

73
20/1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" CUAUTITLAN "**



**ELABORACION DE UNA BACTERINA
DE *Corynebacterium ovis***

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

JUAN OCAMPO LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS: MVZ. SUSANA E. GARCIA VAZQUEZ
CO-ASESOR DE TESIS: MVZ. SILVIANO TREJO NUÑEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Pág.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
OBJETIVOS.....	42
MATERIAL Y METODO.....	43
RESULTADOS.....	64
DISCUSION.....	76
CONCLUSIONES.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	83
APENDICE.....	94

R E S U M E N

RESUMEN

La linfadenitis caseosa (LC) es una enfermedad infecciosa crónica y contagiosa, de carácter enzoótico que afecta a los ovinos y caprinos, causando pérdidas económicas considerables en la producción de estas especies, debido al decomiso a nivel rastro de las canales afectadas y a la reducción de los parámetros reproductivos. El agente causal es Corynebacterium ovis.

Debido a que el tratamiento de esta enfermedad es de dudosa eficacia y a que la diseminación de la misma dentro de un rebaño es explosiva, los principales esfuerzos encaminados a una posible erradicación de la enfermedad, están centrados en la patogenia, la realización de pruebas de diagnóstico de laboratorio in vivo, y en la producción de biológicos experimentales para la prevención de la enfermedad.

Aunque la investigación en este último aspecto ha sido muy extensa, aún no se han obtenido resultados confiables a nivel campo con un producto biológico determinado; sin embargo, se han realizado importantes descubrimientos respecto a los mecanismos inmunológicos del hospedero para combatir la infección por C. ovis.

El presente trabajo es un estudio preliminar para la elaboración de un biológico a partir de cultivos de C. ovis, con el objeto de prevenir la LC en ovinos y caprinos.

Se hace un breve análisis de la LC, con especial interés en los aspectos de inmunidad y producción de biológicos experimentales para la prevención de este padecimiento. Asimismo, se elabora una bacterina experimental a partir de dos cultivos de C. ovis, realizándose las pruebas de evaluación pertinentes al producto elaborado.

Se concluye que la bacterina experimental elaborada reúne los requisitos necesarios para hacer posible su utilización práctica, y que posee una buena antigenicidad, de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de evaluación y el análisis estadístico de aquellos datos que lo ameritaban.

Finalmente, se propone un estudio a nivel campo con ovinos y/o caprinos para reforzar los resultados de laboratorio obtenidos en este trabajo.

I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

A.- Panorama General.

Dentro de los animales domésticos, los ovinos y los caprinos tienen un sitio especial debido a la gran diversidad de aspectos productivos en los cuales se involucran, supliendo las necesidades humanas en diversas formas (Williams, ---- 1985). Sin embargo, en nuestro país ambas especies ocupan el último lugar por su importancia económica dentro de todas las especies domésticas explotadas (Arbiza, 1979).

Las causas de esta situación son diversas, por ejemplo, tenemos la falta de interés en los productores potenciales y la quiebra de los productores activos por la falta de programas adecuados y técnicos capacitados, así como un apoyo gubernamental reducido y, en general por la falta de estímulos para fomentar y potenciar el desarrollo de las especies ovina y caprina. Esto propicia a su vez la importación de productos congelados y animales de desecho para satisfacer la demanda nacional, lo cual, junto con el llamado intermediarismo existente entre productor y consumidor, también dificulta notoriamente el desarrollo productivo de estas especies en México -- (Salas, 1988).

Como consecuencia indirecta de esta situación, las enfermedades que afectan a estas especies son consideradas de esca

so impacto económico, lo cual es un error de apreciación grave, puesto que el problema es de mayor envergadura desde el momento en que estas enfermedades se convierten en otro factor limitante de la producción (Tórtora, 1988).

Dentro de las enfermedades de mayor importancia en la producción de ovinos y caprinos, y a la vez en el grupo de aquellas que más han resentido este fenómeno de indiferencia, está la Linfadenitis Caseosa (LC) (Ashfaq y Campbell, 1979).

B.- Linfadenitis Caseosa.

La LC es una enfermedad crónica contagiosa y de carácter enzoótico de los ovinos y caprinos; también se le conoce como pseudotuberculosis, "chessy glands" y enfermedad de Preisz-Noncard. Se caracteriza por producir abscesos caseopurulentos y un síndrome de debilidad y emaciación progresivas (Ayers, 1977; Ashfaq y Campbell, 1979; Gillespie y Timoney, 1983; García y Cirpián, 1986; Blood y col., 1987; Brown y Olander, 1987; Leamaster y Shen, 1987).

El agente etiológico de la LC es Corynebacterium pseudotuberculosis (C. ovis). Este microorganismo es Gram (+) y su morfología es de bastón corto. En ocasiones puede ser filamentosos, por lo que se le considera pleomórfico (especialmente después de varios pases). En los frotis de exudado adopta una típica disposición de empalizada o letras chinas, lo cual

facilita su identificación. C. ovis es anaerobio facultativo y no es ácido resistente (Jawetz y Melnick, 1983; Carter, 1985; Davis y Dulbecco, 1985).

El microorganismo crece bien en agar sangre, aunque para un crecimiento óptimo es recomendable añadir suero sanguíneo al medio de cultivo (Brown y Olander, 1987). También es factible la utilización de medio líquido de BHI para su manutención (Gillespie y Timoney, 1983). En el agar sangre se incubaba a 37 grados centígrados por 24-48 hrs. y se obtienen pequeñas colonias redondeadas de color blanquecino, las cuales son beta-hemolíticas y pueden desplazarse con facilidad por la superficie de la placa de agar con ayuda del asa de inoculación (Carter, 1985). En la tabla 1 se describen las propiedades bioquímicas del microorganismo.

C. ovis produce una exotoxina soluble de tipo fosfatidil-colina/fosfatidol hidrolasa, comúnmente llamada fosfolipasa tipo "D", con actividad hemolítica a pH menor que 6 (Jolly, 1965; Brown y Olander, 1987; Kimberling, 1988). Esta substancia cataliza la esfingomielina membranaria de los eritrocitos en ceramida y colina; además, también afecta a las células endoteliales, aumentando así la permeabilidad capilar (Jolly, 1965; Jubb y Kennedy, 1982; Hedden y Thomas, 1986). Experimentalmente es letal por vía IV para ovinos, caprinos y animales de laboratorio (Lovell y Zaki, 1966). Esta exotoxina eserológicamente similar en todas las cepas estudiadas, aunque

se ha observado cierta variabilidad en la patogenicidad de dichas cepas, lo cual sugiere una capacidad variable para producir la exotoxina de una cepa a otra (Cameron y Smit, 1970; -- Shigidi, 1978; Renshaw et. al., 1979). El metabolito mencionado se inactiva con calor, ácidos, almacenamientos prolongados y con formalina (Brown y Olander, 1987); asimismo, la antitoxina inhibe todas las actividades biológicas de la toxina, lo cual en teoría podría ser de alto valor profiláctico - (Ayers, 1977; Ellis, 1983).

La bacteria también posee un factor piogénico termoestable de actividad quimiotáctica para leucocitos y un lípido de superficie derivado del ácido corinemicólico, tóxico para leucocitos y gracias al cual C. ovis resiste la actividad lisosómica de estas células (Cameron y Smit, 1970; Jubb y Kennedy, 1982; Ellis, 1983). De esta manera el microorganismo es un parásito intracelular facultativo (Brown y Olander, 1987). - La presencia de estos tres factores de patogenicidad (exotoxina, factor piogénico y lípido superficial), dificulta notoriamente el tratamiento contra la enfermedad (Hsu, 1984; Hedden y Thomas, 1986).

T A B L A 1

PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

CARACTERISTICAS	LECTURA
Hemólisis	+
Producción de catalasa	+
Leche tornasol	-
Gránulos metacromáticos	+
Oxidación/Fermentación	F
Reducción de nitrato	+/-
Licuefacción de gelatina	-
Producción de ureasa	+
Rojo de metilo	-
Voges-Proskauer	-
Arginina	+
Acido a partir de glucosa	+
Acido a partir de lactosa	+
Acido a partir de sucrosa	+/-
Acido a partir de manitol	-
Acido a partir de almidón	+
Acido a partir de xilosa	-
Acido a partir de salicín	-
Acido a partir de trehalosa	-
Acido a partir de maltosa	+

Adaptado de Cowan T., S y Steel V., K., 1979.

C. ovis es muy resistente al medio ambiente, sobrevive - por meses a la desecación y se le puede encontrar viable por largos períodos en carne congelada, heces, exudado, suelo y - fomites, e inclusive se reporta su supervivencia en solucio-- nes antisépticas al menos por 24 hrs. Sin embargo, es sensi- ble a la luz solar directa (radiación ultravioleta) (Beer, -- 1981; Ellis, 1983; Arbiza, 1986; García y Ciprián, 1986). Es probable que la clave de esta resistencia sea la barrera físi- ca protectora que representa el exudado caseoso de las lesio- nes, que envuelve a las bacterias a manera de micelas y las - protege (Stoops et. al., 1984; Augustine y Renshaw, 1986; Fra- ser, 1988).

Además de producir LC en ovinos y caprinos, C. ovis tam- bién les puede causar a estas especies un cuadro de artritis- supurativa (especialmente en crías) y/o mastitis, sin que am- bos procesos patológicos se encuentren necesariamente involu- crados con LC (Ashfaq y Campbell, 1979; Bood y col., 1987; -- Brown y Olander, 1987; Kimberling, 1988).

Si bien se considera que la LC tiene distribución mun-- dial, es más frecuente y de carácter endémico en aquellas re- giones donde hay grandes concentraciones de rebaños de ovejas y cabras (Frappe, 1981; Gillespie y Timoney, 1983; Leamaster- y Shen, 1987). Al parecer C. ovis prospera en climas áridos- y semiáridos, y la enfermedad se presenta durante todo el año (Hamir, 1981; Fraser, 1988; Kimberling, 1988). Si bien la --

mortalidad es mínima, la morbilidad es de hasta un 70% (Ashfaq y Campbell, 1979; Williamson y Nairn, 1980; Muckle y Gyles, 1983).

Las pérdidas económicas causadas por la LC son cuantiosas, principalmente por el deceso (parcial o total) de las canales afectadas a nivel rastro (Stoops et. al. 1984; Arbiza, 1986; García y Cirpián, 1986). Otros factores de pérdida son la reducción de los parámetros reproductivos del rebaño, especialmente cuando la enfermedad se asocia con problemas de malnutrición y parasitosis, tan comunes en nuestro país (Williams, 1980; Stoops et. al., 1984; Arbiza, 1986). Además, es factible encontrar una baja eficiencia alimenticia y por lo tanto una ganancia de peso reducida, lo cual disminuye notoriamente el valor económico de los animales afectados (Hamir, 1981; Ellis, 1983; Blood y col., 1987; Brown y Olander, 1987).

Algunos aspectos que realzan la importancia económica de la LC son su largo período de incubación (2 a 3 años) y el hecho de que basta un animal enfermo para infectar a todo un rebaño, lo cual dificulta considerablemente una posible erradicación de la enfermedad (Brown y Olander, 1985; Brown y Olander, 1987). Actualmente la investigación de la enfermedad -- con el fin de lograr este objetivo, está centrada en la patogenia y en la producción de biológicos preventivos (Ayers, 1977; Muckle y Gyles, 1983).

Es interesante señalar que, debido a su asociación con cuadros de malnutrición y emaciación (en muchos casos con parasitosis implícita), se considera a la LC un factor muy importante en el llamado "síndrome de la oveja flaca", lo cual realza aún más su importancia económica (Renshaw et. al., 1979; Stoops et. al., 1984; Brown y Olander, 1987). Los bajos recursos y nivel socioeconómico de la mayoría de los productores en nuestro país, favorecen la condición anterior (Sallas, 1988).

La introducción de una oveja o cabra infectada en un rebaño libre es el principal factor para el inicio de la enfermedad en dicho rebaño (Beer, 1981; Arbiza, 1986; Fraser, 1988). La LC se transmite por medio de heridas o abrasiones cutáneas que se producen durante la esquila, descole o castración, principalmente en ovinos, o bien por medio de traumatismos que ocurran en instalaciones muy rústicas, por peleas y topes, especialmente en cabras (Ashfaq y Campbell, 1979; García y Ciprián, 1986; Blood y col., 1987). Asimismo, para esta última especie se propone una vía oral, en la que las heridas de la mucosa bucal causadas por la prensión o masticación de alimentos fibrosos serían punto de entrada para la bacteria (Ayers, 1979; Ellis, 1983; Kimberling, 1988). Sin embargo, es muy probable que en ambas especies, la infección sea adquirida cuando el animal es joven, apareciendo los signos clínicos más tarde (Gillespie y Timoney, 1983; Brogden et. al., 1984; Hedden y Thomas, 1986).

La persistencia de la bacteria causal en el medio ambiente, por medio de la contaminación con exudado de comederos, - bebederos, corrales, suelo, etc., así como piel intacta, favorece todas estas vías de transmisión (García y Ciprián, 1986; Blood y col., 1987). Se acepta que la principal fuente de -- bacteria virulenta es el exudado de los nodos linfáticos superficiales que han sido abscedados por la bacteria y que han fistulizado, diseminándose así el microorganismo (Ayers, ---- 1977; Williams, 1980; Lund y Almlid, 1982; García y Ciprián, - 1986).

Una vez que penetra las barreras primarias del hospedero, C. ovis induce la formación de un absceso en el sitio de entrada (piel y tejido subcutáneo) gracias a los tres factores de patogenicidad mencionados anteriormente (Ellis, 1983; Gillespie y Timoney, 1987; Brown y Olander, 1987). El mecanismo por el cual actúan es el siguiente: en el sitio de la - infección, los leucocitos, especialmente neutrófilos, se acumulan alrededor y entre las bacterias, y los fibrocitos y capilares se forman y constituyen respectivamente en la periferia de la infección; de este modo, los factores bacterianos - llevan a cabo sus efectos y en forma lenta pero continua destruyen a los leucocitos y el tejido involucrado, constituyéndose así la lesión característica de la LC, un absceso caseoso encapsulado (Jubb y Kennedy, 1982; Ellis, 1983, Gillespie y Timoney, 1983; Hsu y Renshaw, 1985). La bacteria, no dete-

nida por la cápsula del absceso, invade los capilares y forma colonias que secretan más metabolitos, los cuales facilitan la dispersión bacteriana y la oclusión capilar (Jubb y Kennedy, 1982; Muckle y Gyles, 1983). La isquemia resultante y -- las substancias bacterianas matan a las células de la pared interna de tejido conectivo de la cápsula y entonces, se adiciona una nueva capa de material necrótico y de esta manera, nuevo tejido conectivo prolifera para reforzar la pared (Jubb y Kennedy, 1982; Kimerling, 1988). Por medio de este proceso repetitivo, se adiciona sucesivas capas a la masa necrótica, formándose el típico aspecto laminar de los abscesos. Debe señalarse que mientras que el lípido superficial citotóxico es el principal factor piogénico, la exotoxina es más bien un factor de diseminación bacteriana, al aumentar la permeabilidad vascular (Cameron y Smit, 1970; Hard, 1975). Es interesante el hecho de que la antitoxina proteja contra la diseminación bacteriana, pero no evite la formación de un absceso localizado; asimismo, es de notarse también que los linfocitos involucrados en el proceso (y que por supuesto no son células con actividad fagocítica), no sufran los efectos citotóxicos del lípido de superficie (Hard, 1970, Muckle y Gyles, 1983; Tashjian y Campbell, 1983).

La actividad antifagocítica ya descrita, permite que la bacteria sea transportada viable hasta los nodos linfáticos regionales desde el sitio inicial de inoculación; ya en los

nodos el proceso se repite, abscedándose éstos y diseminándose se la bacteria por vía linfática y sanguínea a todo el organismo (Jubb y Kennedy, 1982; Ellis, 1983; Brogden et. al., -- 1984; García y Ciprián, 1986; Hedden y Thomas, 1986). Ocasionalmente los animales se recuperan de la infección a nivel cutáneo y no presentan abscesos, pero una vez localizada la infección en nodos linfáticos, su curso es inevitablemente crónico y de carácter insidioso (Renshaw et. al., 1979; Arbiza, - 1986; Blood y col., 1987; Fraser, 1988).

Si bien este mecanismo de diseminación tiene poco o ningún efecto sobre la condición general del hospedero, conforme éste crece y/o se desarrolla, la enfermedad sigue su curso y la bacteria viva escapa de las lesiones iniciales, se disemina a través de los ductos linfáticos eferentes, penetra a --- otros nodos cercanos a la cadena involucrada y posteriormente hasta los nodos de cavidades celómicas (vg. nodos linfáticos-mediastínicos, mesentéricos, etc.), los cuales son también -- abscedados y permiten la invasión de órganos adyacentes (vía linfática); eventualmente la bacteria llega a sangre venosa y a pulmones. Los microorganismos que pasan a través de estos órganos pueden causar lesiones en cualquier otra víscera que invadan (vía sanguínea) (Jubb y Kennedy, 1982; Stoops et. al., 1984; García y Ciprián, 1986; Kimberling, 1988). Por estos - dos mecanismos es posible encontrar abscesos en pulmones, hígado, bazo, riñones, etc. Se menciona que los animales de ma

yor edad presentan con más frecuencia estas lesiones internas debido a la patogenia señalada, aún así, hay casos en los que se presentan lesiones viscerales sin antecedentes clínicos de infección periférica (Renshaw et. al., 1979; Arbiza, 1986; -- Blood y col., 1987; Fraser, 1988).

La signología de LC es prácticamente inaparente, puesto que gran parte de los animales afectados se observan normales, detectándose casi siempre la enfermedad a nivel rastro; esto es más notorio en ovejas que en cabras (Ashfaq y Campbell, -- 1979; Bear, 1981; Gillespie y Timoney, 1983; García y Ciprián, 1986; Kimberling, 1988). Sólo en casos crónicos se hace manifiesta una debilidad y emaciación notorias, con baja sensible en la producción (Renshaw, 1979; Ellis, 1983; Stoops et. al., 1984; Blood y col., 1987).

La lesión clásica de la LC la constituyen los abscesos - encapsulados descritos, los cuales pueden localizarse superficialmente involucrando piel y tejido subcutáneo (en el sitio inicial de infección), así como nodos linfáticos periféricos (Ashfaq y Campbell, 1979; Beer, 1981; Jubb y Kennedy, 1982; - Ellis, 1983; Gillespie y Timoney, 1983; García y Ciprián, --- 1986; Blood y col., 1987). En este último caso, ocurre primero una inflamación del nodo afectado, con aumento de volumen y tumefacción del mismo, para posteriormente, abscedarse ---- (Jubb y Kennedy, 1982; Ellis, 1983; Stoops et. al., 1984; --- Brown y Olander, 1987). Conforme el absceso crece, se desa--

rolla una zona alopécica en la piel que lo cubre debido a una atrofia por compresión (Jubb y Kennedy, 1982). El tamaño de estos abscesos varía de uno a varios centímetros., y al madurar fistulizan y muestran un exudado caseopurulento de color-verde amarillento (aunque los abscesos viejos presentan un exudado amarillento y con aspecto de masilla) (Beer, 1981; Unanian et. al., 1985; García y Ciprián, 1986; Blood y col., 1987). Los nodos superficiales más afectados son los parotídeos, mandibulares, retrofaríngeos y preescapulares, así como los nodos supramamarios, prefemorales y poplíteos (Ashfaq y Campbell, 1979; Renshaw et. al., 1979; Adekeye y Shannon, 1980; Ajai y Cook, 1980; Jubb y Kennedy, 1982; García y Ciprián, 1986). A la necropsia (o a la inspección sanitaria), se detectan las mismas lesiones en nodos linfáticos viscerales, así como en diversos órganos, junto con la emaciación de la canal si el caso era muy crónico (Williamson y Nairn, 1980; Williams, 1980; Brown y Olander, 1987). Los nodos viscerales más afectados son los mediastínicos, bronquiales mesentéricos y sublumbares; los órganos más afectados son los pulmones, riñones, hígado y bazo, así como glándula mamaria, epidídimo y cerebro (Bandopadhyay et. al., 1972; Ayers, 1977; Hamir, 1981; Nakamura et. al., 1981; Jubb y Kennedy, 1982; Lund et. al., 1982; Fraser, 1988).

Además del diagnóstico clínico, realizado en base a la observación de los signos y lesiones descritos, existen diver

sas pruebas de laboratorio para detectar a la LC, pero todas han presentado deficiencias en cuanto a su capacidad para detectar a la enfermedad subclínica con un nivel de seguridad - confiable, especialmente por el alto índice de falsos positivos detectados, debido a la propiedad de C. ovis de aglutinarse en forma natural, o bien, por su costo elevado y dificultad para aplicarse a nivel campo (Ellis, 1983; Brown y Olander, 1985; Fraser, 1988; Kimberling, 1988).

Sin embargo, la detección de lesiones superficiales y el aislamiento de C. ovis a partir de éstas, es determinante para el diagnóstico positivo de LC (Williamson y Nairn, 1980). - En caso de que se optase por tomar una muestra de exudado para el aislamiento bacteriológico, a partir de un absceso previamente fistulizado, se debe prevenir cuidadosamente la contaminación de la muestra (Kimberling, 1988).

Es importante diferenciar la LC subclínica de enfermedades como Paratuberculosis, parasitosis crónicas, desnutrición de origen exógeno, etc., (Williams, 1980; Beer, 1981). La LC clínica debe a su vez ser diferenciada de Actinomicosis, Actinobacilosis, Epididimitis ovina, neoplasias cutáneas y abscesos por otros piógenos (Frappe, 1981; Jubb y Kennedy, 1982; - Ellis, 1983).

El tratamiento de la LC sólo es recomendable cuando la - infección no ha pasado de piel, mediante la extirpación qui--

rúrgica del absceso y la limpieza antiséptica de la región, mediante curaciones diarias con sulfato de cobre o yodo (Renshaw et. al., 1979; Blood y col, 1987). Después de esta etapa de la enfermedad, cualquier tratamiento quirúrgico o farmacológico es de poco valor y por lo tanto debe estimarse la valoración económica de los animales afectados (Ellis, 1983; -- García y Ciprián, 1986). El drenaje de los abscesos no es recomendable si el animal tratado va a permanecer en el corral, ya que contaminará directamente al resto del rebaño, o bien en forma indirecta a través de los mecanismos ya señalados -- (Williams, 1980; Gillespie y Timoney, 1983; Fraser, 1988).

La capacidad de C. ovis de ser parásito intracelular facultativo de los fagocitos y la naturaleza encapsulada de los abscesos dificulta en sobremanera que algún antibiótico alcance niveles adecuados para contactar y eliminar a la bacteria (Renshaw et. al., 1979; Adekeye y Shannon, 1980; Arbiza, ---- 1986; Brown y Olander, 1987); la bacteria es sensible in vitro a la mayoría de los antibióticos de uso veterinario (Ashfaq y Campbell, 1979).

Debido a la dificultad que representa y a la dudosa eficacia del tratamiento, es imperativo prestar mayor atención a las medidas de control y prevención contra la LC (Beer, 1981; Blood y col., 1987; Fraser, 1988). Una vez que la enfermedad se ha establecido en un rebaño, el control de la misma se lleva a cabo mediante la aplicación de normas de higiene riguro-

sas y continuas en los corrales y demás instalaciones donde permanezcan los animales, tratando en lo posible de aminorar la rusticidad de dichas instalaciones (objetos punzocortantes, alambres, astillas, etc.). Por supuesto, es imprescindible el aislamiento y/o eliminación de los animales con lesiones típicas de LC a nivel de nodos linfáticos; asimismo, debe evitarse que el exudado de los abscesos fistulizados se disemine en el medio ambiente y entre en contacto con el resto -- del rebaño (Arbiza, 1986; García y Ciprián, 1986; Kimberling, 1988). Cualquier herida que presenten los animales, sea accidental o quirúrgica, debe ser tratada de inmediato con un --- buen antiséptico (Lund y Almlid, 1982; Blood y col., 1987). - Los animales que reciban el tratamiento quirúrgico señalado, - deben también ser aislados del resto del rebaño y devueltos - al mismo hasta su total recuperación (Arbiza, 1986).

Otras medidas que deben aplicarse incluyen el establecimiento de una asepsia estricta durante las operaciones de --- trasquila (evitando a la vez y en la medida de lo posible causar heridas y abrasiones cutáneas) y diversas técnicas quirúrgicas que se apliquen al rebaño; también es recomendable trasquilar a los animales de acuerdo a su edad; primero a los jóvenes y después a los adultos; y en base a la presencia de la enfermedad; primero los sanos y al final los enfermos (Beer, - 1981; Blood y col., 1987; Fraser, 1988; Kimberling, 1988). - Es importante mencionar que este plan de control, también tie

ne aplicación preventiva en explotaciones libres de LC (Fraser, 1988; Kimberling, 1988). Para reforzar las medidas propuestas, en este último caso, debe evitarse la adquisición de animales enfermos (Prappe, 1981; Augustine y Renshaw, 1986; - García y Ciprián, 1986).

Una medida preventiva poco tomada en cuenta consiste en asegurar la ingestión de calostro por las crías, ya que éste posee anticuerpos contra la exotoxina, lo cual puede ser de alto valor profiláctico (Hsu y Renshaw, 1985).

En relación al control y la prevención de la LC, es necesario mencionar que si bien la mayoría de los productores de ovinos y caprinos conocen el significado de la LC en su industria, muestran cierta apatía que ha derivado en una serie de medidas inadecuadas no sólo en cuanto a profilaxis, sino también en lo relacionado a tratamiento y diagnóstico. Actualmente, al menos en los países industrializados, debe incluirse dentro de las medidas para limitar la presencia de LC, la eliminación estricta y obligada de todos aquellos animales -- con agrandamientos palpables de los nodos linfáticos periféricos. Afortunadamente, poco a poco se va aceptando la importancia de la LC en relación con el "síndrome de oveja flaca" -- y su severo impacto económico, lo cual posiblemente redunde en una actitud más seria e interesada hacia la enfermedad que -- nos ocupa (Stoops et. al., 1984).

C.- Aspectos Inmunológicos de Interés en la Producción Experimental de Biológicos para la Prevención de la Linfadenitis Caseosa.

Un aspecto que requiere de mayor investigación debido al gran interés que reviste para la prevención de la LC, es la utilización de productos biológicos (Ellis, 1983; Brogden et. al., 1984; Brown y Olander, 1987).

Todos los intentos que se han hecho para producir un biológico exitoso contra la LC han dado resultados pobres (Gillespie y Timoney, 1983; Kimberling, 1988). En gran parte se ha logrado obtener protección contra los efectos letales de la exotoxina, pero no se ha logrado evitar la aparición de abscesos ni la propagación sistémica de la bacteria (Hsu y Renshaw, 1985). Han sido diversos los factores que han obstaculizado esto, tales como la escasa información existente acerca de la respuesta inmune de los ovinos y caprinos, la patogenicidad tan especial de la LC, la dificultad para reproducir la enfermedad natural en el laboratorio, y el impedimento económico para utilizar en todos los experimentos ovinos y caprinos (lo cual sería una situación ideal) (Cameron et. al., 1972; Husband y Watson, 1977; Cameron y Bester, 1984; Hsu y Renshaw, 1985).

Asimismo, se ha originado una discusión acerca de la importancia relativa de la inmunidad humoral o celular en la -- eliminación del organismo y la prevención de la enfermedad, -- sin que hasta el momento se defina aún si un tipo de inmuni-- dad es más importante que el otro (Gillespie y Timoney, 1983). La naturaleza de parásito intracelular facultativo de C. ovis sugiere el uso de vacunas para estimular la inmunidad celular y proteger más adecuadamente contra la LC, pero los resulta-- dos obtenidos han sido muy ambiguos (Husband y Watson, 1977;-- Hedden y Thomas, 1986).

Se ha visto que la aplicación de un toxoide o una bacte-- rina estimula principalmente la inmunidad humoral (Tizard, -- 1984). En el primer caso, la antitoxina obtenida retarda en-- forma experimental el crecimiento y/o el transporte de C. --- ovis en los nodos linfáticos del ovino, es decir, inhibe su -- multiplicación secundaria, más no evita la formación del abs-- ceso en el sitio primario de infección (Jolly, 1965; Ayers, -- 1977; Hedden y Thomas, 1986). Asimismo, se ha reportado que-- la protección que brinda la antitoxina sólo es posible si el-- donador fue inmunizado por periodos muy prolongados (Arbiza,-- 1986; Hedden y Thomas, 1986).

Al utilizarse bacterina o suero hiperinmune con éxito en ratones, se demostró que al menos en esta especie la inmuni-- dad está mediada por anticuerpos (Ayers, 1977; Cameron et. -- al., 1972; Cameron y Fuls, 1973).

Por otra parte, se ha reportado que aquellos biológicos cuya fórmula incluye la exotoxina inactivada (v. g. un ana-cultivo, o el propio toxoide), tienen mejor actividad que --- aquellos sin el metabolito (v. g. una bacterina a base de cé-lulas lavadas) (Cameron et. al., 1972). Sin embargo, en ---- otros casos hubo lotes de bacterina con exotoxina inactivada- que mostraron cierta toxicidad al producir pérdida de con-dición e incluso la muerte en ovinos inoculados, tres días -- post-vacunación. Esto también ocurrió en forma invariable al suministrar toxoide fresco (con 24 h de preparado); estos lo-tes perdieron su toxicidad con el tiempo y la respuesta inmu-ne inducida sólo se mantuvo por un máximo de cuatro meses --- postvacunación (Cameron et. al., 1972; Burrell, 1980; [b]).

En base a estas investigaciones, los laboratorios Common-wealt S.L. de Australia, elaboraron un toxoide para distri--- buirlo en forma comercial, pero al ser puesto a prueba con -- otros biológicos experimentales, se ha cuestionado severamen-te su eficacia (Cameron y Bestler, 1984). Hasta el momento no se conoce otro producto comercial de este tipo en el mundo -- (Brown y Olander, 1985).

Respecto a el uso de las bacterinas, tenemos en primera- instancia que en diversos estudios, los biológicos a base de- paredes celulares fueron más eficaces para disminuir la inci-dencia de abscesos internos en corderos infectados experimen-talmente por vía IV (Brogden et. al., 1984). Asimismo, se ha

observado que estas bacterinas inducen una inmunidad protectora parcial en ratones (Brogden et. al., 1984; Brown y Olander, 1987). Otros estudios también reportan que bacterinas con gel de fosfato de aluminio como adyuvante y 0.5% de células, aplicadas a razón de 5.0 ml. (en dos aplicaciones) por vía SC, protegen a ovinos de infecciones subagudas inducidas experimentalmente, al igual que a ratones (Cameron et. al., 1972; Cameron y Fuls, 1974). Sin embargo, la protección contra la infección crónica es parcial (Hedden y Thomas, 1986).

En este sentido, uno de los inconvenientes de las bacterinas es que producen abscesos estériles en el sitio de inoculación, aún en aquellos casos en que el lípido superficial ha sido removido de bacterias inactivadas con formalina (Cameron y Buchan, 1966). Es muy probable que el factor piogénico termolabile sea entonces el responsable de estas lesiones (Cameron y Smit, 1970).

Finalmente, se debe comentar que algunos autores no le conceden crédito al uso de bacterinas salvo en casos específicos, aunque otros autores consideran que son el medio más adecuado para perfeccionar un biológico idóneo contra C. ovis (Sears, 1985; Fraser, 1988; Tórtora, 1988).

Respecto a los biológicos tipo vacuna, también se han realizado diversos ensayos, no sólo con C. ovis, sino con otros microorganismos que activen la inmunidad celular, como

por ejemplo el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), que se usa en forma común para la inmunización contra Mycobacterium tuberculosis, y que en el caso de ovinos ha dado resultados favorables para la inmunización contra C. ovis, en especial en animales que fueron vacunados aproximadamente al mes de edad (Cameron y Bester, 1984; Blood y col., 1987). Una desventaja es que los animales vacunados de esta manera reaccionan positivamente a las pruebas de tuberculina y johnina por lapsos muy prolongados (Blood y col., 1987). Esta inmunización también ha dado buenos resultados en cuyes, más no así en ratones (Cameron y Bester, 1984).

En apoyo a las vacunas, se debe recordar que tal vez la inmunización efectiva contra la LC debe requerir la estimulación forzosa del sistema fagocitario mononuclear del hospedero, especialmente cuando sabemos que C. ovis es un parásito intracelular facultativo, contra los cuales en general las bacterias son menos eficaces que las vacunas (Brogden et. al., 1984 [b]).

Sin embargo, al igual que las bacterinas y toxoides, la mayoría de los estudios realizados con vacunas han dado resultados contradictorios; por ejemplo, se ha reportado que las vacunas son mejores que las bacterinas en cuyes, pero en bovinos sucede lo contrario, además de que producen reacciones locales severas, mayores aún que las inducidas por bacterinas (Cameron y Fuls, 1973; Cameron y Bester, 1984).

En base a lo expuesto, se deben considerar una serie de factores extrínsecos e intrínsecos que influyen en los resultados obtenidos durante la utilización de estos tres tipos de biológicos, como son:

- a) Especies utilizadas en los experimentos.- El modelo ovino no es caro y difícil de evaluar (aunque aún así, no deja de ser modelo ideal), por lo que muchas veces se tiene que recurrir al uso de animales de laboratorio y trasladar los resultados obtenidos a borregos; más aún, también se prefiere aplicar en algunos casos a caprinos, -- los resultados obtenidos en ovinos (Cameron y Fuls, 1973; Ayers, 1977; Cameron y Bester, 1984).

- b) Métodos de desaffo.- Aún no se ha logrado reproducir la infección natural con éxito, siendo lo común producir cuadros agudos (toxémicos) y subagudos (formación masiva de abscesos viscerales en pocas semanas), más nunca el cuadro crónico y clásico de abscedaciones superficiales (Brogden et. al., 1984 [a]). De hecho, se ha probado un método para evaluar la eficacia de los productos biológicos en base a la proporción inversa de abscesos pulmonares que se produzcan mediante el desaffo (Cameron et. al., 1972). Es muy probable que en experimentos de este tipo se manejen dosis bacterianas de desaffo muy superiores a las que se dan en condiciones naturales y por lo tanto abrumen la resistencia e inmunidad de hospedero, -

con lo cual los resultados obtenidos son relativos (Cameron y Fuls, 1973). De este modo, debe implantarse un método de desafío que se aproxime lo más posible al natural y permita una valoración más objetiva de la respuesta inmune (sea de tipo humoral o celular) y de la eficacia de los biológicos utilizados (sean toxoides, bacterinas o vacunas) (Ayers, 1977; Cameron y Bester, 1984; --- Brown y Olander, 1987).

Un método de desafío que presenta ciertas ventajas para valorar aspectos inmunológicos relacionados con la evaluación de biológicos, consiste en la inoculación directa in vivo del nodo linfático poplíteo (Husband y Watson, 1977). Entre sus beneficios de utilización están la especificidad de especie y el acceso al tejido linfoide en forma directa (Burrell, 1978).

c) Utilización de productos que estimulan la respuesta inmune.- Existen dos métodos para mejorar la respuesta inmunológica contra C. ovis:

- 1) Preparación de un antígeno más energético: El método más usual es la fragmentación de la bacteria, lo cual generalmente es de costo elevado (Tizard, --- 1984).
- 2) Estimulación artificial del sistema inmune: Es mucho más económico y se logra con la adición de subs

tancias denominadas adyuvantes, al biológico utilizado. Estos adyuvantes aumentan la respuesta inmune normal mediante la modificación física del Ag -- con el que se mezclan, de modo tal que éste sea presentado más eficazmente a las células sensibles a los antígenos (linfocitos). Generalmente los adyuvantes son sustancias insolubles que forman un depósito donde el antígeno se libera lentamente: de esta forma se aumenta la vida biológica del antígeno y permanece más tiempo en el organismo estimulando al sistema inmune. Ejemplos de estas sustancias son el hidróxido de aluminio, el alumbre de potasio y el fosfato de aluminio. También se han utilizado como adyuvantes emulsiones de agua y aceite: en este caso la presencia del aceite actúa como ---irritante y estimula al sistema inmune, mientras -- que el antígeno se halla en la fase acuosa y se va liberando lentamente. Algunos otros adyuvantes actúan más enérgicamente al incluir en su formulación micobacterias muertas, las cuales actúan como un antígeno potente y aumentan así la respuesta inmune del hospedero. Una desventaja de estos productos -- es que pueden inducir la formación de lesiones granulomatosas en el sitio de aplicación, por una excesiva respuesta inmunológica del hospedero (Tizard, 1984). En general hoy en día son más aceptados los

productos a base de sales de aluminio, puesto que su efecto es bueno y son menos irritantes (Cameron et. al., 1972; Cameron y Fuls, 1973).

Otros productos como el levamisol y el mercaptoetanol, tienen efecto estimulante sobre la inmunidad celular, y sustancias como la hialuronidaza y el dimetil-sulfóxido (DMSO), que estimulan la respuesta de absorción antigénica y favorecen la dispersión del antígeno, son susceptibles de ser utilizados, aunque al parecer su eficacia es dudosa en el caso de la LC (Cameron, 1975; Cameron y Bester, 1984).

En este sentido también existe controversia, puesto que unos autores manifiestan que ningún adyuvante o sustancia inmunoestimulante es útil para mejorar la eficiencia de los biológicos usados contra C. ovis, si bien otros afirman que la saponina y el hidróxido de aluminio dan buenos resultados (Cameron y Fuls, 1973; Cameron y Bester, 1984; Hsu, 1984).

- d) Otros factores.- Algunos autores reportan que el método de inactivación utilizado influye en la inmunogenicidad de la bacterina preparada (Cameron y Fuls, 1973). Por otra parte, se ha visto que si bien la dosis del biológico y la concentración del mismo no tienen efecto en el

cuye, los intervalos entre vacunación sí influyeron en la respuesta inmunológica de esta especie, siendo más benéficos los intervalos más cortos. Caso opuesto es el de los ovinos, en los que la concentración de la bacterina sí fue significativa para la respuesta inmune, más no así la dosis, que se aumentó hasta cuatro veces sin mejora alguna en dicha respuesta (Cameron et. al., 1972).

En el ratón, dosis mínimas de antígeno brindaron protección y la respuesta se vió favorecida con dosis mayores (Cameron y Fuls, 1973). Otros estudios indican que la eliminación del lípido superficial y el tipo de medio de cultivo utilizando no influyen en la respuesta inmune -- del hospedero (Cameron y Bester, 1984). También se maneja que, a diferencia de los ovinos, donde la vía subcutánea da mejores resultados, en los ratones la vía de inoculación no es significativa (Cameron y Fuls, 1973).

Finalmente, se señala que las técnicas de detección de células inmunitarias son deficientes en el caso de los animales domésticos, a diferencia de lo que ocurre en medicina humana, donde se utilizan antisueros muy purificados para tal fin (Ellis, 1983; Hedden y Thomas, 1986). - Esto dificulta el estudio de los procesos inmunológicos- que ocupan. Se propone como una solución viable a este- problema, la utilización de lectinas marcadas para la detección de linfocitos T y de colorantes fluorescentes para linfocitos B (Hedden y Thomas, 1986).

En base a los estudios aquí señalados, se ha realizado una serie de interesantes hipótesis acerca de los procesos inmunológicos que se presentan en el hospedero al ser infectado por C. ovis. Algunas de estas teorías se consideran a continuación:

Parece ser que en forma natural los ovinos son capaces de resolver los efectos tóxicos siguientes al establecimiento y multiplicación de C. ovis, pero no así de prevenir la diseminación secundaria a nivel de nodos linfáticos y de ahí hacia pulmones, con el subsiguiente desarrollo de abscesos (Cameron et. al., 1972; Cameron y Fuls, 1973). De este modo los animales inmunizados destruyen la mayoría de las bacterias inoculadas, o bien, restringen su multiplicación, pero algunas bacterias sobreviven a nivel pulmonar y desarrollan la infección (Cameron y Fuls, 1973).

La inmunidad contra la toxina es de tipo humoral tanto en ovinos como en cabras y en animales de laboratorio, sin embargo, es probable que esta inmunidad antitóxica sea de poco valor en el establecimiento de la inmunidad crónica natural (Garg y Chandiraman, 1984).

Asimismo, se reportan evidencias de que la inmunidad contra C. ovis es predominantemente de tipo celular (Hard, ---- 1975). Una de las más importantes es la transferencia de inmunidad contra la bacteria mediante la inoculación intraperi-

toneal de macrófagos y linfocitos sensibilizados en ratones - (Hard, 1970; Hard, 1975). La presencia de linfocitos asociados refuerza este concepto (Hard, 1975; Ayers, 1977; Hedden y Thomas, 1986). Los macrófagos inmunes mostraron gran número de lisosomas en su citoplasma, capaces de atravesar la capa lípida del microorganismo (Hard, 1970; Hard, 1975). El análisis bioquímico de estas células mostró un aumento significativo en la concentración de enzimas hidrolíticas (Hard, 1975).

Otros argumentos a favor de la inmunidad celular son el hecho de que C. ovis también induce respuestas hipersensibles de tipo IV, mediadas por células, lo cual ha sido utilizado con fines diagnósticos (Cameron et. al., 1972).

Sin embargo, también se ha observado que C. ovis viva -- aumenta el número de linfoblastos y células plasmáticas recolectadas de vasos linfáticos eferentes (Garg y Nain, 1984). Es muy probable que dichas células sean linfocitos inmunológicamente programados, debido a lo cual no se deben descartar los procesos mediados por anticuerpos (Ayers, 1977; Garg y Nain, 1984).

Otro aspecto de interés es que la transferencia calos---tral de anticuerpos protectores ha sido demostrada a nivel de campo y laboratorio (Burrell, 1980 [a]). Al vacunar toxoide con adyuvante a cabras preñadas, se protegió a los cabritos contra el desafío hasta las primeras cinco semanas de vida --

(Lund y Almlid, 1982; Hsu y Renshaw, 1985). El nivel de anticuerpos séricos disminuyó hasta los dos meses y medio (Lund y Almlid, 1982). Esto explicaría también el hecho de que raramente se infectan animales menores de tres meses, siendo evidente que los anticuerpos maternos, el medio ambiente y quizá -- otros factores aún no estudiados protegen a las crías contra la LC (Lund y Almlid, 1982; Brown y Olander, 1987). Asimismo, estos resultados muestran que cualquier plan inmunoproláctico debería introducirse a la edad de tres meses (Lund y Almlid, 1982).

A pesar de que la evidencia favorece a la respuesta inmune celular, aún no hay pruebas concluyentes al respecto y es posible que ambos mecanismos sean necesarios para dar una inmunidad sólida (Ayers, 1977), incluso es posible que la vacunación no estimule ninguno de los dos tipos de inmunidad en forma adecuada (Cameron et. al., 1972).

En el caso de que la inmunidad humoral fuese el único mecanismo de protección, quizá los niveles de anticuerpos obtenidos por los métodos de inmunización utilizados sean inadecuados para brindar una inmunidad sólida. En tal caso, la manipulación del antígeno para hacerlo más inmunogénico o la utilización de métodos alternos de inmunización ayudarán a resolver el problema (Cameron y Fuls, 1973). También es posible que los ovinos sean excepcionalmente poco sensibles a los antígenos de C. ovis, en el conocimiento de que esta especie-

es en general menos sensible que otras a la estimulación anti-génica (Cameron et. al., 1972).

Otras explicaciones que se han dado respecto al fracaso de diversos biológicos para brindar la protección adecuada es que tal vez los individuos inmunizados sean capaces de des---truir bacterias simples, pero no así acúmulos de bacterias -- (característicos de C. ovis), más difíciles de fagocitar y -- destruir (Cameron y Puls, 1973). Finalmente, se propone el - grado de dificultad que representa reproducir con fidelidad - la enfermedad natural en el laboratorio, según se explicó anteriormente (Cameron et. al., 1972).

Por otra parte, los pobres resultados obtenidos con bacteria atenuada e inculada por vía subcutánea, tal vez sean - consecuencia de un secuestro inadecuado de los microorganismos vacunales, ya que en el sitio de inoculación se forma un absceso encapsulado que seguramente dificulta el contacto de los antígenos con el sistema inmune (Cameron y Bester, 1984). Esto es importante si sabemos que la presencia del antígeno - en el nodo linfático es fundamental para que se de una res---puesta inmune eficaz, sea humoral o celular (Tizard, 1984).

Una observación interesante es el hecho de que la res---puesta inmune celular tiende a estar en relación inversa a la respuesta con anticuerpos. Este fenómeno, conocido como ni---cho inmunológico, se manifiesta con una respuesta celular ba-

ja y un nivel elevado de títulos serológicos de anticuerpos - (Tizard, 1984). En relación con la LC, sabemos que los animales jóvenes normalmente presentan una menor concentración de proteínas séricas totales que los adultos, y los animales --- afectados con LC presentan una concentración total mayor, por un aumento significativo de la fracción gamma-globulínica, -- muy probablemente por una respuesta a la estimulación constante de los antígenos de C. ovis (Husband y Watson, 1977). Si sabemos que la respuesta inmune celular contra la bacteria es clásica, donde los linfocitos T son activados para capacitar a los macrófagos para la destrucción del microorganismo, entonces el aumento mencionado en la producción de anticuerpos debe disminuir la eficiencia de la respuesta celular (Hard, - 1970; Husband y Watson, 1977; Renshaw et. al., 1979). De hecho, se sabe que la infección activa causa una depresión de la respuesta inmune celular del hospedero (Husband y Watson, - 1977; Gillespie y Timoney, 1983). Por otra parte, la abscedación nodal contribuye también a la depleción de la respuesta inmune celular al obstruir la salida de linfocitos T sensibilizados del propio nodo afectado (Hard, 1970; Husband y Wat-- son, 1977). El efecto de la exotoxina de inducir una cons--- tricción arteriolar y venular, posiblemente también contribuya a dificultar la interacción linfocito T-macrófago (Desiderio y Turillo, 1979).

Algunas consideraciones finales acerca de la inmunidad -
contra C. ovis son las siguientes:

El papel del complemento en la infección de C. ovis es -
común, al unirse a complejos antígeno-anticuerpo para contri-
buir a la destrucción de la bacteria, pero en este caso, el -
lípidos de superficie permite al microorganismo resistir con -
éxito este mecanismo inmunológico (Hsu, 1984; Tizard, 1984).

La presencia de inmunoglobulina tipo A en el suero de --
animales con LC, se explica por la destrucción tisular de la
barrera sangre-linfa de los nodos linfáticos afectados. Nor-
malmente los anticuerpos producidos contra C. ovis y su exoto-
xina son del tipo IgG e IgM (Husband y Watson, 1977).

D.- Importancia del Control de Calidad en la Producción Ex-- perimental de Biológicos para la Prevención de la Linfa- denitis Caseosa.

Es muy importante mencionar que los productos biológicos
deben ser sometidos a un riguroso control de calidad durante
su elaboración, envasado, etiquetado y almacenamiento (Tizard,
1984). Por tal motivo, a continuación se harán algunos comen-
tarios al respecto, en relación a los biológicos experimenta-
les a base de C. ovis y/o sus metabolitos.

Desde el momento en que el objetivo de la aplicación de--
un biológico en un paciente determinado es proteger contra --

una enfermedad dada y por ende, preservar la salud de dicho individuo, cualquier efecto nocivo sobre este estado de salud, causado por la aplicación del biológico, es en gran parte responsabilidad del laboratorio productor (descartando, -- por supuesto, reacciones individuales, de especie, edad, estres, hipersensibilidad, etc.) (Raya, 1985).

En nuestro país, la producción de biológicos de uso veterinario está regulada por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (S.A.R.H.). En los Estados Unidos de Norteamérica, dicha producción es controlada por el Departamento de Agricultura, a través del Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal (Tizard, 1984).

En general, las autoridades que se encargan de esta regulación, tiene el derecho de expedir una licencia de habilitación a los establecimientos que producen los biológicos, así como de inspeccionar y determinar que las instalaciones de -- que disponen son adecuadas y los métodos de producción satisfactorios (Tizard, 1984).

Para facilitar dicha inspección técnica y a la vez ejercer un control más eficiente, en los E.U.A. es publicado un Código de Regulaciones Federales, el cual prácticamente contiene los lineamientos de producción de todo lo que es producido y consumido en ese país. En el título 9 de este código, denominado Animales y Productos animales, partes 1 a 199, in-

cluye la Gufa de Producción de biológicos de diversa índole - (Clark, 1987).

Como en México no existe un documento similar de carácter oficial, muchos laboratorios del país se basan en los lineamientos del Código estadounidense para elaborar sus productos biológicos (Bojórquez, comunicación personal, 1990).

Es importante señalar que este Código de Regulaciones Federales de E.U.A., menciona no sólo los lineamientos generales a seguir, sino que marca la pauta de producción de muchos biológicos determinados (por ejemplo, el toxoide tetánico, la vacuna del virus de la Enf. de Newcastle, etc.), siempre y cuando existan y/o sean producidos en el mercado estadounidense. Cuando se pretende lanzar al mercado un producto nuevo, deben de seguirse los lineamientos generales marcados en el documento, dentro de una Gufa de Producción, la cual debe ser presentada a la dependencia gubernamental mencionada, la cual la evalúa y decide o no dar su aprobación (Clark, 1987).

En el caso particular de la producción de biológicos experimentales a base de C. ovis y/o sus subproductos, debemos considerar los siguientes puntos:

- 1) Los lineamientos del Código de Regulaciones Federales de E.U.A., están diseñados para laboratorios con una infraestructura de alto nivel, para la producción industrial de biológicos (Clark, 1987).

2) En dicho Código, no existe un lineamiento o Guía de Producción específico para biológicos a base de C. ovis o subproductos de este microorganismo, lo cual es significativo si conocemos la dificultad que representa a nivel experimental, la elaboración de biológicos de esta naturaleza, dada la disparidad de los resultados obtenidos - en las diversas investigaciones ya señaladas en el capítulo anterior de esta Introducción.

A pesar de lo anterior, en el presente trabajo nos hemos -- apegado lo más posible a la metodología propuesta en el ---- C.R.F. citado para la producción general de bacterinas, modificando algunos aspectos técnicos o bien adaptándolos a los - recursos de nuestro laboratorio y a las características específicas del microorganismo con el que se trabajó. Por ejemplo, tenemos la adaptación de la prueba de potencia como prueba de antigenicidad para C. ovis. Para dar una idea más completa de lo explicado, en el apéndice de este trabajo se indican algunos conceptos y procedimientos generales para la producción de bacterinas señalados en el C.R.F., y que fueron tomados como base para la metodología de este trabajo (Clark, - 1987).

Como se puede apreciar en dicho apéndice, el control de calidad propuesto por el Código de Regulaciones Federales de E.U.A. es un tanto riguroso y promueve la excelencia y seguridad de los productos finales obtenidos. Las modificaciones -

y/o adaptaciones que en este trabajo se hicieron a dicha metodología se apreciarán en la siguiente sección de este trabajo.

En base al panorama anterior, tan interesante y abierto a la investigación, se planteó el problema de iniciar la experimentación con biológicos para la prevención de la LC en México. El presente estudio inicia una serie de trabajos al respecto, con los cuales se pretende dar una pauta a mediano plazo para la inmunización de ovinos y caprinos, contra esta enfermedad de gran relevancia a nivel mundial y nacional.

O B J E T I V O S

- A.- Elaborar una bacterina experimental-
a partir de un cultivo de Corynebac-
terium ovis.

- B.- Evaluar la bacterina experimental --
elaborada.

MATERIAL Y METODO

M A T E R I A L Y M E T O D O

A.- Material (Adaptado de Cowan y Steel, 1979; Hafez, 1979; Sears, 1985; Clark, 1987).

a) Material biológico.

- 1) Corynebacterium ovis aislada a partir de nodos linfáticos y pulmones con lesiones características de LC, recolectados en el Rastro y Frigorífico del Distrito Federal (Ferrería).
- 2) Suero sanguíneo de origen equino, estéril.
- 3) Ratones blancos.
- 4) Cuyes cepa Hartley (blancos).
- 5) Antígeno de Corynebacterium ovis. Estandarizado a 76% transmitancia (600 nm) y adicionado con 1% de Tween 20.

b) Cristalería.

- 1) Pipetas de 10 ml. estériles.
- 2) Pipetas de 1 ml. estériles.
- 3) Pipetas de 1 ml. tipo Pasteur, estériles.
- 4) Embudos estériles.

M A T E R I A L Y M E T O D O

A.- Material (Adaptado de Cowan y Steel, 1979; Hafez, 1979; Sears, 1985; Clark, 1987).

a) Material biológico.

- 1) Corynebacterium ovis aislada a partir de nodos linfáticos y pulmones con lesiones características de-
LC, recolectados en el Rastro y Frigorífico del Dis-
trito Federal (Ferrería).
- 2) Suero sanguíneo de origen equino, estéril.
- 3) Ratones blancos.
- 4) Cuyes cepa Hartley (blancos).
- 5) Antígeno de Corynebacterium ovis. Estandarizado a-
76% transmitancia (600 nm) y adicionado con 1% de -
Tween 20.

b) Cristalería.

- 1) Pipetas de 10 ml. estériles.
- 2) Pipetas de 1 ml. estériles.
- 3) Pipetas de 1 ml. tipo Pasteur, estériles.
- 4) Embudos estériles.

- 5) Viales ámbar de 100 ml. estériles.
- 6) Viales de 5 ml. estériles.
- 7) Cajas de Petri de 25 ml. estériles.
- 8) Matraces Erlenmeyer de 250 ml. estériles.
- 9) Vasos de precipitado de 50 ml. estériles.
- 10) Tubos de ensaye con tapón de rosca, de 10 ml. estériles.
- 11) Frasco de 500 ml con tapa de rosca.
- 12) Vasos de precipitado de 200 ml.
- 13) Placa de cristal de 10 x 30 cm.

c) Medios de cultivo.

- 1) Agar Sangre, marca Bioxon, # cat. 104-1.
- 2) Oxidación-Fermentación (O-F), marca Difco, # cat.--0688-01.
- 3) Caldo Urea, marca Bioxon, # cat. 215-1.
- 4) Rojo de metilo-Voges Proskauer (MR-VP), marca Bioxon, # cat. 122-1.
- 5) Leche Tornasol, marca Difco, # cat. 0241-01.

- 6) Nitratos, marca Difco, # cat. 0268-01.
- 7) Sulfihídrico-Indol-Motilidad (SIM), marca Bioxon, # Cat. 101-1.
- 8) Caldo de Infusión de Cerebro-Corazón (BHI), marca - Bioxon, # cat. 112-1.
- 9) Caldo de Trypticaseína de Soya, marca Bioxon, # cat. 111-1.
- 10) Caldo Saboraud, marca Bioxon, # cat. 114-1.
- 11) Agar de infusión de Cerebro-Corazón (BHI), marca -- Bioxon, # cat. 147-1.
- 12) Agar de Trypticaseína de soya, marca Bioxon, # cat. 108-1.
- 13) Agar Saboraud, marca Bioxon, # cat. 107-1.
- 14) Medios de azúcares al 1%, con base de agua peptonada:
 - D(+)-Maltosa (Merck, # cat. 5910).
 - Rafinosa (Merck, # cat. 7549).
 - D(+)-Galactosa (Merck, # cat. 4058).
 - Trehalosa (Merck, # cat. 8353).
 - Alfa-L-Ramnosa (Sigma, # cat. R-3875).
 - Dextrosa (Merck, # cat. 2085).

- D-Xilosa (Merck, # cat. 8685).
- Manosa (Merck, # cat. 6519).
- D-Sorbitol (Difco, # cat. 0179-17).
- L(+)-Arabinosa (Merck, # cat. 1492).
- Inositol (Merck, # cat. 4728).

d) Aparatos.

- 1) Centrífuga marca "BHG Instrumenta", mod. "Roto Uni-II".
- 2) Estufa Bacteriológica marca "Riossa", mod. EC-----181932.
- 3) Microscopio compuesto de campo claro marca "Carl --Zeiss", mod. 2829.
- 4) Engargoladora marca "Lab-Line", # 2.
- 5) Agitador orbital marca "Lab-Line", mod. 3535.
- 6) Olla de presión (autoclave) marca "Altex", mod. ---1925-X.
- 7) Cronómetro, marca "Citizen".
- 8) Medidor de pH marca "Corning", mod. portátil 3-D.
- 9) Espectrofotómetro marca "Bausch & Lomb".

e) Equipo.

- 1) Asa bacteriológica.
- 2) Espátula.
- 3) Mecheros Bunsen.
- 4) Tijeras de disección..
- 5) Pinzas de disección.
- 6) Bisturí # 4 con hoja # 24.
- 7) Gradillas para tubos de ensaye.
- 8) Franelas para limpieza.
- 9) Palillos de madera.
- 10) Jeringas de 20 ml con aguja 20 x 32 mm. estériles.
- 11) Jeringas de 5 ml con aguja para insulina, estéri---les.
- 12) Jeringas de 5 ml con aguja de 20 x 32 mm. estéri---les.
- 13) Jeringas de 3 ml con aguja de 21 x 29 mm, estéri---les.
- 14) Jeringas de 1 ml con aguja para insulina, estéri---les.

- 15) Jaulas para ratones con comederos y bebederos.
- 16) Jaulas para cuyes con comederos y bebederos.
- 17) Marcadores de tinta permanente.
- 18) Navajas de rasurar.
- 19) Micropipeta de aglutación.
- 20) Micromezclador para diluciones dobles.
- 21) Placa para microaglutinación.

f) Reactivos.

- 1) Solución de formalina al 10%.
- 2) Solución de formalina al 3% (desinfectante).
- 3) Solución de cloruro de aluminio al 10%, estéril.
- 4) Solución de hidróxido de sodio al 10%, estéril.
- 5) Solución de cloruro de sodio al 0.9%, estéril.
- 6) Solución de ácido clorhídrico al 1%, estéril.
- 7) Solución de hidróxido de sodio al 1%, estéril.
- 8) Solución buffer de fosfatos (PBS) al 0.9%.
- 9) Cloroformo.

g) Otros.

- 1) Aceite de inmersión.
- 2) Portaobjetos.
- 3) Etiquetas autoadheribles de 30 x 50 mm.
- 4) Tapones de goma para vial.
- 5) Gárgolas para vial.
- 6) Alimento comercial para conejo.

B) Metodología (Adaptada de Awad, 1960; Daniel, 1977; Cowan y Steel, 1979; Hafez, 1979; Sears, 1985; Clark, 1987; Sean y Leamaster, 1987).

a) Aislamiento e identificación de la Semilla Maestra.

A partir de los abscesos recolectados se tomaron las --- muestras correspondientes (1 por absceso), previa esterilización con espátula caliente de la superficie del absceso e incisión con bisturí de la cápsula del mismo, para exponer el exudado, y se sembraron en agar sangre (placa), mediante la técnica americana para dilución de colonias.

Las muestras así obtenidas se incubaron en la estufa bacteriológica por 48 hrs a 37 grados centígrados.

g) Otros.

- 1) Aceite de inmersión.
- 2) Portaobjetos.
- 3) Etiquetas autoadheribles de 30 x 50 mm.
- 4) Tapones de goma para vial.
- 5) Gárgolas para vial.
- 6) Alimento comercial para conejo.

B) Metodología (Adaptada de Awad, 1960; Daniel, 1977; Cowan y Steel, 1979; Hafez, 1979; Sears, 1985; Clark, 1987; -- Sean y Leamaster, 1987).

a) Aislamiento e identificación de la Semilla Maestra.

A partir de los abscesos recolectados se tomaron las --- muestras correspondientes (1 por absceso), previa esterilización con espátula caliente de la superficie del absceso e incisión con bisturí de la cápsula del mismo, para exponer el - exudado, y se sembraron en agar sangre (placa), mediante la técnica americana para dilución de colonias.

Las muestras así obtenidas se incubaron en la estufa bac
teriológica por 48 hrs a 37 grados centígrados.

Posteriormente se observó la morfología colonial y se seccionaron aquellos especímenes sospechosos de ser Corynebacterium ovis y se les realizó tinción de Gram a los frotis correspondientes. Si las bacterias observadas correspondían con la morfología de C. ovis, al cultivo correspondiente se le realizó el estudio de pruebas primarias y secundarias de identificación bacteriana mediante la siembra en tubos con medios de O-F, Caldo Urea, MR-VP, Leche Tornasol, Nitratos, SIM y azúcares de acuerdo a las normas establecidas. A cada tubo de medio se le añadió 0.5 ml de suero equino, esterilizado -- por filtración.

Los tubos se incubaron a 37 grados centígrados por 48 -- hrs en la estufa bacteriológica. Pasado ese lapso se procedió a hacer la lectura de los tubos y las cepas que correspondieron a C. ovis fueron seleccionadas como Semilla Maestra para la elaboración de la bacterina experimental, manteniéndose en refrigeración a 4 grados centígrados.

b) Elaboración del biológico.

Se desinfectó cuidadosamente el área de trabajo y se dejaron los mecheros encendidos por 10 minutos antes de empezar a trabajar. Se tomaron las cepas seleccionadas de la Semilla Maestra, como Semilla de Trabajo, ya con un pase previo en -- placa de agar sangre y se tomó una muestra de cada una de --- ellas, la cual se sembró en el correspondiente matraz con 250

ml de caldo BHI. A cada matraz sembrado de esta forma, se le añadió 12.5 ml de suero equino, sellando después cada matraz con su tapón.

Estos matraces se introdujeron al agitador orbital, previamente preparado con 10 litros de agua destilada calentada a 37 grados centígrados. Se ajustó el aparato a 200 rpm y se dejó funcionando por 48 hrs. Pasado ese tiempo se tomó una muestra de cada cultivo y a cada frotis se le realizó tinción de Gram. Si la morfología de estos cultivos era satisfactoria, se les realizó el estudio de pruebas de identificación bacteriana ya descritas. Aquellos cultivos que dieron positivo a C. ovis, se utilizaron como Semilla de Producción para elaborar la bacterina experimental.

A estos cultivos se les realizaron tres pruebas de evaluación, a saber:

- 1) Determinación de la concentración de bacteria.
- 2) Prueba de pureza (de Semilla de Producción).
- 3) Prueba de esterilidad (de Semilla de Producción inactivada).

Con fines descriptivos, estas pruebas se mencionarán en la siguiente sección de este capítulo.

Los cultivos que pasaron satisfactoriamente las dos primeras pruebas se inactivaron con 0.25 ml de una solución de formalina al 10%, incubándose cada matraz por 24 hrs a 37 grados centígrados en la estufa bacteriológica, y después se les aplicó la prueba de esterilidad mencionada.

El siguiente paso fue adicionar a los cultivos que pasaron satisfactoriamente la última prueba (bajo las mismas condiciones de esterilidad que todos los pasos anteriores), la solución de cloruro de aluminio a razón de 0.4-0.6% (1.5 ml - por matraz). Posteriormente se amortiguó el pH ácido resultante con la solución de hidróxido de sodio al 10%. Para --- ajustar el pH, se utilizó un potenciómetro portátil.

Durante esta operación el cultivo fue precipitado por el hidróxido de aluminio resultante, el cual actuará como adyuvante de la bacterina experimental así elaborada.

A continuación se homogenizó el preparado de cada matraz y con ayuda de los embudos de cristal se vació el contenido a los viales ámbar, depositando 100 ml en cada uno. El material sobrante se desechó. Cada vial fue engargolado y etiquetado.

El producto obtenido se dejó reposar una semana en refrigeración (cuatro grados centígrados) y se procedió a la aplicación de las siguientes pruebas de evaluación:

c) Evaluación de la bacterina experimental.

Como ya se mencionó, a los cultivos de la Semilla de Producción se les realizaron las siguientes pruebas:

1) Determinación de la concentración de bacteria.

En este caso, se tomó una muestra de cultivo y se colocó en la cubeta de un espectrofotómetro, previamente calibrado a una longitud de onda de 600 nm. Se considera satisfactoria una lectura del 75-80% de transmitancia, para esta prueba.

2) Prueba de pureza (de Semilla de Producción).

A partir de cada matraz de cultivo, se tomaron cuatro muestras, las cuales se sembraron en placas de agar sangre. Se incubaron por 48 hrs y se realizó frotis para tinción de Gram junto con pruebas bioquímicas para identificación bacteriana. Se considera esta prueba como satisfactoria sí sólo se identifica y aísla al microorganismo que constituye la bacterina, y sin la presencia de ningún otro germen contaminante, a partir de todas las muestras tomadas.

3) Prueba de esterilidad (de Semilla de Producción inactivada).

Después de la incubación de los cultivos inactivados, se

tomaron muestras de los matraces y se sembraron en cuatro placas de agar sangre (por matraz). Se incubaron a 37 grados centígrados (2) y a temperatura ambiental (2), durante siete días. También se tomaron otras cuatro --- muestras de cada matraz y se sembraron en placa de agar-Saboraud, que se incubaron a 37 grados centígrados (2)- y a temperatura ambiental (2) por 14 días. En cada caso se dejó una placa de agar sangre o Saboraud como control, sin sembrar.

Se considera satisfactoria la prueba si no hay crecimiento de ningún tipo en todas las placas sembradas.

Para evaluar la bacterina experimental elaborada, se realizaron las siguientes pruebas:

- 1) Prueba de determinación de pH (producto finalizado).
- 2) Prueba de esterilidad (producto finalizado).
- 3) Prueba de pureza (producto finalizado).
- 4) Prueba de seguridad.
- 5) Prueba de antigenicidad.

A continuación se describe cada una de estas pruebas:

- 1) Prueba de determinación de pH (producto finalizado).

Para determinar el pH final de la bacterina experimental, se tomaron dos muestras de 5 ml de cada vial y se colocaron - en vasos de precipitado. Se calibró el potenciómetro con ---

S.S.F. al 0.9% (para un juego de muestras), y con PBS al 0.9% (para el 2o. juego). se sumergió el bulbo del aparato en cada una de las muestras para tomar la lectura correspondiente. - Se considera satisfactorio un pH promedio entre 6.5 y 7.5.

2) Prueba de esterilidad (producto finalizado).

A partir de cada vial se tomaron muestras con jeringa estéril y se inocularon por gota 20 placas de agar BHI, 20 placas de agar de tripticaseína de soya y 20 cajas de agar Sabouraud, evitando que la gota se escurriera por la superficie -- del agar. Se dejó secar y se incubó cada caja a 37 grados -- centígrados (10 cajas) y a temperatura ambiente (10 cajas), -- durante siete días. A la vez, se dejaron 10 placas de cada -- medio como control sin inocular, a 37 grados centígrados (cin -- co cajas) y a temperatura ambiente (cinco cajas). La prueba -- es satisfactoria si no hay crecimiento en ningún medio.

Por otra parte, a partir de cada vial de bacterina experimental, se inocularon también 20 matraces con caldo BHI, 20 con caldo de tripticaseína de soya y 20 con caldo Sabouraud -- (cada matraz contenía 200 ml de medio). De cada medio se de -- jaron también 10 matraces testigo por muestra. Todos estos -- medios se incubaron de la misma forma que las placas de agar, y se evaluaron bajo el mismo criterio.

3) Prueba de pureza (producto finalizado).

A partir de cada vial de bacterina experimental, se realizaron 30 frotis en portaobjetos y se colorearon con la tinción de Gram. Estas laminillas fueron observadas al microscopio compuesto para determinar el tipo de bacteria presente en base a su morfología. Esta prueba es satisfactoria sólo - si se observa el tipo original de microorganismo presente en la Prueba de pureza para la Semilla de Producción aprobada, y ningún otro.

4) Prueba de seguridad.

Esta prueba se realizó tanto en ratones como en cuyes. - En el primer caso, a partir de cada vial de bacterina experimental se inocularon por vía subcutánea 10 ratones blancos. - A cada ratón se le aplicó 0.5 ml de bacterina.

Después de esto, se observaron durante 15 días. Si alguno de los ratones moría en este periodo de tiempo, se realizó la necropsia y el cultivo bacteriológico del bazo. También - se observó si se llegaban a producir cambios en el sitio de - inoculación.

En el segundo caso, a partir de cada vial de bacterina experimental se inocularon dos cuyes por vía intramuscular; a cada animal se le aplicó 0.5 ml de bacterina.

A continuación se mantuvieron en observación por un lapso de 15 días. En caso de muerte de algún cuye, se realizó la necropsia y el cultivo bacteriológico del bazo. Asimismo se revisó si los cuyes presentaban lesiones en el sitio de -- inoculación.

En ambas pruebas, se considera satisfactorio el resultado que muestra la ausencia de muerte en alguno de los miembros de la población estudiada, por causas atribuibles al producto que nos ocupa.

5) Prueba de antigenicidad.

En esta prueba, por cada vial de bacterina se inocularon 10 ratones con 0.5 ml de bacterina, dejándose 10 ratones más como grupo control. Todos los ratones fueron inoculados por vía subcutánea, y al lote testigo se le aplicó 0.5 ml de agua destilada estéril.

A los 15 días se sangraron en blanco tres ratones de cada grupo experimental y tres ratones del grupo testigo. Los sueros obtenidos se depositaron en dos viales, uno para los -- sueros experimentales y otro para los sueros testigo.

El resto de los ratones fue revacunado con la bacterina (gpo. experimental) o reinoculado con agua destilada estéril (gpo. control).

Pasados ocho días de esta 2a. vacunación, se sangraron - en blanco cuatro ratones de cada grupo experimental y cuatro de cada grupo testigo. Se obtuvieron los sueros correspon---dientes y se almacenaron de modo similar a los anteriores.

Finalmente, a los ocho días de esta última operación (31 días del inicio del experimento), se repitió el sangrado, obtención y almacenamiento de sueros de los ratones restantes - (3) de cada grupo.

Para la obtención del suero, se centrifugó la sangre recolectada a 2500 rpm por 10 min. Después de almacenar los -- sueros en los viales correspondientes, éstos se mantuvieron - en congelación hasta el momento de ser utilizados.

Con el suero obtenido de esta manera, se obtuvieron seis subgrupos de sueros, tres del grupo experimental, a los 15, - 23 y 31 días; y tres del grupo control, a los 15, 23 y 31 --- días por vial de bacterina experimental (ver cuadro 1).

Con cada uno de estos subgrupos de sueros, se realizaron pruebas de aglutinación para la detección de títulos de anti---cuerpos inducidos por la bacterina experimental inoculada.

Para tal fin se aplicaron dos pruebas adaptadas de el -- test de aglutinación propuesto por Awad (1960) para C. ovis. - En estas pruebas se utilizó un antígeno estandarizado de C. - ovis a base de somas celulares, preparado en el laboratorio -

de Microbiología (Campo IV) de la F.E.S. Cuautitlán, bajo la supervisión del Ing. Luis Bojórquez Narváez. Las dos pruebas de aglutinación manejadas fueron las siguientes:

1) Prueba cualitativa de aglutinación en placa.

Se colocó una gota de suero en un portaobjetos limpio y se añadió una gota del antígeno de C. ovis. Se tomaron lecturas a los tres y ocho minutos para detectar la presencia de la reacción aglutinante.

2) Prueba cuantitativa de aglutinación en placa.

En una placa de microtitulación se colocaron 0.5 ml de antígeno en cada pozo, después se tomaron 0.5 ml de suero y se colocaron en el primer pozo de cada serie; a continuación, con la micromezcladora para microtitulación se fueron transfiriendo 0.5 ml de la mezcla del primer pozo (1:1) a través de la serie lineal para cada suero, realizándose así diluciones dobles. En el último pozo de cada serie se dejó únicamente antígeno como control (ver cuadro 2).

Una vez realizadas las diluciones de cada suero, éstas se transfirieron a una placa de cristal con la ayuda de una pipeta Pasteur para cada suero, y empezando de la dilución más alta (desde el final de cada serie), para evitar lecturas falsas.

de Microbiología (Campo IV) de la F.E.S. Cuautitlán, bajo la supervisión del Ing. Luis Bojórquez Narváez. Las dos pruebas de aglutinación manejadas fueron las siguientes:

1) Prueba cualitativa de aglutinación en placa.

Se colocó una gota de suero en un portaobjetos limpio y se añadió una gota del antígeno de C. ovis. Se tomaron lecturas a los tres y ocho minutos para detectar la presencia de la reacción aglutinante.

2) Prueba cuantitativa de aglutinación en placa.

En una placa de microtitulación se colocaron 0.5 ml de antígeno en cada pozo, después se tomaron 0.5 ml de suero y se colocaron en el primer pozo de cada serie; a continuación, con la micromezcladora para microtitulación se fueron transfiriendo 0.5 ml de la mezcla del primer pozo (1:1) a través de la serie lineal para cada suero, realizándose así diluciones dobles. En el último pozo de cada serie se dejó únicamente antígeno como control (ver cuadro 2).

Una vez realizadas las diluciones de cada suero, éstas se transfirieron a una placa de cristal con la ayuda de una pipeta Pasteur para cada suero, y empezando de la dilución más alta (desde el final de cada serie), para evitar lecturas falsas.

de Microbiología (Campo IV) de la F.E.S. Cuautitlán, bajo la supervisión del Ing. Luis Bojórquez Narváez. Las dos pruebas de aglutinación manejadas fueron las siguientes:

1) Prueba cualitativa de aglutinación en placa.

Se colocó una gota de suero en un portaobjetos limpio y se añadió una gota del antígeno de C. ovis. Se tomaron lecturas a los tres y ocho minutos para detectar la presencia de la reacción aglutinante.

2) Prueba cuantitativa de aglutinación en placa.

En una placa de microtitulación se colocaron 0.5 ml de antígeno en cada pozo, después se tomaron 0.5 ml de suero y se colocaron en el primer pozo de cada serie; a continuación, con la micromezcladora para microtitulación se fueron transfiriendo 0.5 ml de la mezcla del primer pozo (1:1) a través de la serie lineal para cada suero, realizándose así diluciones dobles. En el último pozo de cada serie se dejó únicamente antígeno como control (ver cuadro 2).

Una vez realizadas las diluciones de cada suero, éstas se transfirieron a una placa de cristal con la ayuda de una pipeta Pasteur para cada suero, y empezando de la dilución -- más alta (desde el final de cada serie), para evitar lecturas falsas.

Se tomaron las lecturas a los tres y ocho minutos para la detección de reacciones aglutinantes.

Los resultados obtenidos en esta prueba cuantitativa, fueron interpretados en forma logarítmica y sometidos a un análisis estadístico de varianza para comparación de las medias de las poblaciones estudiadas (ratones vacunados y ratones sin vacunar).

Los viales de la bacterina experimental que aprobaron todas las pruebas de evaluación señaladas, fueron rotulados de acuerdo a las normas establecidas y almacenados a cuatro grados centígrados. En la figura 1., se muestra un diagrama de flujo de la metodología descrita en este capítulo.

C U A D R O S

CUADRO 1.- PRUEBA CUANTITATIVA DE AGLUTINACION EN PLACA PARA C. ovis: Subgrupos derivados a partir de la obtención de sueros, por vial de bacterina experimental (Adaptado de Awad, 1960).

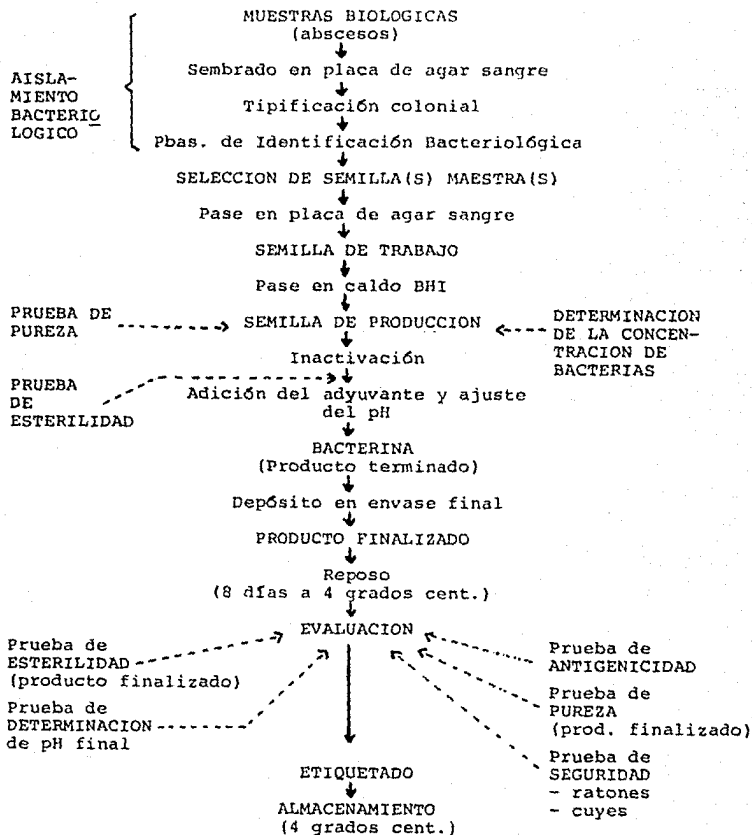
GRUPO	TOTAL DE RATONES FOR GRUPO	SUBGRUPOS OBTENIDOS	DIAS PREVIOS A LA OB TENCION DE SUERO	NO. DE RATONES INCLUIDOS
EXPERI MENTAL	10	E-1	15	3
		E-2	23	4
		E-3	31	3
CONTROL	10	C-1	15	3
		C-2	23	4
		C-3	31	3

CUADRO 2.- REPRESENTACION DE LAS DILUCIONES UTILIZADAS EN LA PRUEBA CUANTITATIVA DE AGLUTINACION EN PLACA PARA C. ovis. (Adaptado de Awad, 1960).

DILUCIONES

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Ag
<u>ANTIGENO</u>												
NO (ml)	.5	.5	.5	.5	.5	.5	.5	.5	.5	.5	.5	1
<u>SUERO</u>												
(ml)	.5	.25	.125	.062	.031	.015	.007	.003	.001	.0009	.0004	0

FIGURA 1: ELABORACION Y EVALUACION DE UNA BACTERINA EXPERIMENTAL DE *Corynebacterium ovis* (Adaptado de Awad, 1960; Cowan y Steel, 1979; Sears, 1985; Clark, 1987 y Sean y Leamaster, 1987).



RESULTADOS

RESULTADOS

Se recolectaron un total de 20 muestras de abscesos sospechosos de LC, a partir de pulmones y nodos linfáticos de ovinos y caprinos. El crecimiento colonial correspondió al reportado para Corynebacterium ovis (Carter, 1985), en las 20 muestras.

La observación de frotis obtenidos a partir de las colonias referidas, mostró la presencia de bastos cortos Gram (+), característicos de C. ovis (Jawetz y Melnick, 1983; Carter, 1985), en los 20 casos estudiados. Las pruebas de identificación bacteriológica reportaron como C. ovis a los 20 cultivos obtenidos, los cuales se almacenaron a cuatro grados centígrados, como Semillas Maestras para la producción de la bacterina experimental.

Se seleccionaron dos de estos cultivos en forma aleatoria para ser las Semillas de Trabajo de la bacterina experimental. Los cultivos seleccionados se identificaron como cepa 12 y cepa 42.

Estos cultivos se pasaron a caldo BHI enriquecido con suero sanguíneo de origen equino para obtener las Semillas de Producción correspondientes, identificadas con los mismos números de las Semillas de Trabajo de origen.

A estas cepas se les determinó la concentración de bacterias mediante la lectura espectrofotométrica, ajustada a 600-nm de longitud de onda, la cual arrojó los siguientes resultados:

Cepa 12	76% de transmitancia
Cepa 42	77% de transmitancia

La concentración se consideró satisfactoria para los dos cultivos.

Asimismo, las dos cepas pasaron satisfactoriamente la prueba de pureza para Semilla de Producción, al recuperarse la bacteria de los cultivos realizados, sin contaminante alguno.

Los dos cultivos, una vez inactivados, también pasaron en forma satisfactoria la prueba de esterilidad para Semilla de Producción inactivada, al no detectarse ningún tipo de crecimiento en los medios sembrados a partir de los cultivos inactivados, ni en los medios de control, a 37 grados centígrados y a temperatura ambiental.

El ajuste de pH realizado durante la adición del adyuvante, dio como resultado una lectura de 6.97 para la cepa 12 y de 6.95 para la cepa 42, considerados ambos como satisfactorios dentro de los parámetros establecidos (Clark, 1987).

A partir de cada matraz de bacterina experimental elaborada (un matraz de 250 ml por cepa), se obtuvieron dos viales de 100 ml de bacterina experimental, el sobrante desechado. A cada par de viales se le identificó provisionalmente con la leyenda Bacterina Experimental de C. ovis, el número de la cepa correspondiente y el número de vial:

SEMILLA DE PRODUCCION	# DE VIALES DE BACTERINA OBTENIDOS	NOMENCLATURA
12	2	12-1
		12-2
42	2	42-1
		42-2

Los cuatro viales de bacterina experimental obtenidos, -- después de una semana de reposo en refrigeración, fueron sometidos a las pruebas de evaluación correspondientes. Los resultados obtenidos se indican a continuación:

a) Prueba de esterilidad (producto finalizado).

En este caso, los cuatro viales pasaron satisfactoriamente la prueba, puesto que ninguno de los medios de cultivo sembrados por gota a partir de las correspondientes muestras de bacterina mostró crecimiento bacteriano o micótico durante el tiempo de observación considerado, tanto a 37 grados centígrados como a temperatura ambiental. Lo mismo ocurrió con los medios de control de la prueba (ver tabla 2).

b) Prueba de determinación de pH final.

Los resultados se ilustran en la tabla 3.

c) Prueba de pureza (producto finalizado).

En todos los frotis observados a partir de los cuatro --
viales de bacterina experimental, siempre se observaron bastones
cortos Gram (+), aislados o en grupos, junto con una substan
cia homogénea de color rosa intenso, correspondiente al --
adyuvante. No se detectó otra morfología bacteriana o micótica
ca. La prueba se consideró satisfactoria para los cuatro viales
de bacterina.

d) Prueba de seguridad.

1) Ratones.

Ninguno de los animales inoculados mostró signos de en--
fermedad o daño atribuible al producto aplicado, durante
todo el tiempo de observación. Esto fue constante en --
los cuatro lotes de ratones, correspondientes a los via--
les evaluados. La prueba se consideró satisfactoria.

2) Cuyes.

El resultado de esta prueba fue similar al de la prueba--
en ratones. La prueba se consideró satisfactoria.

e) Prueba de antigenicidad.

Los resultados obtenidos en las pruebas de aglutinación-correspondientes son los siguientes:

- 1) Prueba cualitativa de aglutinación en placa para --
C. ovis.

En esta prueba, los sueros experimentales mostraron resultados positivos al notarse una reacción aglutinante - (formación de grumos), a los 4-5 minutos de haber mezclado la gota de antígeno de C. ovis con el suero correspondiente. Esta reacción aglutinante fue generalmente más-marcada en aquellos grupos de sueros obtenidos a los 23-días de iniciado el experimento (a los ocho días de la - 2a. vacunación) (ver tabla 4).

Los sueros de los ratones control dieron resultados negativos (sin aglutinación) (ver tabla 4).

- 2) Prueba cuantitativa de aglutinación en placa para -
C. ovis.

Los resultados obtenidos en esta prueba y su conversión-logarítmica se ilustran en la tabla 5, mostrándose que - los sueros experimentales registraron títulos más altos- que los sueros testigo, en los cuatro viales de bacteria- na.

El análisis estadístico de estos datos se presenta en -- las tablas 6, 7 y 8.

TABLA 2: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD (PRODUCTO -- FINALIZADO).

VIAL	MEDIOS DE CULTIVO	TEMPERATURA	CRECIMIENTO	RESULTADO
12-1	Agar BHI	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar Trypticaseína de Soya	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar Saboraud	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo BHI	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo Trypticaseína de Soya	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo Saboraud	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
12-2	Agar BHI	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar Trypticaseína de Soya	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar Saboraud	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo BHI	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo Trypticaseína de Soya	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
42-1	Caldo Saboraud	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar BHI	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar Trypticaseína de Soya	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar Saboraud	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio

TABLA 2: (Continuación)

VIAL	MEDIOS DE CULTIVO	TEMPERATURA	CRECIMIENTO	RESULTADO
42-1	Caldo BHI	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo Trypticaseína de Soya	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo Saboraud	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
42-2	Agar BHI	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar Trypticaseína de Soya	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Agar Saboraud	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo BHI	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo Trypticaseína de Soya	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio
	Caldo Saboraud	37°C Medio amb.	Negativo Negativo	Satisfactorio

TABLA 3: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DETERMINACION DE pH FINAL.

VIAL	pH	RESULTADO
12-1	6.7	Satisfactorio
12-2	6.8	Satisfactorio
42-1	6.8	Satisfactorio
42-2	6.7	Satisfactorio

TABLA 4: RESULTADOS DE LA PRUEBA CUALITATIVA DE AGLUTINACION EN PLACA PARA C. ovis.

VIALES	12-1		12-2		42-2		42-2	
Gpos. de Ratonos	E	C	E	C	E	C	E	C
DIAS * 15	+	-	+	-	++	-	+	-
23	++	-	+	-	++	-	++	-
31	+	-	+	-	+	-	+	-

E = Experimental + = Aglutinación visible - = Negativo
 C = Control ++ = Aglutinación marcada * de iniciada la pba.

TABLA 5: RESULTADOS DE LA PRUEBA CUANTITATIVA DE AGLUTINACION EN PLACA PARA C. ovis.

VIALES	12-1		12-2		42-1		42-2	
Gpos. de Ratonos	E	C	E	C	E	C	E	C
DIAS* 15	1:128 (2.1)	1:2 (0.3)	1:128 (2.1)	1:16 (1.2)	1:128 (2.1)	1:2 (0.3)	1:128 (2.1)	1:2 (0.3)
23	1:256 (2.4)	1:2 (0.3)	1:256 (2.4)	1:8 (0.9)	1:256 (2.4)	1:8 (0.9)	1:256 (2.4)	1:2 (0.3)
31	1:128 (2.1)	1:2 (0.3)	1:128 (2.1)	1:8 (0.9)	1:256 (2.4)	1:2 (0.3)	1:128 (2.1)	1:2 (0.3)

E = Gpo. experimental. * de iniciada la prueba.
 C = Gpo. control.

NOTA: Se indica el título más alto en el que se observó la - reacción aglutinante, y entre paréntesis, su conver- sión logarítmica.

ANALISIS ESTADISTICO DE VARIANZA

TABLA 6: ANALISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA - PRUEBA CUANTITATIVA DE AGLUTINACION EN PLACA PARA - C. ovis: Lectura a los 15 días de iniciada la prueba (Daniel, 1977; Scheffler, 1981).

DATOS

Lote	Gpo. Exp. (n_1)	Gpo. Control (n_2)	
12-1	2.10	0.30	$k = 2$
12-2	2.10	1.20	$n_T = 8$
42-1	2.10	0.30	
42-2	2.10	0.30	$\bar{X} = 1.31$
			$S^2_{(a)} = 0.095$
n	4	4	
\bar{X}	2.10	0.52	
s^2	0	0.19	

CALCULOS

$$SC = (2.1 - 1.31)^2 + (0.52 - 1.31)^2 = 0.6241 + 0.6241 = 1.2482$$

$$s^2_{(\bar{X})} = \frac{1.2482}{1} = 1.2482$$

$$S^2_{(b)} = 1.2482 (4) = 4.99$$

$$F_{(1,6)} = \frac{4.99 + 0}{0.095} = 52.52$$

Valores críticos de F (Scheffler, 1981): 0.01 = 13.74

Entonces:

$$52.52 > 13.74 \quad (P > 0.01)$$

Por lo tanto, la diferencia entre las medias es significativa.

Nota: $S^2_{(a)}$ = Varianza intragrupal.

$S^2_{(b)}$ = Varianza entre las medias de los tratamientos (k).

TABLA 7: ANALISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA -
 PRUEBA CUANTITATIVA DE AGLUTINACION EN PLACA PARA -
 C. ovis: Lectura a los 23 días de iniciada la prue-
 ba (Daniel, 1977; Scheffler, 1981).

DATOS

Lote	Gpo. Exp. (n_1)	Gpo. Control (n_2)	$k = 2$
12-1	2.40	0.30	$n_T = 8$
12-2	2.40	0.90	
42-1	2.40	0.90	$\bar{X} = 1.46$
42-2	2.10	0.30	$S^2_{(a)} = 0.07$
n	4	4	
\bar{X}	2.32	0.60	
s^2	0.02	0.12	

CALCULOS

$$SC = (2.32 - 1.40)^2 + (0.60 - 1.46)^2 = 0.7396 + 0.7396 = 1.4792$$

$$s^2_{(\bar{X})} = \frac{1.4792}{1} = 1.4792$$

$$S^2_{(b)} = 1.4792 (4) = 5.91$$

$$F_{(1,6)} = \frac{5.91 + 0}{0.07} = 84.42$$

Valores críticos de F (Scheffler, 1981): 0.01 = 13.74

Entonces

$$84.42 > 13.74 \quad (P > 0.01)$$

Por lo tanto, la diferencia entre las medias es significativa.

TABLA 8: ANALISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA CUANTITATIVA DE AGLUTINACION EN PLACA PARA *C. ovis*: Lectura a los 31 días de iniciada la prueba (Daniel, 1977; Scheffler, 1981).

DATOS

Lote	Gpo. Exp. (n_1)	Gpo. Control (n_2)	$k = 2$
12-1	2.10	0.30	$n_T = 8$
12-2	2.10	0.90	
42-1	2.40	0.30	$\bar{X} = 1.31$
42-2	2.10	0.30	
			$S^2_{(a)} = 0.055$
n	4	4	
\bar{X}	2.17	0.45	
s^2	0.02	0.09	

CALCULOS

$$SC = (2.17 - 1.31)^2 + (0.45 - 1.31)^2 = 0.7396 + 0.7396 = 1.4792$$

$$s^2_{(X)} = \frac{1.4792}{1} = 1.4792$$

$$S^2_{(b)} = 1.4792 (4) = 5.91$$

$$F_{(1.6)} = \frac{5.91 + 0}{0.07} = 84.92$$

Valores críticos de F (Scheffler, 1981): 0.01 = 13.74

Entonces:

$$84.92 > 13.74 \quad (P > 0.01)$$

Por lo tanto, la diferencia entre las medias es significativa.

DISCUSSION

Si bien los resultados obtenidos en las diversas pruebas de evaluación de la bacterina experimental elaborada, fueron satisfactorios, se deben hacer algunos comentarios al respecto.

En primer lugar, se hace hincapié en el hecho de que no está reportada una Guía de Producción específica para biológicos a base de C. ovis y/o sus metabolitos (Clark, 1987). Por este motivo, se han realizado algunas adaptaciones a los Requerimientos Estándar citados en el Código de Regulaciones Federales, las cuales toman en cuenta las características especiales del microorganismo con el que se trabajó, tales como - metabolismo, características antigénicas, etc.

En la Prueba de Pureza para producto finalizado, no se llevó a cabo el aislamiento, puesto que el producto había pasado satisfactoriamente la Prueba de Esterilidad. Entonces, para comprobar la presencia de C. ovis en el producto (y ningún otro microorganismo), se procedió a la toma de muestras - en forma aleatoria para la elaboración de frotis para coloración de Gram, en número significativo, a partir de cada --- vial de bacterina. El resultado fue no se detectaron microorganismos diferentes a C. ovis en los 40 frotis elaborados a - partir de los cuatro viales.

En la Prueba de Esterilidad se introdujeron los medios de BHI (caldo y agar) y de Saboraud (caldo y agar) como modificaciones en lo descrito en el C.R.F. En este caso, el medio de BHI enriquecido con suero, tiene la ventaja adicional de favorecer el crecimiento de C. ovis: y el medio de Saboraud tiene una alta selectividad para el crecimiento de hongos (Cowan y Steel, 1979).

La Prueba de Seguridad se realizó en forma doble (con ratones y con cuyes), para asegurar la inactivación adecuada de la exotoxina remanente en la formulación del producto elaborado. El tiempo de almacenamiento después de la elaboración del producto también juega un papel importante de acuerdo con lo reportado por algunos autores (Hsu y Renshaw, 1985).

La Prueba de Antigenicidad se utilizó como alternativa de la Prueba de Potencia, debido a la dificultad económica para conseguir ovinos y caprinos, sujetos ideales para esta última prueba, puesto que ambos son muy susceptibles a la infección por C. ovis (Gillespie y Timoney, 1983). Por lo tanto, se plantearon las pruebas serológicas de aglutinación para determinar la capacidad del biológico experimental elaborado para introducir la formación de anticuerpos en los individuos vacunados. Por otra parte, se considera a este estudio como un ensayo preliminar para las evaluaciones de campo pertinentes.

Los resultados obtenidos en esta Prueba de Antigenicidad, en su parte cuantitativa, al ser sometidos a un análisis estadístico de varianza, mostraron ser altamente significativos. De acuerdo a esto, la bacterina posee una buena antigenicidad.

Es importante señalar que mientras que en la prueba cualitativa los sueros testigos no presentaron reacción aglutinante, en la prueba cuantitativa si hubo reacciones de aglutinación en dichos sueros (lo cual sin embargo, no influyó en la significancia estadística).

Es posible que en este caso se presentaran reacciones de autoaglutinación en el antígeno elaborado (lo cual está reportado para C. ovis, por Awad, 1960; Ellis, 1983 y Brown y Olander, 1987), aunque este inconveniente trató de aminorarse mediante la adición de Tween 20 a la fórmula de dicho antígeno.

Por lo tanto, es más probable que esas lecturas positivas débiles en los sueros testigo, se debieran a que ambos grupos de ratones (control y experimentales) convivieron, sino en contacto directo, sí muy cerca uno del otro; de esta forma, es factible la diseminación de partículas antigénicas entre las poblaciones de ratones estudiadas, con la subsiguiente formación de anticuerpos.

Los resultados aquí obtenidos, permiten la utilización del producto a nivel de laboratorio con una confiabilidad

aceptable, de acuerdo a lo reportado por Cameron et. al., ---
1972; Cameron y Fuls, 1973; Cameron y Buster, 1984 y Sean y -
Leamaster, 1987.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- De acuerdo a los criterios marcados en el presente estudio, es posible la elaboración de una bacterina experimental de C. ovis, con un nivel de confiabilidad que permita su utilización a nivel de laboratorio.
- 2.- En base a los resultados obtenidos en la Prueba de Antigencidad y su análisis estadístico, se afirma que la bacterina experimental elaborada tiene un nivel de antigencidad aceptable.
- 3.- El método de elaboración utilizado permite obtener con una cantidad relativamente pequeña de cultivo bacteriológico (Semilla de Producción), un volumen de biológico suficiente para 200 ovinos y/o caprinos, en condiciones de campo.
- 4.- Se propone una investigación a nivel campo con ovinos -- y/o caprinos utilizando la bacterina elaborada en este estudio, para avalar los resultados obtenidos en la Prueba de Antigencidad.

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

- ADEYEKE D., J. y SHANNON D. (1980). Mastitis in a cow caused by Corynebacterium pseudotuberculosis (C. ovis). Veterinary Record Núm. 106. pp. 207.
- ARBIZA A., S.I. (1979). Estado actual de la ovinocultura en México. Boletín de Rumiantes. Vol. 2.
- ARBIZA A., S.I. (1986). Producción de caprinos. 1a. Ed. --- A.G.T. Editor. pp. 551-554.
- ASHFAQ K., M. y CAMPBELL G., S. (1979). A survey of caseous-lymphadenitis and its etiology in goats in the U.S. - Veterinary Medicine Small Animal Clinician. pp. 1161----1165.
- AUGUSTINE L., J. y RENSHAW W., J. (1986). Survival of Corynebacterium pseudotuberculosis in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. American Journal of Veterinary Research Vol. 47. Núm. 4
- AWAD F., J. (1960). Serologic investigation of pseudotuberculosis in sheep: Agglutination test. American Journal of Veterinary Research. Vol. 21. pp. 251-253.
- AYERS L., J. (1977). Caseous lymphadenitis in goats & sheep: A review of diagnosis, pathogenesis & immunity. Journal of American Veterinary Medical Association. Vol. 171. - Núm. 12. pp. 1251-1254.

- BANDOPADHYAY C., M., CHATTOPADHYAY K., S. y PACHALAC V., S. -
(1972). Brain abscess in sheep. Indian Veterinary Journal. Vol. 49. Núm. 7. pp. 653-665.
- BEER, J. (1981). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 1a. Ed. Acribia. pp. 30-39.
- BLOOD D., C., RADOSTITS O., M. y HENDERSON J., A. (1987). Medicina veterinaria. 6a. Ed. Interamericana. pp. 556-567.
- BROGDEN A., K., CUTLIP C., R. y LEMKUHLE D., H. (1984) (a). --
Comparison of protection induced in lambs by Corynebacterium pseudotuberculosis whole cell & cell wall vaccines. American Journal of Veterinary Research. Vol. 45 Núm. -
11.
- BROGDEN A., K., CUTLIP C., R. y LEMKUHLE D., H. (1984) (b). --
Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis infection in lambs. American Journal of Veterinary Research. Vol. 45. Núm. 8. pp. 1532-1534.
- BROWN C., C. y OLANDER J., H. (1985). Serologic response and lesions in goats experimentally infected with Corynebacterium pseudotuberculosis of caprine & equine origins. - American Journal of Veterinary Research. Vol. 46. Núm. 11.
- BROWN C., C. y OLANDER J., H. (1987). Caseous lymphadenitis in goats & sheeps: A review. Veterinary Bulletin. Vol. - 57. Núm. 1.

- BURRELL H., D. (1978). Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of Corynebacterium ovis. Research in Veterinary Science. -- Núm. 24. pp. 269-276.
- BURRELL H., D. (1980) (a). A haemolysis inhibition test for detection of antibody to Corynebacterium ovis exotoxin. Research in Veterinary Science. Núm. 28. pp. 190-194.
- BURRELL H., D. (1980) (b). In vitro direct haemagglutination by Corynebacterium ovis exotoxin. Research in Veterinary Science. Núm. 28. pp. 190-194.
- CAMERON M., C. y BUCHAN, L. (1966). Identification of the protective and toxic antigens of Corynebacterium pseudotuberculosis. Onderstepoort Journal Veterinary Research. Vol. 33. pp. 39-48.
- CAMERON M., C. y SMIT C., M. (1970). Relationship of Corynebacterium pseudotuberculosis protoplasmatic toxins to the exotoxin. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. Vol. 37. Núm. 2. pp. 97-104.
- CAMERON M., C., MINNAR L., J., ENGELBRETCH M., N. y PURDOM R., M. (1972). Immune response of merino sheep to inactivated Corynebacterium pseudotuberculosis vaccine. Onderstepoort Journal Veterinary Research. Vol. 39. Núm. 1. pp. 11-24.

- CAMERON M., C. y FULS P., W. J. (1973). Studies on the enhancement of immunity to Corynebacterium pseudotuberculosis. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. Vol. 40. Núm. 3. pp. 105-114.
- CAMERON M., C. (1975). Effect of levamisole on immunity to Corynebacterium pseudotuberculosis in mice & sheep. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. Vol. 44. -- Núm. 1. pp. 47-48.
- CAMERON M., C. y BUSTER J., F. (1984). An improved Corynebacterium pseudotuberculosis vaccine for sheep. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. Vol. 51. pp. 263-267.
- CARTER R., G. (1985). Bacteriología y micología veterinaria. 2a. Ed. Manual Moderno. pp. 127-130.
- CLARK A., L. (Editor) (1987). Code of federal regulations -- (Title # 9, parts 1- 199): Animals & animal products. - Registro Federal. E.U.A. pp. 353-355; 384-387; 391; 393-394; 407; 416-417; 496.
- COWAN T., S. y STEEL J., K. (1979). Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. 1a. Ed. ---- C.E.C.S.A. pp. 217-220.
- DANIEL W., W. (1977). Bioestadística (Base para el análisis de las ciencias de la salud). 1a. Ed. Limusa. pp. 132-138; 155-158; 168-174.

- DAVIS, D. y DULBECCO, T. (1985). Tratado de microbiología. -
3a. Ed. Salvat. pp. 482-488.
- DESIDERIO V., J. y TURILLO A., L. (1979). Serum proteins of-
normal goats and goats with caseous lymphadenitis. Ame-
rican Journal of Veterinary Research. Vol. 40. Núm. 3.
- ELLIS A., J. (1983). Ovine caseous lymphadenitis. The com-
pendium of continuing education (article # 10). Vol. 5.
Núm. 9. pp. 504-510.
- FRAPPE M., R. C. (1981). Manual de infectología veterinaria.
1a. Ed. Fco. Méndez Oteo. pp. 217-220.
- FRASER M., C. (Editor) (1988). El manual Merck de Veterina-
ria. 3a. Ed. Merck & Co./Centrum. pp. 74-75.
- GARCIA V., S. E. y CIPRIAN C., A. (1986). Linfadenitis ca-
seosa (en Principales enfermedades de los ovinos y capri-
nos). 1a. Ed. P. Pijoan y J. Tórtora. pp. 235-239.
- GARG N., D. y CHANDIRAMAN K., N. (1984). Preliminary obser-
vations on the application of a enzyme-linked-immunosor-
bent-assay (ELISA) for the detection of Corynebacterium-
ovis antibodies. Indian Journal Animal Science. Vol. -
54. Núm. 10. pp. 965-968.
- GARG N., D., NAIN S., S. I. y CHANDIRAMAN K., N. (1984). Se-
roprevalence of Corynebacterium ovis agglutinins amongst-

- sheep & goats. Indian Journal Animal Science. Vol. 54.
Núm. 6. pp. 544-546.
- GILLESPIE J. H. y TIMONEY J., F. (1983). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4a. Ed. Prensa Médica Mexicana. pp. 213-216.
- HAFEZ E., E. S. (1979). Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. 1a. Ed. Lea & Febiger. pp. 244-257.
- HAMIR N., A. (1981). Corynebacterium pseudotuberculosis lesion in the heart of a sheep. Veterinary Record. Núm. 109. pp. 180.
- HARD C., G. (1970). Adoptive transfer of immunity in experimental Corynebacterium ovis infection. Journal of Comparative Pathology. Vol. 80. pp. 329-334.
- HARD C., G. (1975). Comparative toxic effect of the surface-lipid of Corynebacterium ovis on peritoneal macrophages. Infection & Immunity. Vol. 12. Núm. 6. pp. 1439-1449.
- HEDDEN A., U. y THOMAS M., C. (1986). Characterization of --lectin-binding lymphocytes in goats with caseous lymphadenitis. American Journal of Veterinary Research. Vol. 47. Núm. 6. pp. 1265-1267.

- HSU, T. S. (1984). Caseous lymphadenitis in small ruminants: clinical, pathological and immunological responses to Corynebacterium pseudotuberculosis and to fractions and toxins from the microorganism. Texas A & M University (Reporte). pp. 124.
- HSU T. S. y RENSHAW W., R. (1985). Corynebacterium pseudotuberculosis exotoxin: Fatal haemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. American Journal of Veterinary Research. Vol. 46. Núm. 5.
- HUSBAND J., A. y WATSON L., D. (1977). Immunological events in the popliteal lymph node of sheep following injection of live or killed Corynebacterium ovis into a efferent - popliteal lymphatic duct. Research in Veterinary Science. Núm. 22. pp. 105-112.
- JAWETZ, E. y MELNICK L., J. (1983). Microbiología Médica. - 10a. Ed. Manual Moderno. pp. 217-220.
- JOLLY D., R. (1965). The pathogenic action of the exotoxin of Corynebacterium ovis. Journal of Comparative Pathology. Vol. 75. pp. 417-431.
- JUBB F., K. V. y KENNEDY C., P. (1982). Patología de los animales domésticos. Tomo I. 1a. Ed. U.P.O.M.E. pp. 440---442.

- KIMBERLING V., C. (1988). Jensen & Swift's diseases of sheep.
3a. Ed. Lea & Febiger. pp. 374-377.
- LEAMASTER R., B. y SHEN T., D. (1987). Efficacy of Corynebacterium pseudotuberculosis bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. American Journal of Veterinary Research, Vol. 48. Núm. 5, pp. 869-872.
- LOVELL, R. y ZAKI M., M. (1966). Studies on growth products of Corynebacterium ovis. 1.- The exotoxin & it's lethal action on white mice. Research in Veterinary Science. - Vol. 7 pp. 302-306.
- LUND, A., TORBJORN, A., LARSEN H., J. y STEINE, T. (1982). -- Antibodies to Corynebacterium pseudotuberculosis in adult goats from a naturally infected herd. Acta Veterinaria Scandinavia. Núm. 23. pp. 473-482.
- LUND, A. y ALMLID, T. (1982). Colostrat transfer in the goat of antibodies against Corynebacterium Pseudotuberculosis and the antibodies status of kids during the first 10 month of life. Acta Veterinaria Scandinavia. Núm. 23.- pp. 483-489.
- MUCKLE C., A. y GYLES C., L. (1983). Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of Corynebacterium pseudotuberculosis in mice. American Journal of Veterinary Research. Vol. 44. Núm. 6. pp. 1149-1153.

- RAYA R., R. (1985). Consideraciones sobre el uso adecuado de los inmunógenos. Porcira. Núm. 47. pp. 35-40.
- RENSHAW W., H., GRAFF P., V. y GATES L., N. (1979). Visceral caseous lymphadenitis in a thin ewe syndrome: Isolation of Corynebacterium, Staphylococcus and Moraxella spp. -- from internal abscess in emaciated ewes. American Journal of Veterinary Research. Vol. 40. Núm. 8. pp. 1110-1114.
- SALAS L., J. U. (1988). Situación de la ovinocultura nacional (Conferencia). 1er. Simposium Internacional de Ovinocultura. 25-27 de abril. México, D.F.
- SCHEFLER C., W. (1981). Biostatística. 1a. Ed. Fondo Educativo Interamericano. pp. 122-127.
- SEARS M., P. (1985). Special Article: Bacterin preparation. - Infection & Immunity. pp. 395-397.
- SHIGIDI A., M. T. (1978). An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of Corynebacterium ovis infection in sheep. Research in Veterinary Science. Núm. 24. pp. 57-60.
- STOOPS G., S., RENSHAW W., H. y THILSTED P., J. (1984). Ovine caseous lymphadenitis: Disease prevalence, lesion distribution and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western U.S. American Journal of Veterinary Research. Vol. 45. Núm. 3.

- TASHJIAN J., J. y CAMPBELL S., G. (1983). Interaction between caprine macrophages and Corynebacterium pseudotuberculosis: An electron microscopy study. American Journal of Veterinary Research. Vol. 44. Núm. 4. pp. 69-693.
- TIZARD R., I. (1984). Inmunología veterinaria. 2a. Ed. Interamericana. pp. 3-6; 8; 10-18; 32-33; 46-48; 74; 101; 184-199; 200-203; 206-218.
- TORTORA P., J. L. (1988). Avances y perspectivas en el diagnóstico y profilaxis de las enfermedades de los ovinos - (Conferencia). 1er. Simposium Internacional de Ovinocultura. 25-27 de Abril. México, D.F.
- WILLIAMS F., C. S. (1980). Diferential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. Veterinary Medicine in Small Animals Clinician. pp. 1165-1170.
- WILLIAMS, H. (1985). Situación de la ovinocultura a nivel mundial. The Royal Veterinary College. London University (Reporte).
- WILLIAMSON, P. y NAIRN E., M. (1980). Lesions caused by Corynebacterium pseudotuberculosis in the scrotum of rams. - Australian Veterinary Journal. Vol. 56. pp. 496-498.

A P E N D I C E

A P E N D I C E

Conceptos y Procedimientos Generales para la Producción de Bacterinas. (Tomado de Clark, 1987).

a) Productos biológicos y términos relacionados.

- 1) **Producto biológico experimental:** Un producto de tipo biológico que está siendo evaluado para establecer una solicitud para una licencia de -- producto o permiso.
- 2) **Producto terminado:** Un producto biológico producido a granel de acuerdo con las disposiciones -- para formato final y composición.
- 3) **Producto finalizado:** Un producto biológico terminado que ha sido embotellado, sellado, empacado y etiquetado, de acuerdo a las disposiciones -- vigentes.
- 4) **Guía de producción:** Un protocolo detallado de procedimientos de elaboración a seguir en la preparación de un producto biológico y que en ocasiones puede ser referido como una guía.
- 5) **Fecha de cosecha:** A menos que se especifique otra cosa en la Guía de Producción oficial, la fecha

cha de cosecha es aquella en la que la sangre o tejidos fueron recolectados para la producción, o bien, la fecha en que los cultivos o microorganismos vivos fueron removidos de las incubadoras de producción.

b) Terminología de etiquetado.

- 1) Etiqueta: Todo material gráfico escrito o impreso.
- 2) Etiquetado: Toda etiqueta que acompañe al envase terminal o final.
- 3) Envase final: La unidad, botella, vial, frasco ampula, tubo u otro receptáculo en que cualquier producto biológico es depositado para su distribución y venta.
- 4) Nombre verdadero: El nombre declarado en la licencia de producto o permiso en el tiempo de emisión correspondiente, para diferenciar al producto biológico de otros, previendo que la parte principal del nombre debe ser enfatizada en cada licencia o permiso mediante la rotulación más prominente que los términos descriptivos que sean necesarios para completar la diferenciación.

- 5) Fecha de expiración: Una fecha que designe el final del período durante el cual el producto -- biológico, cuando fue adecuadamente almacenado y manejado, puede ser declarado con aceptable certeza, ser eficaz.

c) Terminología de pruebas.

- 1) Requerimientos estándar: Métodos de prueba, procedimientos y criterios establecidos por los Servicios Veterinarios para evaluar productos biológicos en cuanto a su pureza, seguridad, potencia y eficacia, así como en cuanto a no ser inservible, contaminando, peligroso o perjudicial por su uso.
- 2) Pureza o puro: Calidad de un producto biológico -- preparado en una forma final relativamente libre de microorganismos y materiales (orgánicos e inorgánicos) extraños, determinada por métodos de prueba o procedimientos establecidos -- por los Servicios Veterinarios en los requerimientos estándar, o en la Guía de producción -- aprobada para cada producto.
- 3) Seguridad o seguro: Libre de propiedades causales -- de reacciones indebidas de tipo local o sistémico

co cuando el producto es usado tal y como lo recomienda o sugiere el productor.

- 4) Esterilidad o estéril: Libre de microorganismos -- contaminantes viables, demostrable por los requerimientos estándar o aprobado por las Guías de Producción.
- 5) Potencia o potente: Poder relativo de un producto biológico determinado por métodos de prueba o procedimientos establecidos por los Servicios Veterinarios en los requerimientos estándar o en la Guía de Producción aprobada por cada producto.
- 6) Eficacia o eficaz: Capacidad específica o habilidad del producto biológico para dar el resultado para el que fue concebido cuando se usó bajo las recomendaciones del fabricante.
- 7) Dosis: La cantidad de un producto biológico recomendada en la etiqueta para darse a un animal en un tiempo determinado.
- 8) Vacunado: Un animal que ha sido inoculado, inyectado o se le ha administrado de otra forma un producto biológico para su evaluación.

- 9) **Animal control:** Un animal que ha sido referido como un control, usado en un procedimiento de prueba con propósito comparativo o para validar los resultados obtenidos.
- 10) **Día:** Tiempo transcurrido entre cualquier hora regular de trabajo de un día y cualquier otra hora regular de trabajo del siguiente día.
- 11) **Saludable (sano):** Aparentemente normal en todas sus funciones vitales y libre de signos de enfermedad.
- 12) **Reacciones desfavorables:** Todos aquellos cambios adversos que ocurrieron en los individuos saludables de un experimento, subsiguientes a la iniciación del mismo y manifestadas durante el periodo de observación prescrito en el protocolo de la prueba y que son atribuibles al producto biológico probado o bien a factores no relacionados a cada producto, determinados por el conductor individual responsable del experimento.

d) Microorganismos Semilla.

- 1) Semilla Maestra: Un microorganismo con un número - específico de pases que ha sido seleccionado y almacenado permanentemente por el productor y a partir del cual se derivan todos los otros - pases de semilla, dentro de los niveles permitidos.
- 2) Semilla de Trabajo: Un microorganismo con un nivel de pase entre la semilla maestra y la semilla de producción.
- 3) Semilla de Producción: Un microorganismo que tiene un nivel de pase específico y que se usa sin - otro (s) pase (s) más para iniciar la preparación de una fracción.

e) Requerimientos (procedimientos) estándar.

- 1) Detección de bacteria viable y hongos (excepto en - vacunas vivas).

Quando se usan líneas celulares, células primarias o ingredientes de origen animal en la preparación de un producto biológico, se requiere que éstos estén libres de bacterias viables u hongos.

- Medios de cultivo utilizados:

+ Medio fluido de tioglicolato con 0.5% de extracto de carne. Para probar la presencia de bacterias en productos biológicos que -- contengan toxoides clostridiales, bacteri--nas o toxoides-bacterinas.

++ Medio fluido de tioglicolato con o sin 0.5% de extracto de carne. Para probar la pre--sencia bacteriana en biológicos diferentes-- a los anteriores (sin subproductos clostri--diales).

+++Medio digerido de casefna y harina de soya.
Para probar crecimiento de hongos.

Se debe preveer que si los productos biológi--cos contienen preservativos mercuriales, el medio fluido de tioglicolato sin extracto de carne, debe ser sustituido.

- Procedimiento de la prueba:

Un mililitro de cada muestra de producto termi--nado debe ser colocada en cada medio preparado (un medio para cada muestra), considerando que si el contenido del producto terminado es infe--rior a 2 ml, se utilizará la mitad de dicho vo--lumen como muestra. En lotes grandes se debe-

probar un mínimo de 20 ml por lote de biológicos. La incubación se debe llevar a cabo por un periodo de 14 días a 30-35 grados centígrados para bacterias y 20-25 grados para hongos. Si el medio es turbio per se, se deben hacer subcultivos del 7o. al 11o. día (para bacterias), con un lote testigo, al menos por 14 días. Se debe examinar el contenido de todos los medios para crecimiento microbiano macroscópico durante todo el periodo de incubación. Cuando se demuestra que la prueba es invalidada por los controles, debe ser repetida.

- Parámetros de evaluación:

- + Si en ningún tubo hay crecimiento serial o subserial, llena los requisitos de la prueba.
- ++ Si hay crecimiento en cualquier tubo, se debe repetir esa prueba para descartar errores técnicos, con 20 muestras diferentes.
- +++ Si el crecimiento se detecta en cualquier tubo de la segunda prueba, el serial no llena los requisitos de la prueba.

2) Prueba de seguridad en ratones.

Se debe señalar que en algunos casos, algunos de los ingredientes inherentes al producto pueden ser letales o tóxicos para ratones, pero no para las especies para las que está destinado el producto.

Las muestras del recipiente final del producto terminado y/o finalizado (antisuecos y/o bacterinas) pueden ser probados aplicando 0.5 ml -- del producto a un mínimo de ocho ratones por -- vía intraperitoneal o subcutánea, observando a los animales por siete días.

Interpretación:

Si las reacciones desfavorables atribuibles al producto ocurren dentro del lapso considerado, el producto es insatisfactorio. Si ocurren -- reacciones desfavorables no atribuibles al producto, la prueba es inconcluyente y debe repetirse. De no ser así, se considera insatisfactorio al producto.

3) Prueba de seguridad en cuyes.

Cuando se prueban productos líquidos, cada --- muestra de producto terminado puede ser usada.

El procedimiento consiste en la inoculación de 2 ml a dos cuyes por vía subcutánea o intramuscular a dos cuyes, y se observan éstos por siete días. Las especificaciones de esta prueba son las mismas que para la prueba con ratones.

f) Productos bacterianos inactivados.

1) Bacterinas, toxoides, anacultivos y extractos bacterianos.

- Una bacterina debe ser una suspensión antigénica de microorganismos, representando un cultivo total o un concentrado del mismo, con o sin la evaluación de productos de crecimiento, y que ha sido inactivada y evaluada por los requerimientos estándar o la Guía de Producción correspondiente.
- Si el formaldehído en solución es utilizado como agente inactivador y el lote no ha sido satisfactorio en la prueba de actividad viricida, se debe evaluar la concentración de formaldehído residual libre, mediante la prueba de Fucsina Básica.
- El formol residual libre, de bacterinas sin componentes clostridiales, no debe exceder del 0.2% (740 ppm).

Formato para la elaboración de una Gufa de Producción para vacunas, bacterinas, antígenos y toxoides.

Se indica el número de licencia correspondiente, el nombre del producto elaborado y la fecha en un encabezado - que antecede a los siguientes puntos:

1) Composición, etc., del producto.

- Microorganismos utilizados, dando el aislamiento e historia de pases.
- Fuente y fecha de acceso al microorganismo.
- Cepas.
- Proporciones de cada cepa.

2) Cultivos.

- Descripción breve de métodos de identificación de cada microorganismo y la frecuencia con que dichos métodos son aplicados.
- Virulencia y pureza de cultivos y la determinación y manutención de los mismos. Rango de subcultivos y/o pases para ser usados en la producción.
- Tipo, tamaño, etc. de los recipientes para crecimiento.

- Condiciones de almacenamiento de la Semilla.
- Método para preparar suspensiones para crianza o inoculación en medio.
- Técnica de inoculación: Medio para Semilla; - medio para producción; título o concentración del inóculo, y el volumen de medio de cada medida y recipiente.
- Tiempo y condiciones de incubación para cada medio y microorganismo, temperatura.
- Carácter y cantidad de crecimiento, nota (s) - sobre contaminación.
- Método de atenuación (antes de propósitos de - producción).

3) Cosecha de microorganismos.

- Manejo y preparación de cultivos y medios, antes de remover los microorganismos o tejidos - para propósitos de producción.
- Tiempo mínimo y máximo transcurrido desde el momento de inoculación hasta la cosecha.
- Técnica de recolección del microorganismo para producción.

- Especificaciones para aceptar el material recolectado.
- Manejo del material descartado.
- Inclusión de cualquier información adicional pertinente.

4) Preparación del producto.

Se requiere describir totalmente y cada paso de la preparación, desde la cosecha de antígenos hasta la obtención del producto terminado en su envase final.

- Método de inactivación.
- Composición de preservativo, adyuvante y/o estabilizador, junto con la proporción de cada uno que permite utilizarlos; asimismo indicar estado físico y método de adición.
- Método y grado de concentración.
- Si el producto es estandarizado para dar una concentración de antígeno, indicar el método, mostrando cálculos.
- Ensamble de unidades para hacer un lote (con ejemplo); volumen de un lote promedio; volumen

de un lote máximo; cualquier otra información pertinente al respecto.

- Volumen de llenado de cada vial. Tipo de vial si éste no es usual.
- Método y técnica de envasado y sellado de recipientes finales.
- Deseccación, incluyendo control de humedad (dar el máximo %).
- Conteo del material antigénico por dosis en recipiente final.

5) Pruebas.

Indicar los estados en la preparación del biológico en que las muestras fueron recolectadas. Indicar todas las pruebas adicionales a los requerimientos estándar, con detalle y señalar los requisitos mínimos de cada prueba:

- Pureza.
- Seguridad.
- Potencia.
- Humedad (si el producto está desecado).
- Cualquier otra prueba.

6) Pasos post-preparatorios.

- Forma y tamaño de los recipientes finales en que el producto será distribuido.
- Colección, almacenamiento, y prueba de muestras representativas. Indicar en qué pasos fueron tomadas las muestras.
- Fecha de expiración, basada en los datos más recientes del cultivo, y fecha de la última prueba de potencia satisfactoria. Si es aplicable, fecha de liofilización.
- Uso, dosis y vía de administración para cada especie animal en la que el producto es recomendado.