

January 2005

Determinación y evaluación de las condiciones óptimas para la producción de una vacuna contra *Clostridium chauvoei*

Jorge Humberto Ossa
Universidad de La Salle, ossajorge@netscape.net

Claudia P. Ballén Garzón
claudiapatricia79@starmedia.com

Nelson Mora Bonilla
VECOL S.A., investigacion@vecol.com.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>

Citación recomendada

Ossa JH, Ballén Garzón CP y Mora Bonilla N. Determinación y evaluación de las condiciones óptimas para la producción de una vacuna contra *Clostridium chauvoei*. *Rev Med Vet.* 2005;(9): 69-81.

This Artículo de Investigación is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de Medicina Veterinaria by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Determinación y evaluación de las condiciones óptimas para la producción de una vacuna contra *Clostridium chauvoei*

Jorge Humberto Ossa* / Claudia P. Ballén Garzón** / Nelson Mora Bonilla***

RESUMEN

El *Clostridium chauvoei* es responsable de enfermedades como carbón sintomático (pierna negra) y edema maligno en ganado vacuno, ovino y en muchos otros animales domésticos y silvestres. Vacunas para el control de ésta y otras enfermedades del ganado causadas por varias especies de *Clostridium*, son ampliamente usadas. Para la producción de la vacuna es conveniente que cultivos con alta densidad celular y con un alto poder inmunogénico sean obtenidos, principalmente porque la inmunidad de *Clostridium chauvoei* es generalmente considerada como antibacteriana más que antitóxica. Por consiguiente las condiciones del cultivo tienen que ser supervisadas y controladas adecuadamente. El objetivo de este estudio fue optimizar la producción de una vacuna contra *Clostridium chauvoei* por las cepas IRP-434, IRP 206, ATCC 10092, ATCC 11957 y LANIP empleadas en la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios, VECOL S.A., determinando el mejor medio de cultivo que permitiera la mayor producción de biomasa. En este sentido, el medio de cultivo, *Clostridium* Modificado, favoreció la máxima producción de biomasa con valores promedio de $31,5 \times 10^8$ células/ml para la cepa IRP 434 y $31,8 \times 10^8$ células/ml para la cepa IRP 206. Una vez seleccionado el medio *Clostridium* Modificado, las cepas IRP 206 e IRP 434 y el tiempo de incubación para la óptima producción de masa celular (16 - 48 horas), se procedió a determinar las actividades letales de las cepas y por último se confirmó su inmunogenicidad a través de la prueba de potencia realizada en cobayos. La presencia de la proteína flagelar se confirmó a través de la técnica de electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.

Palabras clave: *Clostridium chauvoei*, antígenos flagelares, producción

DETERMINATION AND EVALUATION OF THE BEST CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF A VACCINE AGAINST *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI*

ABSTRACT

Clostridium chauvoei is responsible for a number of diseases such as symptomatic coal (blackleg) and malignant oedema in cattle, sheep and many other domestic and wild animals. Vaccines for the control of this and other livestock diseases caused by various species of clostridia are widely used. For vaccine production it is desirable that high cellular density cultures with high immunogenic power are obtained, mainly because immunity to *Clostridium chauvoei* is generally considered to be antibacterial rather than antitoxic. Consequently, culture conditions have to be adequately monitored and controlled. The aim of this work was to optimise the production of a vaccine against *Clostridium chauvoei* based on strains IRP-434, IRP 206, ATCC 10092, ATCC 11957 and LANIP, used by "Empresa Colombiana de Productos Veterinarios", VECOL, S.A., to determine the culture medium that allows the highest cellular density. Results show that modified clostridium medium allows the highest cellular density production with average values of $31,5 \times 10^8$ cell/ml for the stock IRP 434 and $31,8 \times 10^8$ cell/ml for the stock IRP 206. Once defined the modified clostridium medium, the stock IRP 434, IRP 206 and growth time as the most suitable for optimal biomass production (16 - 48 hours), the lethal activity of the stock ($LD_{50} = 10^{6.6}$, $10^{6.8}$) was determined, the immunogenicity was evaluated through a potency test carried out in guinea-pigs. The presence of the flagellar protein was confirmed through the SDS-PAGE electrophoresis technique.

Keywords: *Clostridium chauvoei*, flagellar antigens, production.

* M.V., MSc. Docente Universidad de La Salle, Jefe de Producción Biológicos VECOL. E-mail: ossajorge@netscape.net

** Lic. Química y Biología, MSc. E-mail: claudiapatricia79@starmedia.com

*** M.V. Director de Investigación VECOL S.A. investigacion@vecol.com.co

Fecha de recepción: 26 de enero de 2005

Fecha de aprobación: 22 de abril de 2005

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Clostridium* son bacilos anaerobios estrictos o microaerófilos, formadores de endosporas, grampositivos, que son patógenos para el hombre y los animales. La mayoría de las especies descomponen las proteínas, fermentan los carbohidratos y producen exotoxinas. Varias especies son patógenas y habitan como saprófitas en el suelo y en el tracto gastrointestinal del hombre y los animales. Ciertas especies son importantes patógenos humanos que ejercen sus efectos principalmente por medio de la producción de potentes toxinas.

Las especies de *Clostridium* producen gas, predominantemente hidrógeno, bajo condiciones anaeróbicas en heridas profundas de tejidos causan gangrena o necrosis tisular de tipo severo. La gangrena debido a una infección es llamada gangrena gaseosa, para distinguirla de la gangrena seca, la cual ocurre cuando un tejido tiene insuficiente suministro de sangre. Las infecciones que ocasionan se desencadenan por la presencia de microorganismos en los tejidos afectados y por la acción de sus toxinas, proteínas biológicamente activas.

El presente trabajo hace énfasis en una especie de bacteria, *Clostridium chauvoei* que causa enfermedades como pierna negra, que es una miositis enfisematosa necrosante del ganado vacuno y ovino. Produce cuatro toxinas (Alfa, Beta, Gama y Delta) emparentadas con las de *C. septicum*, un factor de edema y con frecuencia, una neuraminidasa. Se cree que las toxinas, en especial la toxina alfa es necrosante, y posiblemente el factor de edema, la hialuronidasa (gamma), la DNAasa (beta), la hemolisina oxígeno lábil (delta) y la neuraminidasa, son responsables de las lesiones iniciales. Es posible que contribuya a producir las el metabolismo bacteriano, que produce gas por fermentación.

Dadas las pérdidas económicas que implica para el sector ganadero la alta mortalidad de bovinos y ovinos

ocasionada por *C. chauvoei* y sus toxinas, se hace necesario prevenir el Carbunco sintomático y Gangrena gaseosa mediante la generación de productos biológicos (bacterinas y toxoides) que se preparan a través de procesos de fermentación realizados por los microorganismos en medios de cultivo líquidos, que incluye la inactivación química de la bacteria (bacterina) sin que se pierda su actividad inmunógena.

El principal obstáculo en la preparación de bacterinas derivadas de la estructura somática de *C. chauvoei*, radica en determinar la etapa de crecimiento, inmunogenicidad, densidad celular específica y el medio de cultivo apropiado para obtener una dosis mínima protectora.

Por lo tanto era de vital importancia para la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios, VECOL S.A., estandarizar un sistema de cultivo apropiado para incrementar la capacidad inmunogénica de cepas de *C. chauvoei*, controlando todos los posibles factores que influyan en la producción de biomasa, con el fin de obtener un inmunógeno potente para la elaboración de una bacterina específica empleada en la inmunoprofilaxis y prevención de infecciones agudas y letales en dichos animales causada por *C. chauvoei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS DE *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI*

Las cepas empleadas en el estudio se seleccionaron de un cepario de microorganismos existente en la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios VECOL S.A. Las cepas se conservaron en solución de criopreservación v/v a - 70°C en medio Reforzado Modificado, en una solución de Glicerol - Solución fisiológica estéril 50:50, en cantidades de 1 ml de semilla - 1 ml de solución criopreservante, en viales provistos de taparroscas.

Se seleccionaron cinco cepas de *Clostridium chauvoei*: IRP 434, IRP 206, ATCC 10092, ATCC 11957 y LANIP (ICA).

SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Se ensayaron doce medios de cultivo con el propósito de observar cuál de ellos permitía la mayor producción de biomasa. Los medios seleccionados fueron:

Medio BHI (infusión Cerebro Corazón, OXOID CM-225); L-Cistina (SIGMA C-7755), Medio BHI (infusión Cerebro Corazón, OXOID CM-225); Sodio Formaldehído Sulfoxilato (1g/L) (BHI S-F-S), Medio BHI (infusión Cerebro Corazón, OXOID CM-225); L-Cistina (SIGMA C-7755); Sodio Formaldehído Sulfoxilato (1g/L) (BHI S-F-S), Medio Anaerobio Modificado, Medio Reinforced, Medio Reinforced Modificado, Medio Schaedler, Medio Clostridium Modificado, Medio Vecol, Medio Infusión Hígado, Medio Tioglicolato, Medio Tioglicolato Modificado¹.

FERMENTADORES

Para este estudio se diseñaron fermentadores de 250 ml en el laboratorio con el fin de mantener constantes las condiciones del cultivo.

CONDICIONES DE CULTIVO

Temperatura: 37° C; sin agitación; control de pH: medio Clostridium Modificado fue de 7,3 y en el medio Reforzado Modificado fue de 8,3 - 8,5.

DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *C. CHAUVOEI*

Se realizó la cinética de crecimiento para la producción de biomasa de las cepas IRP 434, IRP 206, ATCC 10092, ATCC 11957 y LANIP (ICA) de *C. chauvoei* con el fin de establecer la fase de crecimiento del microorganismo que produjera la máxima

concentración de células/ml. Los medios se inocularon al 20% con las semillas de *C. chauvoei*.

De estos cultivos se tomaron muestras de 10 ml de cada fermentador (cinco fermentadores por cada medio de cultivo) a las dieciséis (16), veinticuatro (24), cuarenta (40), cuarenta ocho (48) y setenta y dos (72) horas de cultivo, para establecer la cinética de crecimiento del microorganismo.

El método que se estableció para la evaluación de biomasa fue densidad óptica por turbidimetría. El instrumento de medida fue el espectrofotómetro (Spectronic 20D) y las unidades de medición fueron Absorbancia (cantidad de luz retenida por las células, proporcional al número de ellas) o Porcentaje de Transmitancia (%T, luz que las células dejan pasar, sus valores son inversos a la cantidad de células presentes).

PRUEBA DE LETALIDAD DE LAS CEPAS DE *C. CHAUVOEI* EN COBAYOS

Para verificar la capacidad patogénica de las cepas empleadas en este estudio, se realizó la prueba de patogenicidad en colonias de cobayos exocriados Hartley, de 350 - 450 g de peso (grupos de cuatro cobayos por dilución), a los cuales se les inoculó por vía intramuscular, 0.5 ml de cada una de las diluciones de los cultivos de *C. chauvoei*, de las cepas que se seleccionaron en la determinación de la cinética de crecimiento y en los medios de prueba. A continuación los cobayos se observaron durante 72 horas y se registró a diario la supervivencia o mortalidad y se determinó la dosis letal cincuenta (DL₅₀).

DOSIS LETAL CINCUENTA (DL₅₀).

Para realizar esta prueba, a partir de un cultivo de *C. chauvoei* se hicieron diluciones en base 10 de acuerdo al título esperado del microorganismo en solución de CaCl₂ al 5% estéril. Para determinar en cuál dilución muere el 50% de los cobayos, se

(1) Estos medios fueron modificados eliminando uno de sus componentes en la formulación: el agar

inocularon 4 cobayos por vía intramuscular con 0.5 ml de cada una de las diluciones realizadas, y otro grupo de 4 cobayos control inoculados con el medio seleccionado y solución de CaCl_2 al 5% estéril con el fin de descartar posibles efectos tóxicos en los cobayos, ocasionados por el medio de cultivo, por el CaCl_2 estéril o muerte por traumatismo. Después de 72 horas de observación, se registraron solamente los animales muertos. Los cálculos se realizaron por el método estadístico de Reed-Muench.

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA DURANTE LOS CULTIVOS

Por el método de Antrona se determinó la concentración final de glucosa como fuente de energía tanto para las cepas que produjeron la máxima cantidad de biomasa como para los medios seleccionados, a través de una técnica por espectrofotometría que se basó en la utilización de un compuesto llamado antrona que se disuelve en ácido sulfúrico concentrado. El medio ácido hidroliza en enlace glicosídico de la sacarosa y los monosacáridos resultantes reaccionan con la antrona produciendo un color verde azulado. Se preparó una solución de 0,0155 gramos de glucosa en 25 ml de agua destilada. A partir de esta solución se prepararon cinco patrones de glucosa y se procedió a hacer las lecturas de porcentaje de transmitancia (% T) a 622 nm.

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA FLAGELAR DE *C. CHAUVOEI*.

Al concentrado de proteínas donde posiblemente se encontraba la proteína flagelar, se le realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (usando un gel de concentración de 10% y un gel de separación de 12%) con dodecil sulfato de sodio (PAGE SDS), para separar las proteínas del concentrado, confirmar su presencia y calcular su peso molecular, previamente fue necesario cuantificar las proteínas (método de Bradford-azul brillante de Coomassie. BIO - RAD

ASSAY) obtenidas en el concentrado con el fin de establecer la cantidad (40 mg) de proteína a sembrar en cada pozo de los geles de poliacrilamida. Con esta prueba lo que se hizo fue detectar la presencia de la proteína flagelar y estimar su peso molecular.

FORMULACIÓN DE VACUNAS

La formulación de vacunas se llevó a cabo teniendo en cuenta el mejor medio de cultivo y cepa de acuerdo con lo establecido en cuanto a horas de cultivo, densidad óptica, esporulación. Después de determinar experimentalmente el medio y la cepa que produjo la mayor cantidad de células/ml ([biomasa]), se seleccionaron diferentes cultivos de 24, 48 y 72 horas de crecimiento y se procedió a determinar si las vacunas que contienen *Clostridium chauvoei* estimulan la producción de una inmunidad satisfactoria.

PRUEBA DE POTENCIA EN COBAYOS

Uno de los objetivos principales de este estudio fue verificar la capacidad inmunogénica de cada una de las cepas seleccionadas de *C. chauvoei*. Esta prueba empleó cobayos (*Cavia porcellus*) raza Hartley, para determinar si las vacunas que contenían *Clostridium chauvoei* (cepas IRP 434, IRP 206, LANIP, 11957 Y 10092), estimulaban la producción de una respuesta inmune apropiada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos obtenidos de tres (3) réplicas de ensayos independientes, se realizó mediante un análisis de varianza de dos factores, el test de Tukey, y análisis de correlación.

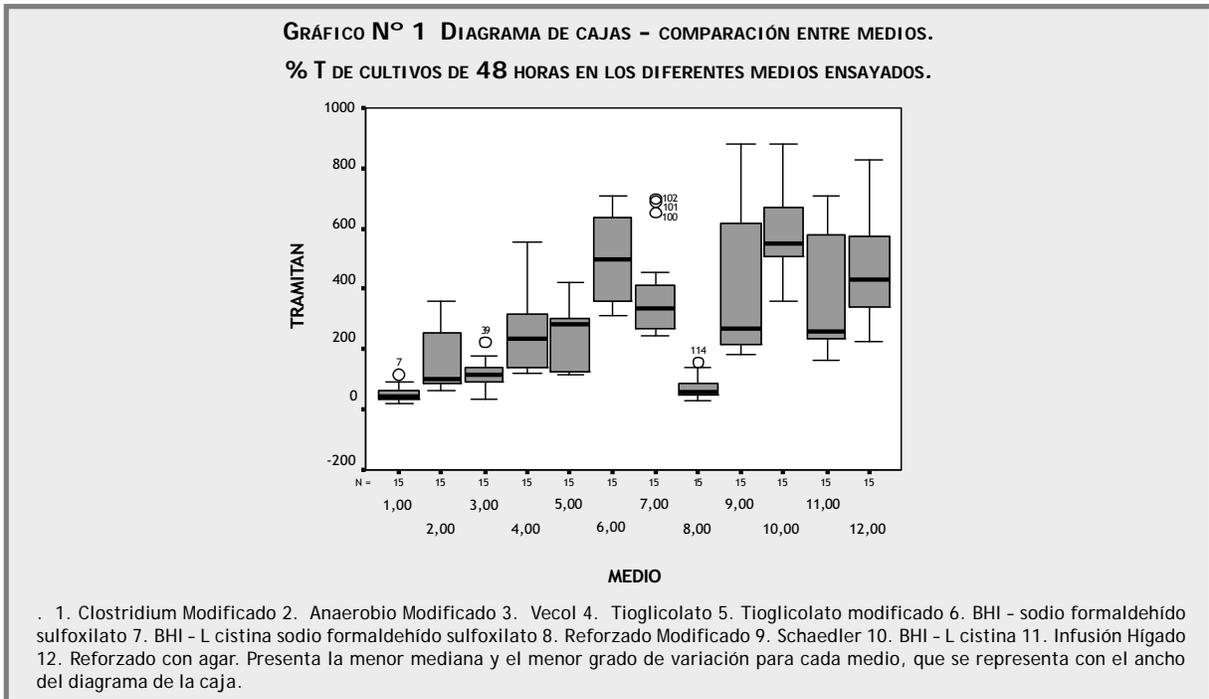
DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El objetivo principal de este trabajo fue optimizar la producción de una vacuna contra *C. chauvoei*: para ello se seleccionaron las cepas que produjeran

la mayor cantidad de biomasa, el medio de cultivo al cual se presenta dicha producción, variables que fueron establecidas. Se realizaron pruebas de letalidad y de potencia en cobayos. Para verificar la proteína flagelar se llevó a cabo técnicas *in vitro* como cuantificación de proteínas y electroforesis.

Se realizaron tres réplicas de los ensayos con el fin de evaluar la producción de biomasa en 12 medios de cultivo, lo cual se evaluó a través del porcentaje de tramitancia (a una longitud de onda de 540 nm) de cada ensayo correlacionando los datos con la escala Nefelométrica de Mc Farland determinando así el

número de células/ml y la capacidad inmunogénica y patogénica de las cepas evaluadas por técnicas como la actividad letal *in vivo* y pruebas de potencia en cobayos. La concentración de células/ml se expresó en términos de %T (Tramitancia) y la actividad letal y las pruebas de potencia en términos de la DL_{50} y dosis mínima protectora respectivamente. De acuerdo con los datos del Gráfico 1, existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de tramitancia de los medios evaluados ($p < 0.05$). Los medios de cultivo Clostridium Modificado y Reforzado Modificado favorecieron la máxima producción de biomasa.



En estos resultados se observó que parámetros de crecimiento como la concentración final de biomasa fueron marcadamente afectados por los tipos de medios evaluados, debido a que cada medio tiene una composición diferente siendo algunos más enriquecidos en comparación a otros o con componentes suplementados que favorecen la concentración final de biomasa. (Cortiñas, 1999)

De acuerdo con los datos de los Gráficos 2 y 3 existen diferencias estadísticamente significativas entre las

cepas evaluadas ($p < 0.05$), con respecto al tiempo de cultivo de la cepa que produjo la máxima concentración de biomasa tomando como variables la densidad óptica del cultivo, tiempo de cultivo, pH y el porcentaje de esporulación.

Las cinco cepas mostraron cinéticas diferentes de crecimiento y densidades celulares finales en un sistema de cultivo en fermentador en donde la curva de crecimiento se inicia antes de las 16 horas hasta las 40 horas (Fase de latencia y logarítmica) y

permanece constante hasta las 48 horas (Fase estacionaria), fase en la cual se logra la máxima concentración de células/ml en el medio Clostridium Modificado de acuerdo con lo reportado con Mattar, (2002). En el medio reforzado se observa según el Gráfico 2 que para la cepa IRP 434, a las 48 horas de cultivo el % de Tramitancia decrece significativamente, lo cual se puede explicar por el cambio de fase vegetativa a fase esporulativa del microorganismo, pero que no indica pérdida de masa. De igual forma

se presenta para las cepas ATCC 10092 y ATCC 11957 a partir de las 48 horas de cultivo.

Parámetros de crecimiento como período lag, rata específica de crecimiento (m) y concentración final de biomasa, son afectados por la temperatura de incubación (Cortiñas, 1994). La temperatura óptima para la producción de células y para la asimilación de la fuente de carbono fue de 37°C, siendo un parámetro constante en todas las cinéticas.

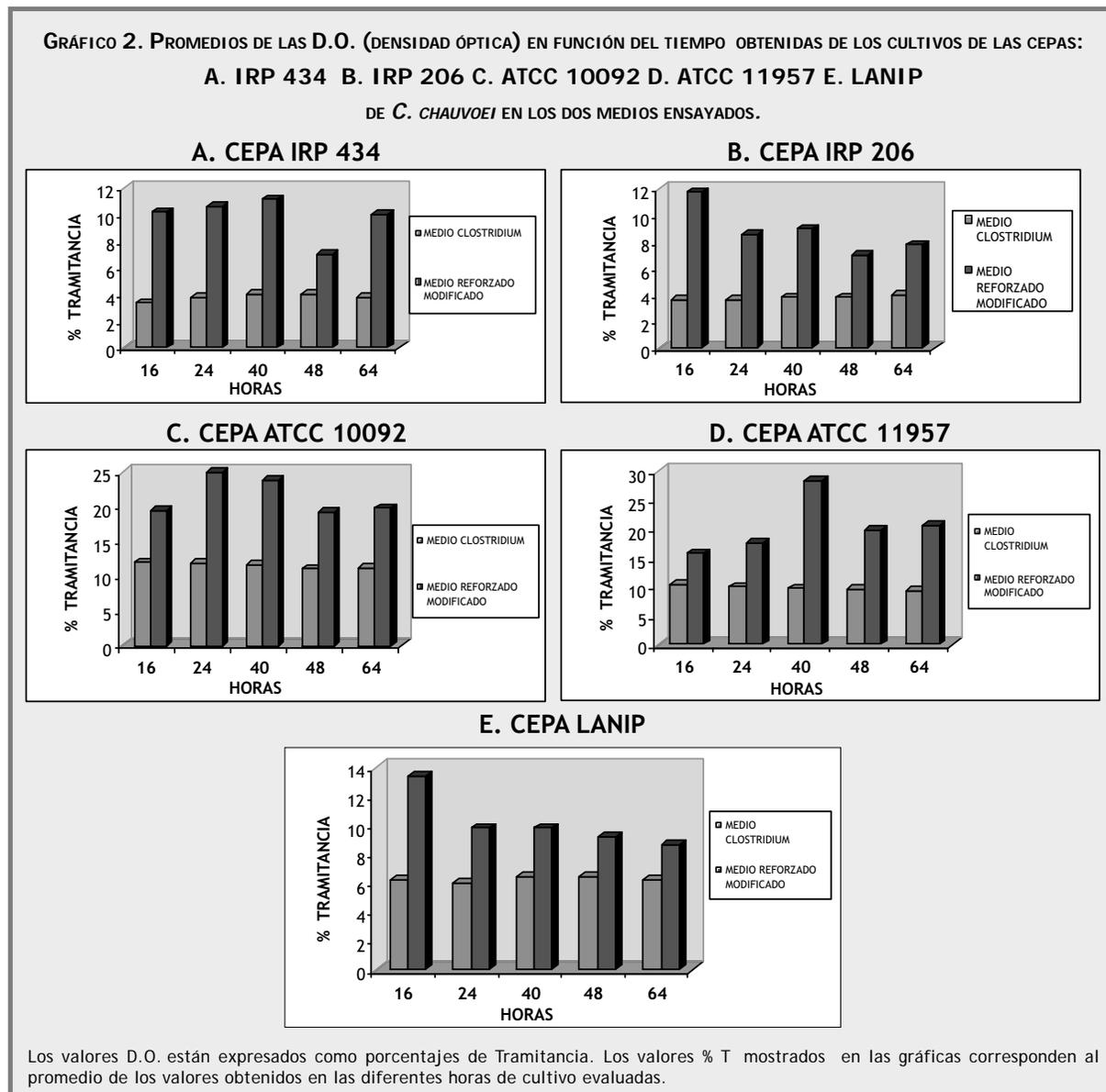
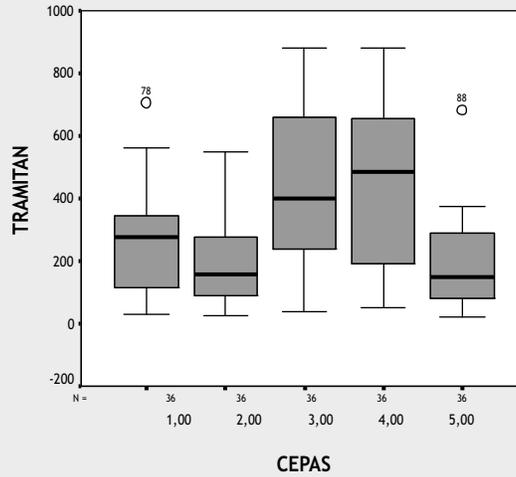


GRÁFICO 3. DIAGRAMA DE CAJAS - COMPARACIÓN ENTRE CEPAS. 1,00 IRP 434 2,00 IRP 206 3,00 ATCC 10092 4,00 ATCC 11957 5,00 LANIP.



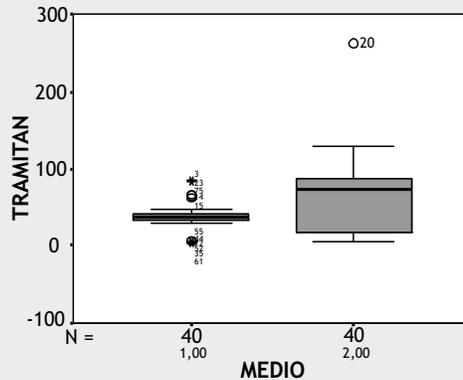
Presenta la menor mediana y el menor grado de variación para cada medio, que se representa con el ancho del diagrama de la caja.

Después de determinar tanto los medios como las cepas más productivas de acuerdo con los ensayos anteriores, se realizaron cinco cinéticas en los dos medios de cultivo: Clostridium Modificado y Reforzado Modificado y con las cepas IRP 206 y 434 en fermentadores de 250 ml.

De acuerdo con el Test de Tukey, Gráficos 4 a 6, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) para las cepas ensayadas IRP 206 e IRP 434, en donde cualquiera de las dos favorece la producción de masa celular. Por el contrario existen diferencias estadísticamente

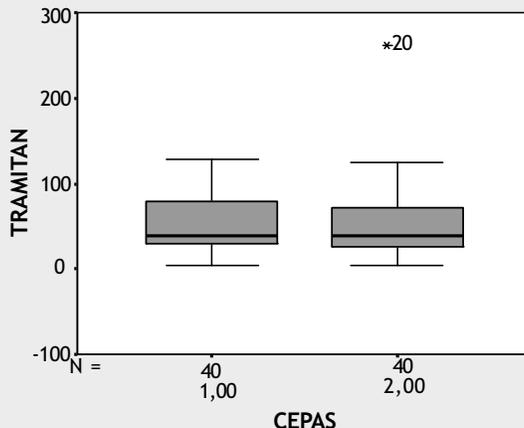
significativas entre los medios, favoreciendo más la producción de biomasa el medio Clostridium Modificado. En cuanto a las horas de cultivo, se establece que el tiempo no es una variable estadísticamente significativa y se corrobora que el periodo óptimo de cultivo se da entre las 16 y 48 horas de cultivo, obteniéndose la máxima densidad celular final de $33,0 \times 10^8$ células/ml, tanto en el medio Clostridium como Reforzado Modificado, comparando la respuesta de la variable dependiente con la escala nefelométrica de Mc Farland.

GRÁFICO 4. DIAGRAMA DE CAJAS - COMPARACIÓN ENTRE MEDIOS. 1,00 CLOSTRIDIUM MODIFICADO 2,00 MEDIO REFORZADO MODIFICADO.



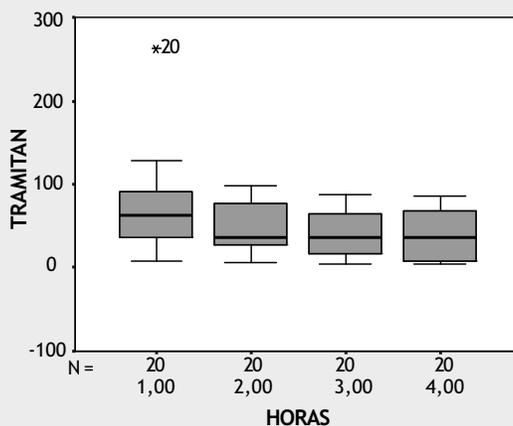
Presenta la menor mediana y el menor grado de variación para cada medio, que se representa con el ancho del diagrama de la caja.

GRÁFICO 5. DIAGRAMA DE CAJAS - COMPARACIÓN ENTRE CEPAS. 1,00 IRP 434 2,00 IRP 206.



Presenta la menor mediana y el menor grado de variación para cada medio, que se representa con el ancho del diagrama de la caja.

GRÁFICO 6. DIAGRAMA DE CAJAS - COMPARACIÓN ENTRE HORAS. 1,00 16 2,00 24 3,00 40 4,00 48.



Presenta la menor mediana y el menor grado de variación para cada medio, que se representa con el ancho del diagrama de la caja.

Al final de la producción de biomasa en los cultivos, se verificó la actividad letal en cobayos para cada cultivo (Tabla 1). De igual forma se ratificó que los componentes del medio de cultivo empleado y que la solución salina estéril no fueron la causa de la muerte de los cobayos. Entre las diluciones 10^7 y 10^8 se localiza la DL_{50} en el medio reforzado modificado y entre 10^6 y 10^7 en el medio clostridium modificado para las cepas IRP 434 e IRP 206

respectivamente, lo cual se determinó aplicando la fórmula de Reed Muench.

TABLA 1. ACTIVIDAD LETAL DE CULTIVOS DE *C. CHAUVOEI*

DL_{50}	IRP 434	IRP 206
MEDIO CLOSTRIDIUM	$10^{6.6}$	$10^{6.8}$
MEDIO REFORZADO	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$

La concentración final de glucosa como fuente de energía tanto para las cepas que produjeron la máxima

cantidad de biomasa como para los medios seleccionados, se pueden observar en la Tabla 2.

TABLA 2. RESULTADOS MÉTODO DE ANTRONA

A. PATRONES DE GLUCOSA

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA µg/ml	ABSORBANCIA 622 nm
24,8	0.139
49,6	0.285
74,4	0.428
99,2	0.596
124	0.745

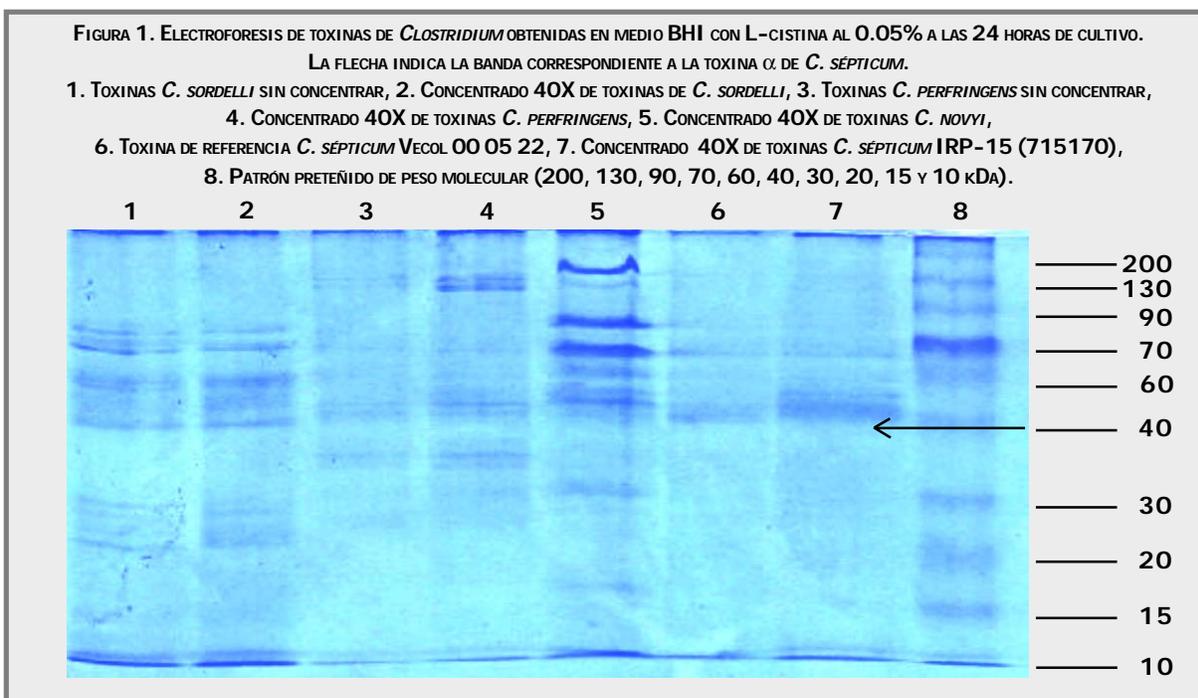
B. RESULTADOS DE CONSUMO DE GLUCOSA EN 48 HORAS DE CULTIVO

HORAS DE CULTIVO	% T	ABSORBANCIA
Medio Clostridium	19.4 - 19.6	0.706 - 0.708
Medio Reforzado	23.2 - 23.4	0.630
206 16H M.Clostridium	91.8 - 92	0.035
206 24H M.Clostridium	94.6 - 94.8	0.024
206 40H M.Clostridium	95.0	0.023
206 48H M.Clostridium	95.2	0.022
206 16H M. Reforzado	78.6	0.105
206 24H M. Reforzado	79.0	0.108
206 40H M. Reforzado	79.4	0.103
206 48 H M. Reforzado	78.0	0.100
434 16H M.Clostridium	86.4	0.063
434 24H M.Clostridium	89.9	0.046
434 40H M.Clostridium	90.0	0.048
434 48H M.Clostridium	90.2	0.047
434 16H M. Reforzado	75.2	0.124
434 24H M. Reforzado	77.4	0.111
434 40H M. Reforzado	76.6	0.116
434 48H M. Reforzado	76.2	0.118

De acuerdo con lo observado en la Tabla 2 y comparando con los patrones de glucosa, se establece que el consumo de glucosa en los medios y cepas evaluados fue prácticamente total a las 16 horas de cultivo. En el medio Clostridium Modificado - cepa IRP 206 el consumo fue de 6,24 µg/ml a las 16 horas de cultivo, finalizando con una concentración de 3,92 µg/ml a las 48 horas de cultivo. Para la cepa IRP 434 en el mismo medio de cultivo la concentración a las 16 horas fue de 11,24 µg/ml hasta una concentración final de 8,38 µg/ml. En el medio Reforzado Modificado la concentración inicial y final para la cepa IRP 206 fue de 18,73 µg/ml y 17,84 µg/ml respectivamente y para la cepa IRP 434 la velocidad de consumo a las 16 horas fue de 22,12 µg/ml hasta una concentración final de 21,05 µg/ml a las 48 de cultivo.

Por medio de la técnica de electroforesis SDS-PAGE se separaron las proteínas de los cultivos obtenidos de cada cepa en medio Clostridium Modificado, para encontrar la banda de peso molecular de 46 kDa, correspondiente a la proteína flagelar de interés.

En el bandeado mostrado por la electroforesis de cultivos celulares, producidos de cultivos de células sin alimentación parcial de la fuente de carbono (glucosa) y con control de pH, se observaron bandas con movilidades relativas cercanas a la del estándar de peso molecular de 46 kDa, con ligeras variaciones en peso entre muestra y muestra, que puede corresponder a la proteína de interés, cuyos valores se calcularon de acuerdo con la movilidad relativa de cada estándar de peso molecular y de las muestras de los extractos celulares que posiblemente contienen la proteína flagelar (Figura 1).



Para determinar el poder inmunógeno de las cepas y medios evaluados se formularon ciento catorce vacunas con las diferentes cepas y medios ensayados. Dentro de los grupos de vacunas formuladas, se

tuvieron en cuenta parámetros como horas de cultivo, %T vs. Células/ml, medio de cultivo y cepa. Las pruebas se validaron tomando en cuenta el porcentaje de animales sobrevivientes al desafío,

el cual debe ser de mínimo el 80% de los cobayos vacunados. Así, si muere 1/8 cobayo la prueba es satisfactoria; si mueren 2/8 o más la prueba se repite una vez.

Los resultados que se muestran son los grupos de vacunas que pasaron la prueba, en los cuales se pudo

determinar la dosis mínima protectora de antígeno, en un tiempo óptimo de 48 horas de cultivo y para los dos adyuvantes probados Al(OH)₃ e ISA 207 (Tabla 3). Las vacunas que pasaron la prueba se repitieron por duplicado, estos resultados permitieron confirmar la prueba de potencia de las vacunas ensayadas.

TABLA 3. RESULTADOS DE FORMULACIÓN DE VACUNAS

VACUNA Nº	ANTÍGENO	MEDIO DE	%T [] ANTÍGENO	ANTÍGENO (GRAMOS)	HORAS DE CULTIVO	ADYUVANTE	% DE PROTECCIÓN
29	IRP 206	Reforzado Modificado	1.0 [10X]	10	48	OLEO VECOL	100%
30	IRP 206	Reforzado Modificado	1.0 [10X]	5	48	OLEO VECOL	100%
31	IRP 206	Reforzado Modificado	1.0 [10X]	10	48	ISA 207	100%
32	IRP 206	Reforzado Modificado	1.0 [10X]	5	48	ISA 207	100%
33	IRP 206	Reforzado Modificado	1.0 [10X]	20	48	ISA 207	100%
38	LANIP	Reforzado Modificado	1.2 [5X]	5	48	ISA 207	87.5%
39	LANIP	Reforzado Modificado	1.2 [5X]	2.5	48	ISA 207	87.5%
54	IRP 434	Reforzado Modificado	8.2 Sin concentrar	25	48	ISA 207	87.5%
55	IRP 434	Reforzado Modificado	3.4 [2X]	25	48	ISA 207	100%
56	IRP 434	Reforzado Modificado	0.8 - 1.0 [4X]	25	48	ISA 207	100%
57	IRP 434	Clostridium Modificado	3.8 Sin concentrar	25	48	ISA 207	100%
58	IRP 434	Clostridium Modificado	1.4 [2X]	25	48	ISA 207	100%
59	IRP 434	Clostridium Modificado	0.8 - 1.0 [4X]	25	48	ISA 207	100%
96	IRP 434	Clostridium Modificado	3.8 - 4.0 Sin concentrar	45	48	Al(OH) ₃	100%
97	IRP 434	Clostridium Modificado	3.8 - 4.0 Sin concentrar	22.5	48	Al(OH) ₃	100%
98	IRP 434	Clostridium Modificado	3.8 - 4.0 Sin concentrar	11.25	48	Al(OH) ₃	75%
99	IRP 434	Clostridium Modificado	2.0 [2X]	45	48	Al(OH) ₃	100%
100	IRP 434	Clostridium Modificado	1.0 [4X]	45	48	Al(OH) ₃	100%
101	IRP 434	Clostridium Modificado	3.8 - 4.0 Sin concentrar	25	48	ISA 207	100%
102	IRP 434	Clostridium Modificado	3.8 - 4.0 Sin concentrar	12.5	48	ISA 207	100%
103	IRP 434	Clostridium Modificado	3.8 - 4.0 Sin concentrar	6.25	48	ISA 207	87.5%
104	IRP 434	Clostridium Modificado	3.8 - 4.0 Sin concentrar	3.125	48	ISA 207	87.5%
105	IRP 434	Clostridium Modificado	2.0 [2X]	25	48	ISA 207	100%
106	IRP 434	Clostridium Modificado	1.0 [4X]	25	48	ISA 207	100%
107	IRP 434	Clostridium Modificado	0.1 [8X]	25	48	ISA 207	100%
111	IRP 206	Clostridium Modificado	5.6 Sin concentrar	25	48	ISA 207	75%
112	IRP 206	Clostridium Modificado	2.4 - 2.6 [2X]	25	48	ISA 207	100%
113	IRP 206	Clostridium Modificado	1.0 - 1.2 [5X]	25	48	ISA 207	100%
114	IRP 206	Clostridium Modificado	0.4 - 0.6 [10X]	25	48	ISA 207	87.5%

De acuerdo con los resultados presentados a continuación, se puede observar que la protección de las cepas IRP 206 y LANIP se determinó concentrando los cultivos por los menos 2X, 5X y 10X en los medios Clostridium Modificado y Reforzado Modificado respectivamente. Para la cepa IRP 434 la protección se logró sin concentrar el cultivo, a las 48 horas de cultivo en las diferentes vacunas probadas; estableciéndose que de las cepas estudiadas la más inmunogénica es ésta en medio Clostridium Modificado.

CONCLUSIONES

De acuerdo con lo reportado por Guzmán en 1988 y Cortiñas, en 1994 quienes describieron el medio de cultivo Clostridium Modificado con L-cistina al 0,75 g/l favoreció la producción de biomasa en cepas de *C. chauvoei*, lo cual se evidenció por el aumento de la capacidad protectora e inmunogénica hacia el final de la fase exponencial de crecimiento del microorganismo y durante la fase estacionaria.

El medio Clostridium Modificado suplementado con 0,75g/l de L-cistina fue el más favorable para la producción de biomasa en condiciones de laboratorio, en las cepas IRP 434, IRP 206 y LANIP.

En el bandeado mostrado por la electroforesis, se observó una banda de peso molecular de 46 KDa en todas las cepas evaluadas, que puede corresponder a la proteína de interés, ya que las muestras de cada

cepa no fueron completamente purificadas y por esta razón no se puede afirmar que se trate de la proteína flagelar.

La técnica de Antrona permitió evidenciar que en la primera fase de crecimiento, fase logarítmica, el consumo de la fuente de carbono por parte del microorganismo es prácticamente total ya que a partir de las 16 horas se evidencia concentraciones muy bajas en el medio de cultivo.

Las vacunas formuladas, permitieron establecer que la inmunidad estimulada por las cepas probadas depende de las horas de cultivo de las mismas, en este caso se debe tener en cuenta que la hora óptima de cultivo es a las 48 horas; que el mejor medio de cultivo es el medio Clostridium Modificado y que la densidad óptica óptima para lograr una alta protección del antígeno esta entre 3,8 - 4 %T o menor en los cultivos finales.

Cultivos de 24 y 72 horas de cultivo no favorecieron la capacidad protectora de las células en antígenos que fueron formulados sin concentrar, en donde la protección solo alcanzó el 50% en las vacunas probadas y solo se logró una inmunidad cuando los cultivos fueron concentrados 2X, 4X y 8X.

En cuanto a los adyuvantes ensayados, se determinó que el que mejor potencializa la respuesta inmune en los animales es el ISA 207, seguido por el Óleo de Vecol e Hidróxido de Aluminio.

BIBLIOGRAFÍA

- Cortinas, T.I., Micalizzi, B. and De Guzmán A.M.S. «Influence of culture conditions on growth and protective antigenicity of *Clostridium chauvoei*». *Journal of Applied Bacteriology*, 77. (1994): 38-387.
- Crichton, R., Solomon J. and Barton, A.M. «The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the potency of vaccines containing *Clostridium chauvoei* antigens». *Biologicals*. 18. (1990): 49-54.
- De Guzmán, A. M. S., Pagano, C. E. y Micalizzi, B. «Identificación de *Clostridium chauvoei* por la prueba de coaglutinación». *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 30. 2. (1988): 73-77.
- Mattar, M. A., Cortinas, T. I. and DE Guzmán, A. M. S. «Immunogenic protein variations of *Clostridium chauvoei* cellular antigens associated with the culture growth phase». *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 33. (2002): 9-14.
- Qari, S. H., Agrawal, B. and Singh S.D. «Modified Anaerobic medium of *Clostridium sépticum* and *Clostridium chauvoei*». *Indian Journal Microbiology*. 30. 4 (1990): 459- 462.
- Sasaki, Y., Yamamoto, K., Kojima, A., Tetsuka, Y., Norimatsu M. and Tamura, Y. «Rapid and direct detection of *Clostridium chauvoei* by PCR of the 16S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences». *Journal of Veterinary Medicine Science*. 62. 12 (2000): 1275-1281.
- Shone, C. and Hambleton, P. 1989. Toxigenic Clostridia. In: *Biotechnology Handbooks. Clostridia*. MINTON, P. and CLARKE, J. D. (Ed) New York: Plenum Press.
- Smith, L.D.S. and Holdeman, L.N. 1968. *Clostridium chauvoei*. In *the Pathogenic Anaerobic Bacteria*.
- Songer, J. G. «Clostridial enteric diseases of the domestic animals». *Clinical Microbiology Reviews*. 9. (1996): 216-234.
- Stevenson, J. R. and Stonger, K. A. «Protective cellular antigen of *ostridium chauvoei*». *American Journal Veterinary Research*. 41. 4. (1980): 650-653.
- Smith, L.D.S. and Holdeman, L.N. 1968. *Clostridium chauvoei*. In *the Pathogenic Anaerobic Bacteria*.
- Tamura, Y., and Tanaka, S. «Effect of antiflagellar serum in the protection of mice against *Clostridium chauvoei*». *Infection and Immunity*. 43. 2. (1984): 612 - 616.
- _____. «Demonstration of protective antigen carried by flagella of *Clostridium chauvoei*». *Microbiology Immunological*; 28.12. (1984): 1325-1332.
- Valder, W. A. 2002. *Epidemiología especial veterinaria*. 2 edic. Editorial Acribia.