10^{4,67}$). Una vez aprobada la vacuna se envía al laboratorio interesado el resultado final. En caso de no aprobación del lote, se envía el resultado al laboratorio interesado, el cual no debe vender esa serie y queda encargado de avisar al DILAVE de su destrucción.

En caso de que a una serie no se le realice control de potencia, pero sí de esterilidad, el DILAVE acepta los certificados de las pruebas de control del producto terminado del laboratorio elaborador (Codex British Veterinary 1965; BP 85; 9 CFR part 113. 1992; OIE, 1996; Mercosur, 1997).

5 RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN BOVINOS VACUNADOS CON ANTÍGENO DE *C. CHAUVOEI*

Se considera habitualmente una enfermedad bovina limitada principalmente a los animales jóvenes entre 6 meses y dos años de edad, aunque también se produce ocasionalmente en animales más jóvenes y en los adultos de hasta 3 años. En el campo los factores de riesgo incluyen el crecimiento rápido del ganado y una dieta muy energética. La toxina del *C. chauvoei* produce una miositis necrosante, localizada en los músculos esqueléticos, entrando a su vez en la vía sistémica creando una toxemia generalmente mortal. Se ha observado una presentación atípica de muerte súbita ocasionada por este clostridio causando una miositis cardíaca. Esta enfermedad se caracteriza por ser esporádica,

desarrollarse en forma endógena y extraordinariamente rápida (Sterne, 1978; Radostits, 2002).

En caso de lograr ver algún síntoma se ve cojera grave, normalmente con hinchazón en la parte superior de la extremidad afectada. Si bien las lesiones se encuentran generalmente en la parte superior de los miembros, también puede encontrarse en la base de la lengua, músculo cardíaco, músculos del diafragma y psoas, la falda y la ubre, 12 a 36 horas posteriores a los síntomas el animal muere. “La tasa de mortalidad del carbunco sintomático se aproxima al 100%” (Radostits, 2002).

La protección contra estas enfermedades es por medio de vacunación, pero a diferencia de otras infecciones clostridiales en donde la inmunidad contra las toxinas juega un rol predominante en la protección, en *C. chauvoei* la respuesta inmunitaria tiene que ser en gran parte antibacterial (Chandler, 1974; Chandler, 1975; Stevenson, 1980).

La forma vegetativa de *C. chauvoei* tiene dos antígenos aglutinantes, el antígeno somático O estable al calor (heat-stable) común a todas las cepas y el antígeno flagelar H lábil al calor (heat-labil). Está demostrado que el antígeno flagelar juega un rol importante en la inducción de una inmunidad protectora en los animales (Moussa, 1959; Tamura et al., 1984).

Para evaluar la potencia de estas vacunas se tomaron las normas establecidas por la British Pharmacopoeia (BP) o el Code of Federal Regulations (CFR). Las normas establecen al test de desafío en cobayos como prueba de potencia para vacunas que contengan *C. chauvoei*. Este ha sido validado, bajo condiciones de laboratorio, para ovinos y bovinos (Macheak, 1972; Crichton, 1986).

Se desarrolló un método de aglutinación en placa de tipo flagelar para medir anticuerpos en animales vacunados con *C. chauvoei*. Este método fue validado con la técnica de desafío en cobayos y se observó que cuando 0.5 µL o menos de suero problema aglutinan un antígeno estandarizado indica 100 % de protección (Claus, 1972).

Posteriormente se demostró la relación entre los títulos aglutinantes y la respuesta inmune contra *C. chauvoei* en bovinos vacunados con vacunas comerciales, (evaluadas por la técnica de desafío en cobayos), dando como resultado una respuesta inmune igual o mayor en esta especie (Macheak, 1972).

La vacuna experimental a evaluar fue elaborada por Laboratorios Santa Elena donde se incluye nuevas valencias de antígenos clostridiales (*Clostridium perfringens* tipo A, B, C y *Clostridium tetani*). Debido a que en cada nueva formulación se deben de evaluar los antígenos que la componen, para este experimento se considerará la evaluación de *C. chauvoei* debido a su importancia como patología animal y debido a que se tiene una técnica serológica validada con la prueba de potencia por desafío en cobayos.

6 HIPÓTESIS

La vacuna a evaluar produciría anticuerpos con títulos protectivos contra *C. chauvoei*.

7 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta de anticuerpos contra *Clostridium chauvoei* en bovinos inmunizados con una vacuna comercial anticlostridial polivalente utilizando la técnica de aglutinación en placa.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Producción del antígeno aglutinante para la prueba en placa.
- 2- Estudio por microscopía electrónica de la cepa de *C. chauvoei*.
- 3- Desarrollo de la técnica de aglutinación.
- 4- Determinación del título de anticuerpos en los animales vacunados.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO AGLUTINANTE

8.1.1 CEPA

La cepa maestra de *C. chauvoei* fue cedida por Laboratorios Santa Elena S.A. Esta se utiliza para la producción del antígeno vacunal, la cual posee antígenos flagelares. Otro tipo de información queda reservada y está disponible en los registros internos del Laboratorios Santa Elena.

8.1.2 MEDIO DE CULTIVO

- Peptona bacteriológica
- NaCl
- Cisteína HCl
- Agua destilada

8.1.3 PREPARACIÓN DEL CULTIVO

El medio se ajustó a un pH de 7.2 - 7.4 y se autoclavó a 121 °C durante 30 minutos. Cuando el medio llegó a 37 °C se agregó glucosa estéril al 10 % a una concentración de 0.1 % y se inoculó con 100 mL de un cultivo vivo de *C. chauvoei*. Se incubó a 37 °C y cuando se llegó a 1.4 de UA a una densidad óptica de 600 nm se inactivó con formalina a una concentración de 1%. Se mantuvo durante 7 días con agitación a 37 °C.

8.1.4 ESTANDARIZACIÓN DEL ANTIGENO AGLUTINANTE

Se centrifugó el antígeno inactivado de *C. chauvoei* a 3500 RPM durante 15 minutos. El sedimento de bacterias se re suspendió en una solución de buffer salina y se estandarizó a 0.3 UA a una densidad óptica de 400 nm. El antígeno se conservó a +4 °C. (Claus, 1972).

8.2 ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA CEPA A UTILIZAR EN LA VACUNA

El objetivo de esta técnica fue identificar la presencia de los flagelos en la cepa que Laboratorios Santa Elena utiliza para la producción de su vacuna comercial y que se utilizó para la elaboración del antígeno patrón.

La técnica utilizada fue la descrita por John R. Stevenson (1980).

8.3 DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN PLACA

8.3.1 FUNDAMENTACIÓN DE LA TÉCNICA

Los sueros de los animales vacunados obtenidos a los 20 días luego de la segunda revacunación serán evaluados por la técnica de aglutinación en placa. Los sueros de los animales que aglutinen un volumen de 0.5 µL o menos serán considerados que están protegidos. La vacuna que genere este título debe ser considerada aprobada en su eficacia. En caso de querer determinar la duración de la inmunidad será necesario continuar con el experimento produciendo sangrías mensuales de los animales vacunados hasta que desaparezcan los títulos considerados protectores (Claus, 1972).

8.3.2 PROCEDIMIENTO

La prueba se realizó en una placa de vidrio en donde se mezclaron diferentes volúmenes de suero frente a 50 µL de antígeno patrón. ^(Cuadro 6) Se mezcló 30 veces y se incubó en una caja cerrada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se mezcló nuevamente 30 veces y se observó la aglutinación en un aglutinoscopio con luz indirecta. Se tomó como positivo la presencia de una franca aglutinación y como negativo a la ausencia de grumos visibles comparando con un control negativo (Claus, 1972). Los sueros se analizaron en forma individual.

Cuadro 6. Diluciones de los sueros.

Diluciones del suero	Volumen (μL) de suero y diluciones del suero usados en el test			
No diluido	40	20	10	5
1/10	4	2	1	0.5
1/100	0.4	0.2	0.1	0.05
1/1000	0.04	0.02	0.01	0.005

8.3.3 INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

Los animales que no presentaron aglutinación en la cantidad de 5 μL de suero fueron considerados como negativos. El título del suero fue la mínima cantidad que aglutinaba 50 μL de antígeno. Se considera un título protector cuando 0.5 μL o menos del suero problema aglutinan 50 μL del antígeno estandarizado (Claus, 1972).

8.4 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES VACUNADOS

8.4.1 ANIMALES, PLAN DE VACUNACIÓN Y SANGRADOS

El trabajo se realizó en el establecimiento experimental MACONDO perteneciente a Laboratorios Santa Elena S.A. ubicado en el departamento de Florida. Se utilizaron $n=20$ bovinos, cruza, hembras de entre 6 y 8 meses edad, sin vacunación previo contra *C. chauvoei*. Se dividieron al azar en dos grupos de $n=10$ cada uno. El grupo 1 fue el control al cual se lo inoculó con 5 mL de suero fisiológico (placebo). El grupo 2 fue el grupo vacunado al cual se le administró 5 mL de la vacuna a testear. Ambos grupos se revacunaron a los 20 días. Todo los animales se sangraron el día 0 (primer vacunación), el día 20 (revacunación) y el día 40 (20 días luego de la revacunación). En el cuadro 6 se registró las fechas de vacunación y sangrado. La sangre extraída, se almacenó por 12 horas a 4°C, se extrajo el suero, se centrifugó a 3500 revoluciones durante 10 minutos y se conservó a -20 °C. Todo este proceso se realizó en el laboratorio del Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria.

8.4.2 VACUNA

Se utilizó una vacuna clostridial polivalente elaborada por Laboratorios Santa Elena, N° de lote 011, compuesta por una suspensión de los siguientes antígenos: *C. perfringens* tipo A, B, C y D, *C. septicum*, *C. novyi* tipo B, *C. haemolyticum*, *C. sordellii*, *C. tetani* y *C. chauvoei* adsorbidos en hidróxido de aluminio.

El antígeno de *C. chauvoei* utilizado en esta vacuna fue elaborado a partir de una cepa flagelada. A este antígeno se le realizó el test de potencia para *C. chauvoei* por la técnica de desafío en cobayos dando como resultado un 100 % de protección.

Cuadro 7. Registro de vacunación y sangrado del grupo control y grupo vacunado

Nº caravana		Primera vacunación		Fecha: 25/4/13		Segunda vacunación		Fecha : 28/5/13		Fechas sangrados		
Color Naranja	Trazabilidad	Dosis (mL)	Vía	Lado		Dosis (mL)	Vía	Lado		Día 0	Día 20	Día 40
				I	D			I	D			
314	5084	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
388	5089	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
250	6075	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
430	5095	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
252	5192	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
260	8221	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
228	4112	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
383	9760	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
318	6070	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
436	5094	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13

Nº caravana		Primera vacunación		Fecha: 25/4/13		Segunda vacunación		Fecha : 28/5/13		Fechas sangrados		
Color Verde	Trazabilidad	Dosis (mL)	Vía	Lado		Dosis (mL)	Vía	Lado		Día 0	Día 20	Día 40
				I	D			I	D			
751	4106	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
2060	4113	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
602	5976	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
1249	9769	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
710	4111	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
2059	7378	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
2351	9761	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
1133	6074	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
2249	4114	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13
1817	7379	5	SC	X		5	SC		X	25/4/13	28/5/13	26/6/13

8.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Comparación de muestras relacionadas -Prueba T- (95% nivel de confianza) y los valores medios de obtención de aglutinación (Box, 2005).

9 RESULTADOS

9.1 PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO AGLUTINANTE

La producción y estandarización del antígeno aglutinate se realizó satisfactoriamente cumpliendo con la condición de no autoaglutinar.

9.2 ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA CEPA DE *C. CHAUVOEI*.

El estudio mostró la presencia de los flagelos en la cepa de *C. chauvoei* del Laboratorio Santa Elena. (Figuras 6 y 7)

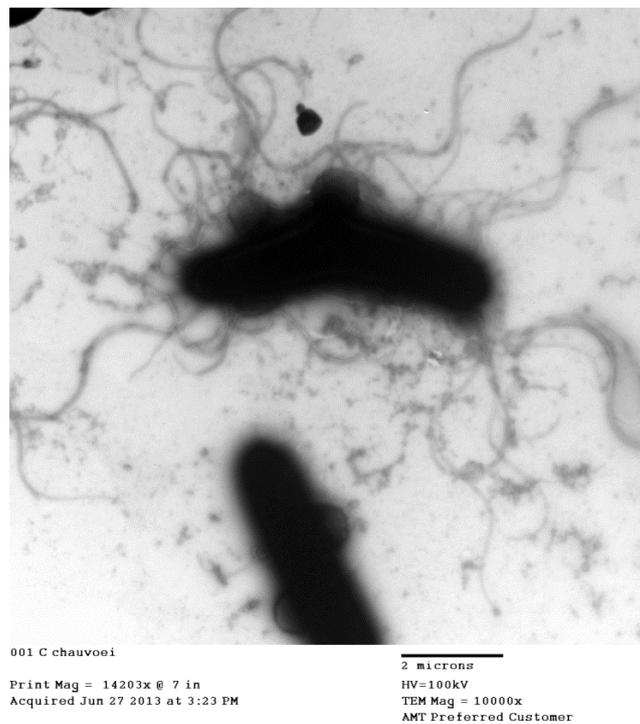


Figura 6. Observación de flagelos de *C. chauvoei* por microscopía electrónica.

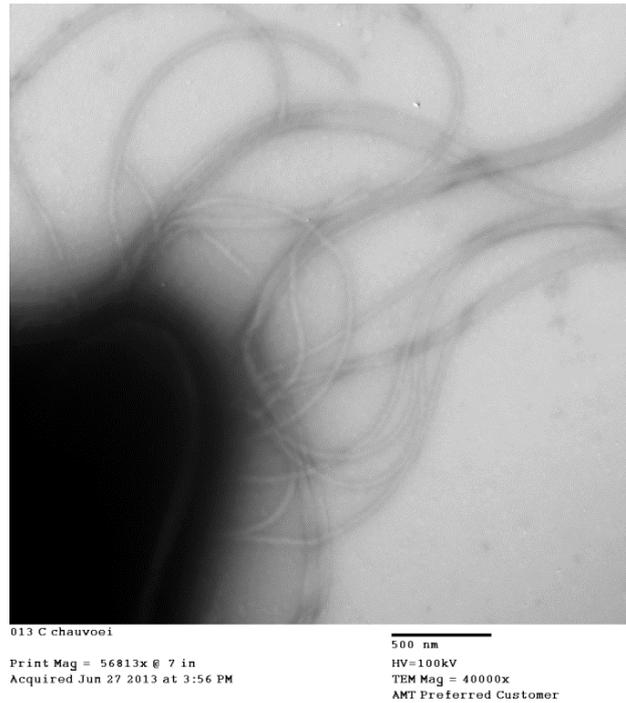


Figura 7. Observación de flagelos de *C. chauvoei* por microscopía electrónica.

9.3 DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN

Se estandarizó la técnica de aglutinación en placa, siendo esta rápida y fácil de realizar.
(Figura 8)



Figura 8. Técnica de aglutinación en placa.

9.4 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES VACUNADOS

9.4.1 TÍTULOS DE ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES CONTROL

Todos los animales fueron negativos a la técnica de aglutinación en el primer, segundo y tercer sangrado.

9.4.2 TÍTULOS DE ANTICUERPOS EN LOS ANIMALES VACUNADOS

Cuadro 8. Resultados del primer sangrado.

Nº caravana		Volumen de suero (µL)									
Color verde	Trazabilidad	5	0.5	0.4	0.2	0.1	0.05	0.04	0.02	0.01	0.005
751	4106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2060	4113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
602	5976	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1249	9769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
710	4111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2059	7378	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2351	9761	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1133	6074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2249	4114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1817	7379	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 9. Resultados del segundo sangrado.

Nº caravana		Volumen de suero (µL)									
Color verde	Trazabilidad	5	0.5	0.4	0.2	0.1	0.05	0.04	0.02	0.01	0.005
751	4106	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2060	4113	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
602	5976	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1249	9769	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
710	4111	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2059	7378	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2351	9761	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
1133	6074	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2249	4114	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
1817	7379	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Cuadro 10. Resultado del tercer sangrado

Nº caravana		Volumen de suero (μL)									
Color verde	Trazabilidad	5	0.5	0.4	0.2	0.1	0.05	0.04	0.02	0.01	0.005
751	4106	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2060	4113	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
602	5976	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1249	9769	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
710	4111	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2059	7378	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2351	9761	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1133	6074	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2249	4114	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1817	7379	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

9.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS

Se estableció un título arbitrario igual al inverso del volumen de suero usado (Cuadro 11/ Grafico 1). Ej.: si el volumen de aglutinación fue $0,05 \mu\text{l}$ = Título 20.

Cuadro 11. Títulos del inverso del volumen de suero del grupo vacunado para el primer sangrado (tiempo cero), segundo sangrado (tiempo veinte) y tercer sangrado (tiempo cuarenta).

Número de caravana	Día 0	Día 20	Día 40
751	0	20	25
2060	0	20	100
602	0	25	100
1249	0	20	50
710	0	10	25
2059	0	25	50
2351	0	20	25
1133	0	20	100
2249	0	20	100
1817	0	20	100

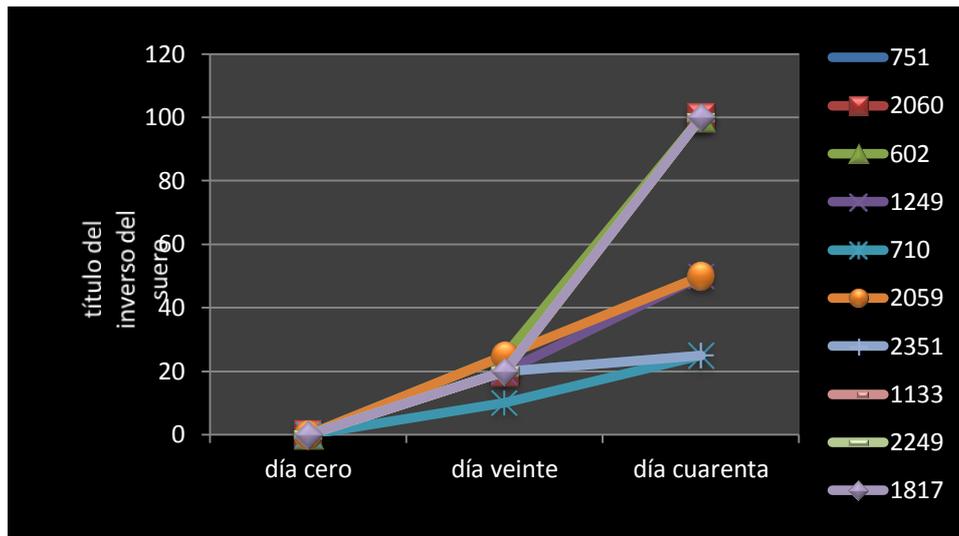


Gráfico 1. Títulos del inverso del volumen de suero.

9.5.1 PRUEBA T ($P < 0,05$)

Día 0 vs Día 20	$P = 0.0$
Día 20 vs Día 40	$P = 0.02$

9.5.2 VALOR MEDIO DE OBTENCIÓN DE AGLUTINACIÓN

Día 20	0,05 μL de suero
Día 40	0,018 μL de suero

10 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El antígeno estandarizado no mostró autoagluinación en contra posición a lo que expresa Tamura (1985). Este inconveniente se solucionó trabajando con cultivos jóvenes de alrededor de 6 horas según lo recomendado por Claus (1972). La técnica de aglutinación resultó ser de fácil realización y aplicación en laboratorios con poco equipamiento. La misma serviría para monitorear nivel inmunitario en rodeos bovinos ya que ha dado una buena relación entre los niveles de anticuerpos que se consideran protectores (menos de 0.5 μ L de suero) y la respuesta al desafío (Claus, 1972).

Desde el punto de vista de bienestar animal esta técnica nos permitiría sustituir la técnica de evaluación in vivo en la cual es necesario el desafío de los animales vacunados con muerte de los testigos. También es una ventaja desde el punto de vista económico ya que el costo de estas pruebas en las especies de destino son muy elevados. La hipótesis planteada se cumple siendo los resultados obtenidos en este experimento, donde aparecen títulos protectores en los animales a los 20 días luego de la revacunación, similares a los que presentó Claus (1972).

Con los datos obtenidos podemos asegurar, con un 95 % nivel de confianza, que las medias de los títulos entre los sangrados fueron significativamente distintos ($P = <0,05$). Tratándose de una vacuna que ya había sido aprobada según la potencia en animales de laboratorio nos permitiría inferir nuevamente (Claus y Macheak, 1972) que vacunas que produzcan niveles de anticuerpos protectivos deben ser consideradas vacunas eficaces.

Esta técnica podría ser utilizada por los laboratorios de control para monitorear a las vacunas que se comercialicen al público aprobadas previamente con la técnica de desafío en animales de laboratorio (CFR, 1995). Bermúdez y col. (1998) obtuvieron un 80 % de protección al desafío contra *C. chauvoei* en bovinos a los 11 meses de vacunados con una vacuna comercial no realizando estudios de anticuerpos. Teniendo en cuenta este trabajo se recomienda seguir con este estudio para determinar la duración de la inmunidad hasta que los niveles protectores desaparezcan.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Assis, R.; Lobato, F.; Días, L.; et al. (2001) Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para el diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. Rev. Med. Vet. 82: 68-70.
2. Bermúdez, J.; Baison, M. (1998). Evaluación de duración de inmunidad de una vacuna comercial. 1º Comunicación. Prácticas Veterinarias. 2: 29-31.
3. BP 85 (British Pharmacopoeia) Disponible en: <http://www.pharmacopoeia.com.uk>. p. 166. Fecha de consulta: 05/06/2013
4. Box, G.; Hunter, W.; Hunter, J. (2005). Estadística para investigadores. España. Ed. Reverté. p. 45-159.
5. British Veterinary Codex (1965) Supplement 1970. UK p. 115-116.
6. CFR 9 (Code of Federal Regulations) (1995). 113.106. Disponible en: <http://www.law.cornell.edu/cfr/text/9/113.106>. Fecha de consulta: 13/07/2013
7. Cattaneo, M.; Bermúdez J. (2010). *Carbunco Sintomático*. Disponible en: www.santaelena.com.uy/andocasociado.aspx?348,6827. Fecha de consulta: 07/07/2013.
8. Cattaneo, M.; Paris, N.; Campos, F.; Bermúdez J. (2011) Puesta punto de la técnica de PCR multiplex para la identificación de *Clostridium chauvoei* y *septicum*. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú. Uruguay. p. 248-249.
9. Cattaneo, M.; Paris, N.; Puentes, R.; Assis, R.; Bermúdez J. (2012) Producción y evaluación de anticuerpos fluorescentes contra *Clostridium chauvoei* y *septicum*. XL Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú. Uruguay. p.183-184.
10. Chandler, H.; Gulasekharan, J. (1974). The protective antigen of highly immunogenic strain of *Clostridium chauvoei* including an evaluation of its flagella as a protective antigen. Journal of General Microbiology. 84: 128-134.
11. Chandler, H. (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.
12. Claus, K.; Macheak, M. (1972). Preparation of a *Clostridium chauvoei* antigen and determination of protective immunity by plate agglutination test. Am. J. Vet. Res. 33 (5): 1045-1052.
13. Crichton, R.; Harriss, D.; McKay, D. (1986). Standards for *Clostridium chauvoei* vaccines: the relationship between the response of guinea pigs and sheep following vaccination and challenge with virulent *C. chauvoei*. Aust. Vet. J. 63: 68-70.

14. De Freitas, A. (1987). Enfermedades producidas por el género *Clostridium*. En: Bonino Morlán, Durán del Campo, Mari. Enfermedades de los lanares. Montevideo, Hemisferio Sur, V. 2 p. 11- 54.
15. El Observador. (2011) Disponible en: <http://campolider.com/2011/12/03/la-ganaderia-pierde-us-100-millones-por-no-prevenir-la-clostridiosis/>. Fecha de consulta: 03/06/2013
16. Garofolo, G; Galante, D; Serrecchi, L; Buonavogli, D; Fasanella, A. (2011). Development of a real time PCR taqman assay based on the TPI gene for simultaneous identification of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. Journal of Microbiological Methods. 84: 307–311.
17. Lange, M; Neubauer, H; Seyboldt, C. (2010). Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. Molecular and Cellular Probes; 24:204-210.
18. Larson, B. (2011). Clostridial diseases. Angus Journal; 25:116-117.
19. Macheak, M.; Claus, K.; Maloy, S. (1972) Potency testing *Clostridium chauvoei* containing bacterins: relationship of agglutination titers and potency test in cattle. Am. J. Vet. Res. 33, 5, 1053-1058.
20. Mareco, G. (2008). Clostridiosis ovina. Ovinos y Caprinos. Disponible en: <http://www.ovinos-caprinos.com.ar/SANIDAD/ClostridiosisOvina.pdf>. Fecha de consulta: 05/07/2013.
21. Martínez, E. (2011). Estudio e Identificación de Antígenos Vacunales de *Clostridium chauvoei*. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas – IPN. México. p 5-37.
22. MERCOSUR/GMC/RES N° 77/96 (1997). Reglamento técnico para el control de las vacunas contra Carunco Sintomático, Gangrena Gaseosa, Enterotoxemia y Tétanos, inactivadas y conservadas refrigeradas. Disponible en: http://gd.mercosur.int/SAM/GestDoc/PubWeb.nsf/OpenFile?OpenAgent&base=SAM%5CGestDoc%5CDocOfic0Arch.nsf&id=832579C700726F0D8325775A0063CAD9&archivo=RES_077-1996_PT_RTMVacuna.DOC. Fecha de consulta: 10/07/2013
23. Moussa, R. (1959). Antigenic formulae for *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. J. Pathol. Bacteriol. 77: 341-350.
24. OIE (Organización Internacional de Epizootias) – 1996. Productos biológicos armonizados, A.1.4.2. C. *chauvoei*. Disponible en: <http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/biologicos/2CHAUVOEI.htm>. Fecha de consulta: 06/06/2013

25. Perera, A. (2013). Comunicación personal. Encargada de la sección de evaluación de biológicos del DILAVE (Dirección de Laboratorios Veterinarios), Depto. de Control de Productos Veterinarios, (MGAP). Montevideo. Uruguay.
26. Radostits, O; Gay, C; Blood, D; Hinchcliff, K. (2002). Enfermedades causadas por bacterias. En: Radostits, O; Gay, C; Blood, D; Hinchcliff, K. Medicina Veterinaria, 9a ed, vol. 1: 893- 922.
27. Resolución N° 118/012, DGSG. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Resoluciones/RES%20N%C2%B0%20118%2031_07%20CAMPOS%20DE%20RECR%C3%8DA%20Registro%20en%20Divisi%C3%B3n%20Sanidad%20Animal.pdf. Fecha de consulta: 06/06/2013
28. Riet-Correa, F (1998). Doenças bacterianas. En: Riet-Correa, F; Schild, L; Méndez, M. Doenças de ruminantes e equinos. p. 178.
29. Robles, C. (1998). Enfermedades clostridiales del ganado. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA. Argentina. p. 4-16.
30. Rodríguez-Cavallini, E.; Vargas, P.; Rodríguez, C.; Quesada-Gómez, C.; Gamboa-Coronado, M. (2011). Phenotypic identification of over 1000 isolates of anaerobic bacteria recovered between 1999 and 2008 in a major Costa Rican hospital. Clin. Microbiol. Infect. 17:1043-7.
31. Runnells, R.; Monlux, A.; Monlux, W. (1968). Principios de Patología Veterinaria. D.F. México. Edit. CECSA. p. 862.
32. Popoff, M.; Bouvet, P. (2009). Clostridial toxins. Future Microbiology. 4:1021-64.
33. Silva, A. (2006) Padronização e aplicação da PCR multiplex na tipificação da *Cl. perfringens* aislados de suínos diarreicos. Tesis de grado. Escola da Veterinaria. UFMG. Belo Horizonte, Brasil. p. 1-15
34. Songer, J. (2010). Histotoxic clostridia. En: Songer, J. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4°ed. Iowa. Blackwell. P. 203-210.
35. Sterne, M. (1981). Clostridial infections. Brit. Vet. Journal, 137: 443-454.
36. Sterne M.; Batty, I. (1978). Clostridios patógenos. Zaragoza. España. Ed. Acriba. p. 45-159.
37. Stevenson, J. (1980) Protective Cellular Antigen of *Clostridium chauvoei*. American Journal Veterinary Research. 41, 4: 650-653.
38. Tamura, Y.; Minamoto, N.; Tanaka, S. (1984) Demonstration of protective antigen carried by flagella of *Clostridium chauvoei*. Microbiol. Immunol. 28: 1325-1332.
39. Tizard, I. (2009). Immunodiagnostic techniques. En: Tizard, I. Veterinary Immunology, 8° ed. St. Louis, Missouri. ELSEVIER. p. 509-527

40. Quinn, P.; Carter, M.; Carter, G. (2004). Clinical Veterinary Microbiology. España ELSEVIER. p. 191-208
41. Uzal, F.; Songer, J. (2008). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J. Vet. Diagn. Invest. 20: 253-65.
42. Uzal, F. (2008). Enfermedades clostridiales de los rumiantes. Disponible en: <http://www.ovinos-caprinos.com.ar/SANIDAD/Enfermedades%20Clostridiales%20en%20Rumiantes.pdf>. Fecha de consulta: 03/04/2013
43. Uzal, F. (2010). Enfermedades clostridiales de los animales domésticos. Disponible en: http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Documentos/EnfermedadesInfecciosas/2010/Enfermedades%20Clostridiales-%20Francisco_UZAL.pdf. Fecha de consulta: 03/04/2013
44. Uzal, F. (2013) Enfermedades clostridiales de los rumiantes, con especial énfasis en bovinos. Parte 1: Enteroroxemias, abomasitis y enteritis. XLI Jornadas de Buiatria del Uruguay. p. 65.
45. Uzal, F. (2013) Enfermedades clostridiales de los rumiantes, con especial énfasis en bovinos. Parte 2: Enfermedades histotóxicas y neurotóxicas. XLI Jornadas de Buiatria del Uruguay. p. 68.

12 ANEXOS

12.1 EVALUACIÓN DE BIOLÓGICOS EN EL URUGUAY

Informe sobre entrevista realizada a la Dra. Adriana Perera, DI.LA.VE- MGAP. (Perera, 2013).

12.1.1 PROCEDIMIENTOS PARA EL REGISTRO DE PRODUCTOS VETERINARIOS

Este trámite se tiene que iniciar únicamente por vía web.

1. Debe entrar en página web de MGAP e ingresar a trámites en línea.
2. Ingresar su usuario y contraseña para poder acceder al trámite Registro de Productos veterinarios.
3. Deberá llenar el formulario de acuerdo a como se indica en su instructivo.
4. Este formulario debe imprimirse para luego ser presentado en el Departamento.
5. Los documentos requeridos se podrán adjuntar como archivo o presentados en el Departamento en forma de papel.
6. Presentarse al Departamento para entregar el formulario con el timbre profesional y documentación para ser chequeada.
7. Dicha solicitud será evaluada en el Departamento lo cual será comunicado por vía correo electrónico cualquier observación realizada, si la hubiera.
8. Dicho registro deberá ser abonado ya sea en la sección de contaduría cuando ingrese el documento o presentar el comprobante de pago del Banco República en la mesa de entrada del Departamento.

12.1.2 DOCUMENTACIÓN NECESARIA PARA PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Los documentos pueden adjuntarse formato electrónico o formato papel.

- 1- Formulario impreso el cual fue llenado vía web (con timbre profesional)
- 2- Bibliografía que avale las indicaciones de uso, dosis, etc.
- 3- Proyecto de etiqueta y folletos en español.
- 4- Pruebas realizadas por la empresa sobre los lotes terminados.
- 5- Prueba de estabilidad de tres lotes.
- 6- Certificado de origen de las cepas.
- 7- Poder del laboratorio fabricante para registrar y distribuir productos.
- 8- Habilitación de establecimiento elaborador por normas BPM (Buenas Prácticas de Manufacturación).
- 9- Certificado de libre venta del país de origen.
- 10- Certificado o informe oficial de que las materias primas utilizadas están libres de BSE (Encefalitis Espongiforme Bovina).

12.1.3 PRUEBAS QUE SE REALIZAN

Una vez entregada la documentación del biológico siempre y cuando no existan observaciones, el laboratorio tiene que presentar una solicitud de retiro de muestras. Se extraen 3 frascos de cada serie de los cuales la DILAVE se queda con dos y uno queda lacrado con fecha de retiro y firma del funcionario de la DILAVE en el laboratorio productor/importador hasta el vencimiento de la misma. En caso de no aprobar las pruebas pertinentes se analizará esta contra muestra.

A cada serie a presentar se le otorgará un número de entrada.

Una vez retirados los frascos y aprobados todos sus controles se le otorga un número de registro.