



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA



LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS BIOVAR
OVIS OBTENIDOS DE LESIONES ABSCEDATIVAS
SUPERFICIALES EN CORDEROS DEL ESTADO DE
JALISCO, MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:
GUADALUPE FLORES PÉREZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE

ASESOR. DR. ROBERTO MONTES DE OCA JIMÉNEZ
COASESOR. DR SAÚL AGUILAR MONTES DE OCA

AMECAMECA DE JUAREZ, ESTADO DE MÉXICO. MAYO, 2023.

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS BIOVAR
OVIS OBTENIDOS DE LESIONES ABSCEDATIVAS
SUPERFICIALES EN CORDEROS DEL ESTADO DE
JALISCO, MÉXICO”**

ÍNDICE

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Características bioquímicas	3
2.2 Historia y taxonomía	5
2.3 Signos clínicos	7
2.4 Transmisión	8
2.5 Diagnóstico	8
2.5.1 Diagnóstico diferencial	9
2.5.2 PCR multiplex	12
2.6 Epidemiología	12
2.7 Factores de virulencia	13
2.8 Importancia económica	14
2.9 Tratamiento y vacunación	15
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VII. LÍMITE DE ESPACIO	24
VIII. LÍMITE DE TIEMPO	25
IX. RESULTADOS	26
X. DISCUSIÓN	31
XI. CONCLUSIONES	35
XII. SUGERENCIAS	36
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características bioquímicas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	4
Tabla 2.	Taxonomía, patogénesis y requerimientos de <i>Corynebacterium spp.</i>	6
Tabla 3.	Vacunas comerciales contra la Linfadenitis Caseosa	16
Tabla 4.	Oligonucleótidos utilizados para la identificación por PCR de los aislamientos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	23
Tabla 5.	Cronograma de actividades desarrolladas en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal.	25
Tabla 6.	Muestras de lesiones abscedativas superficiales en corderos del Estado de Jalisco, México; para la identificación microbiológica, bioquímica y PCR multiplex de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	26
Tabla 7.	Aislados obtenidos a partir de lesiones abscedativas superficiales en corderos del Estado de Jalisco, México; para la identificación bioquímica y variación de los genes en el PCR multiplex de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	29

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figuras 1. 1-A y 1-B;** **A.** Morfología de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, crecimiento de colonias en agar sangre. **B.** *Corynebacterium pseudotuberculosis* teñido con tinción de Gram con objetivo 100X. **27**
- Figuras 2. (A, B y C).** **A.** Catalasa positiva, presencia de burbujas. **B.** Urea positiva. **C.** Prueba de reducción de nitratos a nitritos negativa. **28**
- Figura 3.** Nivel de pureza de ADN de las muestras de abscesos en corderos. **28**
- Figura 4.** Identificación de PCR de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* (n=19). MW, marcador de peso molecular (Promega); segundo carril (control positivo *C. pseudotuberculosis* ATCC 43926); 16s +; *C. pseudotuberculosis rpoB+* y *C. pseudotuberculosis pld+*, tercer carril: muestra 2J, cuarto carril muestra 6J, quinto carril muestra 7J (San Juan de los lagos), sexto carril muestra 32J (Zapopan), séptimo 38-55J (Arandas) y último carril control negativo. **30**

RESUMEN

La linfadenitis caseosa ocasionada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* constituye una enfermedad persistente en las unidades de producción ovinas y caprinas en diversas regiones de México y del mundo. La importancia de la enfermedad radica en las pérdidas económicas que ocasiona en la producción de carne, lana y de pieles; además del potencial zoonótico en las personas vinculadas a la producción ovina y caprina. Los casos clínicos de linfadenitis ocurren fundamentalmente en animales adultos; sin embargo, recientemente se observan casos en animales jóvenes. La presente tesis tiene como objetivo realizar la caracterización molecular de *C. pseudotuberculosis* a partir de aislamientos provenientes de casos clínicos de linfadenitis caseosa en corderos del estado de Jalisco, México. Se aisló e identificó a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* en las 19 muestras de lesiones abscedativas de corderos. El 68.4% de los corderos con lesiones abscedativas presentaron condición corporal de 2.5. El tipo de exudado caseoso fue el que predominó (73.7%) y el linfonodo retrofaríngeo fue el más afectado (52.7%). Hubo una correlación del 100% entre las pruebas bioquímicas y PCR multiplex para la identificación de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

PALABRAS CLAVE: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, linfadenitis caseosa, corderos, ovinos, PCR.

ABSTRACT

Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar *ovis* is a persistent disease in sheep and goat production units in various regions of Mexico and the world. The importance of the disease lies in the economic losses it causes in the production of meat, wool and skins; in addition to the zoonotic potential in people linked to sheep and goat production. Clinical cases of lymphadenitis occur mainly in adult animals; however, cases have recently been observed in young animals. The objective of this thesis is to carry out the molecular characterization of *C. pseudotuberculosis* from isolated clinical cases of caseous lymphadenitis in lambs from the state of Jalisco, Mexico. *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* was isolated and identified in the 19 abscessive lesion samples from lambs. Close to 68.4% of the lambs with abscessive lesions presented a body condition score of 2.5. The type of seropurulent exudate was the one that predominated (73.7%) and the retropharyngeal lymph node was the most affected (52.7%). There was a 100% correlation between biochemical tests and multiplex PCR for the identification of *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

KEYWORDS: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caseous lymphadenitis, lambs, Sheep, PCR.

I. INTRODUCCIÓN

En México las unidades de producción ovinas y caprinas se ven afectadas por diversas enfermedades que limitan la eficiencia productiva; dentro de éstas, linfadenitis caseosa causada por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) biovar *ovis* provoca abscesos en linfonodos subcutáneos y/o viscerales (Mahmood *et al.*, 2015).

Linfadenitis caseosa (LCA), causa daños a la ganadería a nivel mundial, con pérdidas de rendimiento en el rebaño, con menor ganancia de peso y decomiso de vísceras afectadas (Windsor, 2011), disminución de la producción de lana (Paton *et al.*, 1994), carne (Collet *et al.*, 1994) y leche (Schreuder *et al.*, 1990), así como desórdenes reproductivos (Odhah *et al.*, 2017; Faeza *et al.*, 2019). *C. pseudotuberculosis* tiene un impacto económico que afecta principalmente a los pequeños rumiantes (Windsor, 2011; Smith, 2015) y es considerado un microorganismo patógeno de importancia zoonótica (Bastos *et al.*, 2012; Burkovski, 2018).

C. pseudotuberculosis es un agente de distribución mundial; sin embargo, es una enfermedad poco notificada. Se identifican como factores de riesgo para la presentación de LCA, el tipo de explotación, los protocolos de manejo y control establecidos en las unidades de producción (Paton *et al.*, 1996).

Se ha reportado la prevalencia de LCA en Oceanía, en Australia (Windsor, 2014) y Nueva Zelanda (Valero *et al.*, 1992); en Europa, en Francia (Pepin *et al.*, 1988), Reino Unido (Ruiz *et al.*, 2007); Asia, en China (Gao *et al.*, 2018); y América, en países como Argentina (González *et al.*, 1991), Brasil (de Farias *et al.*, 2019), Canadá (Debien *et al.*, 2013), Estados Unidos (Williamson, 2001), Paraguay (Szwako *et al.*, 2014) y Venezuela (Delgado *et al.*, 2015).

En México, se ha descrito LCA con una prevalencia del 1.75 % en los municipios de Mapimí y 4.69 % en el municipio de Tlahualilo, en el estado de Durango (Carrillo *et al.*, 2005). En el estado de México en el municipio de Xalatlaco, se encontró que el 5.4% de los exudados nasales de ovejas analizadas presentaron *Corynebacterium spp.* (Ochoa *et al.*, 1996). En el 2015 se realizó la identificación de 57 aislamientos

de *C. pseudotuberculosis* de un total de 160 muestras procedentes del Estado de Jalisco. Las cepas se identificaron mediante bacteriología miniaturizada API Coryne, pruebas bioquímicas y PCR, obteniéndose una frecuencia del 33% (Varela *et al.*, 2018).

En la actualidad, el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* se puede realizar mediante diferentes métodos, como el aislamiento bacteriológico a partir de medios de cultivo convencionales, la identificación mediante pruebas bioquímicas para el establecimiento del perfil enzimático y la capacidad para utilizar diversas fuentes de carbohidratos. También a través de técnicas serológicas para la detección de anticuerpos específicos anti-exotoxina PLD (Osman *et al.*, 2018), mediante la prueba de ELISA (Menzies *et al.*, 2004), y la técnica molecular de PCR multiplex que proporciona una herramienta confiable, eficaz y rápida para identificar a *C. pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.*, 2007). Recientemente se estableció un PCR Quadruplex, donde se amplifican segmentos de los genes *ARN16S*, *rpoB*, *pld* y un segmento del gen *narG* (nitrato reductasa), que permite la diferenciación entre las cepas biovar *equi* y biovar *ovis* (Almeida *et al.*, 2017).

En México se han realizado varios estudios sobre linfadenitis caseosa especialmente en ovinos y caprinos. La enfermedad clínica se presenta principalmente en animales adultos; sin embargo, recientemente se ha reportado la presencia de abscesos subcutáneos en corderos. Por esta razón, se propone realizar la caracterización mediante el uso de pruebas bacteriológicas y PCR de *C. pseudotuberculosis* a partir de cuadros clínicos en corderos de unidades de producción del estado de Jalisco, México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

C. pseudotuberculosis es una bacteria patógena, intracelular y altamente contagiosa, causando una variedad de enfermedades como linfadenitis en caballos, linfangitis ulcerativa en bovinos (Baird & Fontaine, 2007), linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos (Ruiz *et al.*, 2011; Varela *et al.*, 2018), así también afecta a antílopes (Clark *et al.*, 1972), camellos (Tejedor *et al.*, 2004), dromedarios (Tejedor *et al.*, 2000), alpacas (Sprake & Gold, 2012), llamas (Lopes *et al.*, 2012) y cerdos (Oliveira *et al.*, 2014). En animales en vida silvestre se ha reportado en berrendos (Clark *et al.*, 1972), alces (Kelly *et al.*, 2012), órix árabe (Tarello & Theneyan, 2008) y ocasionalmente causa linfadenitis en humanos (Join-Lambert *et al.*, 2006).

Por su capacidad de reducción de nitratos, *C. pseudotuberculosis* ha sido clasificada en dos biovares, *ovis* y *equi*. Cepas aisladas de ovinos y caprinos, que usualmente son nitrato reductasa negativo han sido clasificadas como biovar *ovis*; mientras que cepas aisladas de equinos y bovinos que usualmente son nitrato reductasa positiva han sido clasificadas como biovar *equi* (Oliveira *et al.*, 2016).

2.1 Características bioquímicas

C. pseudotuberculosis es un patógeno intracelular facultativo que presenta formas pleomórficas, tales como cocoide y de bacilo filamentoso (Paton *et al.*, 1994), varía de tamaño de 0,5 µm a 0,6 µm de amplitud y 1,0 µm a 3,0 µm de longitud, presenta buen crecimiento a 37°C a un pH de 7,0 a 7,2. Tiene la capacidad de crecer en anaerobiosis, no forma esporas, no tiene cápsula y es no móvil; sin embargo, si tiene fimbrias.

Cuando se emplea el medio agar sangre el crecimiento a las 24 horas es limitado con formación de colonias pequeñas de color blanco. Posteriormente a las 48-72h de incubación el crecimiento es abundante con formación de colonias más grandes, que toman una coloración blanca grisácea, las colonias son secas, quebradizas y

se puede visualizar la hemólisis. En medio líquido se observa el desarrollo de un depósito granular en el fondo, mientras que en la superficie se observa la formación de una película (Dorella *et al.*, 2006).

Las reacciones bioquímicas de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* varían considerablemente, principalmente en su habilidad fermentadora. Todas las cepas producen ácido, pero no gas a partir de diferentes fuentes de carbono, incluyendo glucosa, fructosa, maltosa, manosa y sucrosa. La bacteria es fosfolipasa D y catalasa positiva, oxidasa negativa y es β -hemolítica.

Tabla 1. Características bioquímicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Carbohidrato	Reacción	Hidrólisis	Reacción
Glucosa	+	Esculina	-
Arabinosa	Variable	Hipurato	-
Xilosa	-	Urea	+
Ramnosa	-	Tirosina	-
Fructosa	+	Caseína	-
Galactosa	+	Fosfatasa	+
Manosa	+	Pirazinamidasas	-
Lactosa	-	Rojo de metilo	+
Maltosa	+	Reducción de nitrato	Variable
Sacarosa	Variable	Catalasa	+
Trehalosa	-	Oxidasa	-
Rafinosa	-	Lipofilismo	-
Salicina	-		
Dextrina	Variable		
Almidón	-		

Tomado y modificado de (Dorella *et al.*, 2006).

2.2 Historia y Taxonomía

En 1888 el bacteriólogo francés Edward Nocard aisló un microorganismo inusual a partir de un caso de linfangitis en una vaca. Tres años después el bacteriólogo búlgaro Hugo von Preïsz identificó una bacteria similar a partir de abscesos renales en ovejas. Como resultado de estos descubrimientos relacionados, al microorganismo se le denominó bacillo de “Preïsz-Nocard”. A partir de ahí se le otorgó el nombre de *Bacillus pseudotuberculosis*.

En la primera edición del Manual Bergey de 1923 el organismo se colocó en el género *Corynebacterium* que había sido creado originalmente como una categoría para el patógeno humano *C. diphtheriae*, y fue renombrado como *C. ovis*; sin embargo, al observar que este patógeno se aislaba de lesiones purulentas de otras especies se decidió nuevamente cambiarlo a su nombre original, quedando la nomenclatura de *C. pseudotuberculosis* en 1948 hasta la fecha (Brown & Olander, 1987; Baird & Fontaine, 2007).

Actualmente, *C. pseudotuberculosis* pertenece al phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Corynebacteriaceae*, género *Corynebacterium* (Stackebrandt *et al.*, 1997; Von graevenitz & Bernard, 2006; Bernard & Funke, 2012).

El género *Corynebacterium* abarca un número diverso de especies y cepas de relevancia biotecnológica, veterinaria y médica. Actualmente incluye más de 110 especies (Tabla 2) (Oliveira *et al.*, 2017). El género *Corynebacterium* en conjunto con *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* conforman el grupo de bacterias CMNR, los cuales comparten algunas características en común, como la organización de la pared celular, compuesta principalmente por peptidoglicanos, arabinogalactanos, ácidos micólicos, y una proporción de guanina y citocina en el genoma (G + C = 47 – 74%) (Dorella *et al.*, 2006; de Sá *et al.*, 2011). El agente es destruido rápidamente por los rayos del sol y a temperaturas de 58°C por 10 minutos, así también con los desinfectantes de uso habitual. *C. pseudotuberculosis* puede sobrevivir hasta 8 meses en el suelo y en fómites de corrales como

superficies de madera, paja y heno por una, tres y ocho semanas respectivamente en condiciones húmedas y frías (Tadich *et al.*, 2005).

Tabla 2. Taxonomía, patogénesis y requerimientos de *Corynebacterium spp.*

Taxonomía	Patogénesis	Requerimientos de oxígeno
<i>C. accolens</i>	Osteomielitis pélvica, mastitis granulomatosa	Facultativo
<i>C. amycolatum</i>	Endocarditis, sepsis	Aeróbico
<i>C. bovis</i>	Hiperqueratosis, mastitis	Aeróbico
<i>C. callunae</i>	No patogénico, producción de aminoácido	Aeróbico
<i>C. casei</i>	No patogénico, producción de alimentos	Facultativo
<i>C. diphtheriae</i>	Difteria	Aeróbico
<i>C. freneyi</i>	Bacteremia	Anaeróbico
<i>C. glutamicum</i>	No patogénico, producción de alimentos y aminoácidos	Facultativo
<i>C. jeikeium</i>	Infecciones nosocomiales	Facultativo
<i>C. mastitidis</i>	Mastitis subclínica	
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Linfadenitis caseosa	Facultativo
<i>C. pyruviciproducens</i>	No patogénico, producción de ovoalbúmina y ácido pirúvico	Facultativo
<i>C. renale</i>	Cistitis, pielonefritis	Facultativo
<i>C. ulcerans</i>	Difteria faríngea	

Tomado y modificado de (Oliveira *et al.*, 2017)

2.3 Signos clínicos

La LCA se presenta en dos formas, una de ellas externa, también conocida como superficial o cutánea que se caracteriza por la formación de piogranulomas en los linfonodos superficiales palpables o en tejido subcutáneo, como son el retrofaríngeo, parotídeo, submandibular, preescapular, precrural testicular o linfonodos mamarios. Los abscesos son redondos, con cápsula fibrosa e inflamación, pérdida de pelo en la zona lesionada y la ruptura de estos conlleva a la liberación del contenido purulento. En la manifestación visceral, tiene lugar la formación de múltiples abscesos en linfonodos internos, así como en pulmones, hígado y riñones, causando deterioro en la condición orgánica del animal hacia el desarrollo de un curso crónico. En algunos casos clínicos los linfonodos internos necróticos encapsulados pueden ser compatibles con un desarrollo “aparentemente normal” asintomático (Odhah *et al.*, 2017; Odhah *et al.*, 2019).

Es posible que en un animal se observen ambas presentaciones clínicas, aunque es una enfermedad común en los rebaños de ovinos y caprinos, suele pasar desapercibida debido a la falta de signos clínicos aparentes en la forma visceral. Esta causa un síndrome de desgaste crónico que suele llamarse “síndrome de la oveja flaca” que causan el deterioro en la condición orgánica del animal hacia estados caquéticos (Estevao *et al.*, 2007).

El biovar *ovis* afecta principalmente a ovejas y cabras, causando abscesos superficiales y viscerales, mientras que el biovar *equi* infecta principalmente a caballos causando linfangitis ulcerante de las extremidades distales, abscesos ventrales del tórax, abdomen, y forunculosis (Connor *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 2007).

Se han hecho experimentos en caprinos, en el cual inocularon por vía intravenosa 1 millón de UFC de una cepa de *C. pseudotuberculosis* aislada de una cabra, en la cual se presentaron signos en los animales como fiebre, reacción inflamatoria, dificultad para respirar, anorexia, atonía ruminal. Así también en la inspección *post mortem* se mostraron abscesos en pulmones, riñones e hígado (Holstad *et al.*, 1988).

Otros autores realizaron un estudio histopatológico en ovejas infectadas con ácidos corynomicólicos, donde se observó la formación de lesiones como congestión, degeneración y necrosis en los órganos reproductivos (Jesse *et al.*, 2020). Estos ácidos corynomicólicos son uno de los factores de virulencia externos más estudiados y constituyen la primera barrera de protección que presenta la bacteria (Burkoski, 2013). Además, provoca lesiones dermo-necróticas y, en dosis más altas, es letal para varias especies diferentes de animales domésticos y de laboratorio (Egen *et al.*, 1989; Songer *et al.*, 1997). Debido a la función de los genes relacionados con la patogenicidad en el genoma de *C. pseudotuberculosis*, la caracterización de estas secuencias genéticas relacionadas con la enfermedad es de vital importancia (Araújo *et al.*, 2020).

2.4 Transmisión

Los animales infectados con LCA en su forma superficial pueden diseminar el patógeno al ambiente a través de la ruptura o fistulación de los abscesos y llegar a otras ovejas y cabras principalmente por la contaminación de heridas superficiales (Aleman & Spier, 2001). La infección comienza con el ingreso de la bacteria a través de lesiones generadas en el manejo de los animales, como la esquila y en menor medida cortes de cola, marcaje y castraciones (Cheuquepan *et al.*, 2008). El microorganismo se propaga rápidamente a los linfonodos en donde se desarrollan piogranulomas microscópicos que aumentan de tamaño y forman abscesos (Baird & Fontaine, 2007).

Aunque *C. pseudotuberculosis* no puede replicarse en el ambiente, tiene la capacidad de sobrevivir durante varias semanas en él, de este modo mediante el alimento contaminado, las condiciones de humedad y las bajas temperaturas, contribuyen para que este microorganismo tenga la posibilidad de propagarse dentro de un rebaño (Augustine & Renshaw, 1986; Rizvi *et al.*, 1997).

2.5 Diagnóstico

Para llegar al diagnóstico de la enfermedad es importante llevar a cabo el examen externo general del animal afectado, considerando la anamnesis. La forma más

sencilla de diagnosticar la presencia de LCA en un rebaño, es el examen *post mortem* (Pinochet, 1992).

Es fundamental conocer la historia clínica, así como la observación del hato para poder entender el comportamiento de los animales en grupo, posteriormente el examen físico que incluye palpación de linfonodos superficiales aumentados de tamaño, las características macroscópicas de los exudados, signos clínicos como fiebre o pérdida de peso, y datos epidemiológicos como la prevalencia local, la edad, sexo, raza del ovino (Estevao *et al.*, 2006).

2.5.1 Diagnóstico diferencial

En primer lugar se sospecha de *C. pseudotuberculosis* cuando se visualizan animales con un adelgazamiento progresivo que tiende a la cronicidad o se observan abscesos cutáneos en linfonodos; sin embargo, se debe considerar que pueden ser ocasionadas por diferentes especies de microorganismos patógenos, como *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Actinobacillus lignieresis*, *Arcanobacterium pyogenes* y *S. aureus* entre otros, aunque *C. pseudotuberculosis* se destaca por su mayor frecuencia en ovinos y caprinos (Gascoigne *et al.*, 2020).

En cuanto a causas no ocasionadas por agentes patógenos esta la formación de mucocele que es menos común en ovinos, pero puede ser relevante cabras. Otros diferenciales incluyen trauma, hematomas o quistes dérmicos (Gascoigne *et al.*, 2020).

Para el aislamiento del microorganismo se requiere la siembra de las muestras a evaluar en medios de cultivos como agar sangre para la obtención de colonias aisladas y puras. El crecimiento de la bacteria en agar sangre de 24 a 48 horas permite la formación de colonias pequeñas alcanzando 3 mm de diámetro, blancas, secas y rodeadas de una β -hemólisis tenue (Bastos *et al.*, 2012). La observación de la bacteria mediante la técnica de tinción de Gram y Ziehl Neelsen se realiza para el diagnóstico diferencial entre bacilos ácido alcohol resistentes (Chirino *et al.*, 2006). En la tinción de Gram se pueden reconocer formas cocobacilares de color

violeta, para una clasificación de la bacteria como Gram positiva (Literák *et al.*, 1999; Chirino *et al.*, 2006). Posteriormente se realiza la identificación de *C. pseudotuberculosis* mediante pruebas bioquímicas convencionales (Dorella *et al.*, 2006; D´Afonseca *et al.*, 2008).

Otras pruebas son las inmunoenzimáticas como la ELISA, que utilizan como antígeno cultivos bacterianos, toxinas y proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis*, como la fosfolipasa D corinebacterial (PLD) (Dercksen *et al.*, 2000; Binns *et al.*, 2007), son empleados en los programas de control y erradicación de la LCA. Existen varios trabajos que evalúan la sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto, muchos de estos son protocolos estandarizados en sus laboratorios por lo cual los valores pueden variar. Por ejemplo, en una investigación se encontró una sensibilidad de 96.6% y una especificidad de 98.4% empleando proteínas recombinantes (PLD y CP49) (Barral *et al.*, 2019). Los resultados positivos de la prueba de ELISA deben ser interpretados como exposición a la toxina, ya que puede indicar infección activa.

Los anticuerpos frente a la toxina comienzan a detectarse a partir de la cuarta semana post-infección alcanzando un pico máximo en la decimoséptima semana y perdurando por lo menos veintisiete semanas (Belchior *et al.*, 2006). Los títulos de anticuerpos calostrales usualmente desaparecen entre los 3 a 6 meses de edad, por lo cual, las pruebas serológicas en animales menores a 6 meses deben ser interpretadas con precaución (Aiello & Mays, 2000).

Otra técnica para detectar LCA es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y constituye una alternativa en comparación con los métodos de diagnóstico convencionales, con la ventaja de ser más rápida y específica (Çetinkaya *et al.*, 2002). La PCR multiplex basada en la amplificación de los genes *16S rRNA*, *rpoB* y *pld*, tiene una sensibilidad diagnóstica del 94.6% para aislamientos de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.*, 2007). El *16S rDNA* como secuencia codificante de la subunidad RNA ribosomal *16S*, se ha utilizado en ensayos previos tanto para el diagnóstico como para el análisis filogenético del género *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2005).

El gen 16S rRNA es el componente de la subunidad menor (30s) de los ribosomas procariotas, y permite la unión de la secuencia líder de los ARNm (secuencia de Shine-Dalgarno) para el inicio de la traducción de los genes. La secuencia de este gen se encuentra altamente conservada y presenta bajas tasas de evolución, se utiliza para la reconstrucción de filogenia. El uso de este gen ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Cetinkaya *et al.*, 2002). Este gen permite diferenciar a *C. diphtheriae* de *C. pseudotuberculosis* presentando una similitud en un 97.8%, lo que indica que estas especies tienen una estrecha relación, pero son diferentes (Pascual *et al.*, 1995).

El gen *rpoB* corresponde a la subunidad β de la RNA polimerasa, y su secuencia codificante se ha utilizado para estudios filogenéticos de algunos géneros bacterianos (Dorella *et al.*, 2006; D´Afonseca *et al.*, 2008). A través de su secuencia también se han identificado especies del género *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2004; Khamis *et al.*, 2005). El gen *rpoB* codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa (Khamis *et al.*, 2004) y la amplificación de un fragmento de 434 a 452 pb permite la identificación a nivel de especie ya que presenta un elevado polimorfismo. El mayor grado de semejanza de esta secuencia parcial entre dos especies ha sido de 95,9% frente a un 99,7% de la secuencia completa de 16S RNAr (Khamis *et al.*, 2005).

El gen *pld* es un blanco de amplificación en ensayos de PCR para discriminar entre aislados de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, especies genotípicamente muy relacionadas (Pacheco *et al.*, 2007). Además, la PCR basada en genes *pld* es más fiable que las basadas en genes *rpoB* para el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* (Nabih *et al.*, 2018).

Cada técnica tiene sus ventajas y desventajas; por ejemplo, aunque el estándar de oro para el aislamiento de LCA es el aislamiento del agente causal a partir de los abscesos no siempre es posible recolectar las muestras ya que sólo se pueden recolectar cuando se trata de la presentación clínica cutánea, de igual manera, el

PCR puede verse afectado por enzimas u otros materiales que puedan alterar la reacción o degradar el ADN (Barral *et al.*, 2019).

2.5.2 PCR Multiplex

Se desarrolló un ensayo de PCR multiplex (mPCR) hecho por (Pacheco *et al.*, 2007) dirigido a tres genes de *C. pseudotuberculosis*: el gen *16S rRNA*, *rpoB* y *pld*. Este método ha permitido la identificación eficiente del aislamiento de esta bacteria que había sido reconocida previamente mediante pruebas bioquímicas.

Esta mPCR permitió la identificación específica de aislados de *C. pseudotuberculosis* en cultivo y la detección directa en muestras de pus de animales afectados por LCA.

2.6. Epidemiología

Linfadenitis caseosa está presente en la mayoría de las zonas geográficas definidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE); sin embargo, es poco comunicada y la prevalencia en pequeños rumiantes es subestimada debido a la falta de notificación en muchos países (Ivanović *et al.*, 2009). La diseminación de este patógeno en todo el mundo probablemente se produjo a través de la importación de animales infectados (Baird & Fontaine, 2007). *C. pseudotuberculosis* ha sido identificada en grandes criaderos de ovejas y cabras en diferentes países del mundo como Argelia (Chikhaoui & Khoudja, 2013), Argentina (Gallardo *et al.*, 2019), Australia (Windsor, 2014), Brasil (Oliveira *et al.*, 2016), Canadá (Corbeil *et al.*, 2016), Chile (Tadich *et al.*, 2005), China (Zhou *et al.*, 2016), Egipto (Al-Gaabary *et al.*, 2009), España (Chávez *et al.*, 2016), Estados Unidos (Sprake & Gold, 2012), Hungría (Sellyei *et al.*, 2017), Israel (Yeruham *et al.*, 2003), Japón (Chikamatsu *et al.*, 1989), Nueva Zelanda (Valero *et al.*, 1992), Paraguay (Szwako *et al.*, 2014), Reino Unido (Connor *et al.*, 2000), Sudáfrica (Hassan *et al.*, 2012), Turquía (Ilhan, 2013) y Venezuela (Primera *et al.*, 2016), siendo la LCA una de las enfermedades que más afecta a las unidades de producción ovina y caprina.

Existen evidencias de LCA y su prevalencia en México en los estados de Durango (Carrillo *et al.*, 2005), en municipios de Mapimí y Tlahualilo, en Jalisco (Guerrero *et*

al., 2018) en municipios como Zapotlanejo, Zapopan, Tlaquepaque, Tepatitlán, Acatic y Tlajomulco, así como también en el estado de México (Ochoa *et al.*, 1996) hallaron que el 5,4% de los exudados nasales que analizaron en ovejas trashumantes en Xalatlaco presentaron *Corynebacterium* spp., así como (Barrientos *et al.*, 1996) en ese mismo país aislaron *C. pseudotuberculosis* en el 65% de los casos que estudiaron con lesiones en los linfonodos (Songer *et al.*, 1988).

La propagación de *C. pseudotuberculosis* a otros países resalta la importancia de mejorar la comprensión de esta bacteria (Parise *et al.*, 2018). La frecuencia de presentación de la enfermedad en cada región o país depende principalmente del tipo de unidad de producción. La infección es más frecuente en países tropicales y subtropicales. La prevalencia es menor en animales de sistemas de producción extensivos, a diferencia del sistema intensivo donde la infección se manifiesta desde edades tempranas (Fontaine & Baird, 2008).

En México se ha encontrado en diferentes especies, por ejemplo, recientemente se encontró *C. pseudotuberculosis* biovar *equi* en equinos de nuestro país con abscesos musculares (Muñoz-Bucio *et al.*, 2017). Mientras que (Varela *et al.*, 2018) reportaron la identificación de 57 aislamientos mediante pruebas bacteriológicas y la amplificación de genes *16S rRNA*, así como genes involucrados en virulencia y patogenicidad: *Fag B*, *Fag C*, *Fag D* y *hsp60*.

Se han estudiado algunas cepas de *C. pseudotuberculosis* como la cepa MEX1 (NZ_CP017711.1) aislada en la región de Tlaxcala y la cepa MEX29 (NZ_CP016826.1) en de Río Frío de Juárez, estado de México. Por otra parte, la cepa MEX25 (NZ_CP013697.1) y MEX9 (NZ_CP014543.1) en la región de Guanajuato (Parise *et al.*, 2018).

2.7 Factores de virulencia

Los estudios realizados se han centrado principalmente en tres factores de virulencia conocidos e identificados como fosfolipasa D (PLD), ácidos corymícolicos y operón Fag ABCD.

La fosfolipasa D (Songer, 1997; Sá *et al.*, 2013), exotoxina PLD que cataliza la disociación de la esfingomielina y el aumento de la permeabilidad vascular. Esto da como resultado la propagación (Hodgson *et al.*, 1994; Corrêa *et al.*, 2018) y supervivencia de *C. pseudotuberculosis* dentro de las células del hospedero (Baird and Fontaine, 2007). Aunque no se ha observado que la exotoxina PLD sea directamente hemolítica, se ha visto que es capaz de producir hemólisis sinérgica (Gyles *et al.*, 2008). Se ha informado que la expresión de PLD puede verse afectada por factores ambientales como la temperatura, el pH y la osmolaridad (Ruiz *et al.*, 2011). Además, la resistencia a diversos cambios ambientales puede estar asociada a la capacidad de supervivencia y persistencia de las bacterias patógenas en el hospedero (Pinto *et al.*, 2014).

Los ácidos corynomicólicos, son moléculas que forman parte de la estructura de la pared celular (Ruiz *et al.*, 2011). La estructura lipídica formada por los ácidos corynomicólicos actúa como una barrera, con permeabilidad selectiva, mediada por proteínas integrales de membranas llamadas porinas (Schiffler *et al.*, 2007).

Por último, el operón Fag ABCD, que codifica para una proteína de membrana integral (FagA), un transportador de enterobactina de hierro (FagB), la proteína de la membrana citoplasmática que se une a ATP (FagC) y la proteína de unión (FagD), que participan en la absorción de hierro (Sá *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018).

La alta prevalencia de *C. pseudotuberculosis* en ovejas y cabras ha hecho que los estudios sobre las formas de detectar sus factores de virulencia sean cada vez más importantes. Los avances en genómica han permitido el descubrimiento de nuevos genes, especialmente los relacionados con la patogenicidad y el estilo de vida del microorganismo.

2.8 Importancia económica

Las principales pérdidas económicas atribuidas a la infección por *C. pseudotuberculosis* generan un impacto negativo en la producción de lana, leche, así como también disminución del peso y rendimiento reproductivo del animal, a nivel de rastro causa decomiso de carcasas y vísceras (Belchior *et al.*, 2009); de

igual modo la reducción del valor de las pieles debido a las cicatrices, el costo de los medicamentos y mano de obra necesarios para tratar la enfermedad (Carrillo *et al.*, 2005, Sá *et al.*, 2011). Linfadenitis caseosa es una enfermedad que causa pérdidas financieras en la producción ovina principalmente en países que tienen una gran producción de esta especie, como lo son Australia (Stanford *et al.*, 1998) con pérdida en la producción de lana de 17 millones de dólares (Patón *et al.*, 1994), Nueva Zelanda (Valero *et al.*, 1992, Estados Unidos (Williamson *et al.*, 2001), Canadá (Patón *et al.*, 1994), Brasil (de Farias *et al.*, 2019), España (Villalonga, 2013), Reino unido (Gascoigne *et al.*, 2020).

Aunque se sabe que LCA afecta la industria ovina y caprina, no hay muchos estudios donde se analice con detalle las pérdidas económicas ocasionadas (Baird and Fontaine 2007; Gascoigne *et al.* 2020).

2.9 Tratamiento y vacunación

Aunque se sabe que *C. pseudotuberculosis* en general es sensible a diferentes antibióticos incluyendo la penicilina, el hecho de que forme abscesos hace difícil que el fármaco pueda penetrar para eliminar al microorganismo, además de sumarle los costos para tratar a un rebaño completo hace que el tratamiento antimicrobiano sea prohibitivo. En un estudio se realizó el tratamiento a varios ovinos drenando los abscesos y aplicando rifamicina y oxitetraciclina durante un periodo de 10 días mejorando las lesiones macroscópicas pero la eliminación del microorganismo no fue demostrada (Senturk & Temizel, 2006).

En cuanto a las vacunas que existen comercialmente para tratar esta enfermedad existen varias disponibles en algunos países, la mayoría de estas esta formulada como toxoides y tienen la proteína PLD inactivada en asociación con antígenos contra patógenos de género *Clostridium* (de Pinho *et al.*, 2021) (Tabla 3).

Tabla 3. Vacunas comerciales contra la Linfadenitis caseosa

Nombre comercial	Empresa	Uso en/País	Composición
Glanvac®3	Zoetis	Ovinos y cabras / Sudáfrica	Toxoide CP‡ asociado con 2 toxoides clostridiales
Glanvac®6	Zoetis	Ovinos / Nueva Zelandia	Toxoide CP asociado con 5 toxoides clostridiales y bacterinas
Glanvac®3 B12	Zoetis	Ovinos / Australia	Toxoide CP asociado con 2 toxoides clostridiales + vitamina B12
Glanvac®3 vaccine (for goats)	Zoetis	Ovinos y cabras / Australia	Toxoide CP asociado con 2 toxoides clostridiales
Glanvac®3S B12	Zoetis	Ovinos / Australia	Toxoide CP asociado con 2 toxoides clostridiales + selenio + vitamina B12
Glanvac®6 (for goats)	Zoetis	Ovinos y cabras / Australia	Toxoide CP asociado con 5 toxoides clostridiales y bacterinas
Glanvac®6S	Zoetis	Ovinos / Australia	Toxoide CP asociado con 2 toxoides clostridiales y bacterinas + selenio
Glanvac®6 B12	Zoetis	Ovinos / Australia	Toxoide CP asociado con 5 toxoides clostridiales + vitamina B12
Glanvac®6	Zoetis	Ovinos y cabras/ Brasil	Toxoide CP asociado con 5 toxoides clostridiales y bacterinas
Caseous D-T	Labovet Produtos Veterinários	Ovinos / EUA, Canadá	Combinación de 3 antígenos, <i>C. perfringens</i> tipo D, <i>C. tetani</i> y CP
Linfovac	Colorado Serum Co.	Ovinos / EUA, Canadá	Suspensión de CP vivo atenuado
Case-Bac	Vencofarma Lab.	Ovinos y cabras / Brasil	Cultivo completo destoxificado y purificado de CP
Biodectin	Fort Dodge LTD	Ovinos/Diferentes países	Toxoide CP asociado con antígenos clostridiales + endectocida
CL Bacterin Vaccine	Texas Vet Labs	Cabras / EUA	Bacterina CP

CP: *C. pseudotuberculosis*

Tomado y modificado de (de Pinho *et al.*, 2021).

III. JUSTIFICACIÓN

La producción ovina y caprina juega un papel importante a nivel mundial; por lo cual cada año la demanda del mercado de los productos se incrementa substancialmente. En México se contempla la producción y consumo a nivel regional, especialmente para la venta de barbacoa y de cortes.

Diversas enfermedades limitan la producción ovina y caprina en México; tal es el caso de la linfadenitis caseosa.

Linfadenitis caseosa es importante por las pérdidas económicas que ocasiona principalmente en la producción de carne, leche, lana y en la salud pública por su importancia zoonótica.

LCA es una enfermedad que tiende a un estadio crónico se observa en animales adultos; sin embargo, recientemente y con mayor frecuencia también se ha observado en animales jóvenes que son los que se emplean principalmente para la venta en canal.

Al ser una enfermedad de amplia distribución, que no tiene un tratamiento que sea satisfactorio por la lesión abscedativa; resulta de especial relevancia conocer las características de este microorganismo en animales jóvenes. Asimismo, como afecta a las unidades de producción tanto ovina como caprina, para establecer medidas de prevención y control; dentro de estas, la vacunación.

El siguiente trabajo busca poner en evidencia a *C. pseudotuberculosis* a partir de aislamientos en casos clínicos de linfadenitis caseosa en corderos, en unidades de producción del estado de Jalisco, México.

IV. HIPÓTESIS.

Existe la presencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en muestras de lesiones abscedativas superficiales en corderos del estado de Jalisco, México.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la presencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* en muestras obtenidas de casos clínicos de lesiones abscedativas superficiales en corderos del estado de Jalisco, México.

Objetivos específicos:

1. Obtener muestras de lesiones abscedativas superficiales provenientes de corderos del Estado de Jalisco, México.
2. Realizar el aislamiento e identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* mediante pruebas bacteriológicas y bioquímicas provenientes de lesiones abscedativas superficiales de corderos.
3. Identificar mediante la técnica de PCR multiplex a *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Población ovina.

El padrón de ganado ovino explotado en sistemas intensivos del Estado de Jalisco, integrado en la Unión Ganadera, la Asociación de Productores de Ovinos y los GGAVATTS de la entidad y en colaboración con la Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Estado de Jalisco, registran una población ovina de 35,000 cabezas de ovinos encastados principalmente con la raza Pelifolk. Las unidades de producción ovina bajo sistemas intensivos, se caracteriza por incluir o complementar la alimentación con un suplemento a base de minerales y dietas concentradas ricas en energía y proteína. Se tienen antecedentes clínicos, aproximadamente de un 20% de la población ovina explotada en la zona, con presencia de abscesos múltiples de tamaño variable en animales adultos y recientemente se ha descrito la presencia de abscesos en animales jóvenes (< 6 meses de edad).

6.2. Método de muestreo.

Se realizó un muestreo por conveniencia para incluir en el estudio a los corderos que presentaron abscesos subcutáneos, cuya edad esté en el rango de tres a seis meses. En unidades de producción ovina de los municipios de Arandas, El grullo, El salto, San Juan de los lagos, Villa corona, Zapopan y Zapotlanejo Jalisco, México.

6.3. Diagnóstico clínico de linfadenitis caseosa en corderos.

Se realizó un diagnóstico de situación, inspeccionando clínicamente a los corderos entre tres y seis meses de edad, para determinar la presencia de animales con linfadenitis caseosa. Se considero como animal sospechoso (posible positivo) a todo cordero que presente lesiones abscedativas en linfonodos superficiales de la región pre-clural, preescapular, parotideos, submaxilares, retromamarios e inguinales. La inspección se realizó con apoyo de un Médico Veterinario Zootecnista previamente capacitado para identificar las lesiones; se registró el número y distribución de lesiones abscedativas encontradas en el animal y se elaboró un

cuestionario individual en referencia a la unidad de producción, localización del absceso, tipo de exudado encontrado, edad, raza, sexo y condición corporal.

6.4. Toma de muestras biológicas.

De los animales identificados con lesiones clínicas compatibles con linfadenitis caseosa ovina, se realizó la toma de muestra a través de punción con jeringa, utilizando medidas de bioseguridad (guantes, cubreboca, gafas) y previa desinfección del área de punción. Las muestras biológicas se refrigeraron y se enviaron al laboratorio para su análisis. En el laboratorio las muestras se procesaron en el laboratorio por no más de 72 horas desde la toma de muestra. Las pruebas de identificación bacteriológicas, bioquímicas y la PCR se realizaron en el área de Bacteriología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, CIESA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 15.5 Carretera Toluca Atlacomulco, Toluca, Estado de México, C.P.50090, México.

6.5. Aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*

Se sembró por duplicado en agar sangre, incubando los medios a 37°C por 24-48 horas, en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se observó el crecimiento de colonias de color crema y rodeadas de una zona de hemólisis incompleta. A los aislamientos se les realizó la tinción de Gram para identificar a bacterias en forma de bacilos Gram positivos cortos y curvos. Las colonias puras y aisladas se cultivaron en medio líquido Infusión Cerebro-Corazón (BHI) 37g/L, durante un periodo de incubación de 48 a 72 h a 37°C para posteriormente realizar la extracción de ADN.

6.6. Pruebas bioquímicas

Las colonias bacterianas ya purificadas fueron sometidas a pruebas bioquímicas como la catalasa, urea y reducción de nitratos a nitritos de las muestras de corderos sospechosos de ser *C. pseudotuberculosis*. Considerando que el biovar *ovis* no reduce los nitratos a nitritos a diferencia del biovar *equi*.

6.7. Extracción de ADN

Se centrifugaron 2mL de cultivo de las cepas de *C. pseudotuberculosis* obtenidas en medio BHI, a 10,000 g x 2 min para coleccionar el pellet de células y se eliminó el sobrenadante. La extracción del ADN se llevó a cabo mediante el kit comercial FAST ID Genomic DNA Extraction (FANSA, EUA).

Al sedimento con la muestra de ADN se añadió 1mL de buffer de lisis con Proteinasa K (20mg/mL). Luego se mezcló vigorosamente por vortex y se incubó a 65°C por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 10,000 g x 5 min y se depositaron 500µL del sobrenadante en un tubo de micro-centrífuga nuevo. Se adicionaron 500µL de buffer de unión genómico y se centrifugó a 10,000 g x 5 min. El sobrenadante se añadió a una columna de unión de ADN y se centrifugó a 10,000 g x 2 min. Se lavó la columna con 650µL de buffer de lavado y tres veces con etanol al 75%. La elusión final se realizó con 100µL de 1x TE y se conservó a -20°C.

6.8. Determinación de la pureza del ADN

Para determinar la pureza del ADN de cada muestra se realizó mediante la medición de su absorbancia con la utilización de un equipo espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral (NanoDrop, ThermoFisher, USA) empleando un volumen de muestra de 1-2 ul en el pedestal, posteriormente se procedió a realizar la lectura de acuerdo con las indicaciones de fabricante, el cual tuvo una concentración entre ~30 a 80 ng/ul y la relación 260/280 un valor entre 1.8 a 2.0.

La relación 260/280 recomendada debe estar entre 1.8 y 2.0. Si la relación es inferior, eso podría indicar la presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben a 280 nm.

6.9. Identificación de los aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante PCR

La identificación de los aislamientos de campo de *C. pseudotuberculosis* se realizó mediante la amplificación de fragmentos de tres genes específicos: *16s rRNA*, *rpoB* y *pld*. La técnica de PCR multiplex siguió el protocolo establecido por Pacheco *et al.* (2007) (Tabla 4), en un volumen final de 25µl conteniendo 12.5 µl 2X Quiagen Multiplex PCR Máster Mix, 1µl de cada cebador (100pmol/µL) y 2µl de DNA (30ng/µL). El programa de la reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne

TC 512 Prime, USA) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 40s y 68°C por 1 min 30s; y una extensión final de 68°C por 7 min. Como control negativo se incluyó una reacción con todos los componentes y agua libre de nucleasas en lugar de la muestra de ADN, mientras que como control positivo se empleó una cepa control (*C. pseudotuberculosis* ATCC 43926).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación por PCR de los aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Gen	Cebadores	Secuencias	pb	Producto
<i>16s rNAr</i>	16s-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	20	816pb
	16s-R	TCTCTACGCCGATCTTGTAT	20	
<i>rpoB</i>	rpoB-F	CGTATGAACATCGGCCAGGT	20	446pb
	rpoB-R	TCCATTTGCGCGAAGCGCTG	20	
<i>pld</i>	Pld-F	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	20	203pb
	Pld-R	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG	23	

6.10. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en geles de 1.5% de agarosa permitió la visualización de los fragmentos amplificados de ADN (*16S rRNA*, *pld*, y *rpoB*). Los geles se sometieron a una corriente eléctrica durante 45 min a 110V usando una fuente de poder (AAHoefer, USA) para la separación de las moléculas de ADN. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizó los fragmentos de ADN utilizando luz UV en un fotodocumentador. Se emplearon marcadores de peso molecular de 100pb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen, USA) y de 1Kb O´GeneRuler (Fermentas, USA).

6.11. Análisis de Datos

La información obtenida y su análisis descriptivo de los resultados fueron presentados en forma de cuadros, gráficas de frecuencias; así como imágenes. Para el procesamiento de la información se utilizó Microsoft®Excel and Microsoft® Word (Microsoft Office, USA).

VII. LÍMITE DE ESPACIO

Las muestras de casos clínicos de linfadenitis caseosa se obtuvieron de unidades de producción ovina de los municipios de Arandas, El Grullo, El salto, San Juan de los lagos, Villa corona, Zapopan y Zapotlanejo Jalisco, México.

En estudio bacteriológico, bioquímico y molecular se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), FMVZ-UAEMEX. Km 15.5 Carretera Toluca- Atlacomulco, Toluca, Estado de México.

La redacción de protocolo y tesis se hizo en el Centro Universitario UAEM Amecameca, Carretera Amecameca Km 2.5, Centro, Amecameca de Juárez, Estado de México.

VIII. LÍMITE DE TIEMPO

Tabla 5. Cronograma de actividades desarrolladas en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal.

Mes	Actividad	Área de Trabajo
Mayo, 2022	Registro de protocolo	
Mayo, 2022	Toma de muestras de abscesos en corderos provenientes de casos clínicos de linfadenitis caseosa de los municipios de Arandas, El Grullo, El salto, San Juan de los lagos, Villa corona, Zapopan y Zapotlanejo, Jalisco. México. Recepción de muestras de abscesos de corderos provenientes del estado de Jalisco. Capacitación en las técnicas a emplear de microbiología y biología molecular.	Área de lavado Área de investigación
Mayo, 2022	Realización de medios de cultivo Agar sangre y pruebas de esterilidad. Siembra de la bacteria para su crecimiento y purificación. Identificación de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> mediante pruebas de microbiología y bioquímicas.	
Junio, 2022	Identificación de <i>C. pseudotuberculosis</i> mediante el método de PCR multiplex. Visualización en un fotodocumentador.	
Julio, 2022	Redacción de tesis	

IX. RESULTADOS

9.1. Diagnóstico clínico de linfadenitis caseosa en corderos

En la Tabla 6 se presenta el número de muestras de lesiones abscedativas superficiales en corderos de los municipios de Arandas (5.2%), El grullo (21%), El Salto (15.8%), San Juan de los lagos (31.6%), Villa corona (10.6%), Zapopan (5.2%), Zapotlanejo (10.6%), Jalisco, México. Todas pertenecen a corderos de la raza pelifolk, de un rango de edad de tres a seis meses; 16 fueron hembras (84.2%) y 3 machos (15.8%), los cuales en su mayoría presentan condición corporal de 2.5 (68.4%), el tipo de exudado caseoso predominó (73.7%) y el linfonodo retrofaríngeo fue el más afectado (52.7%).

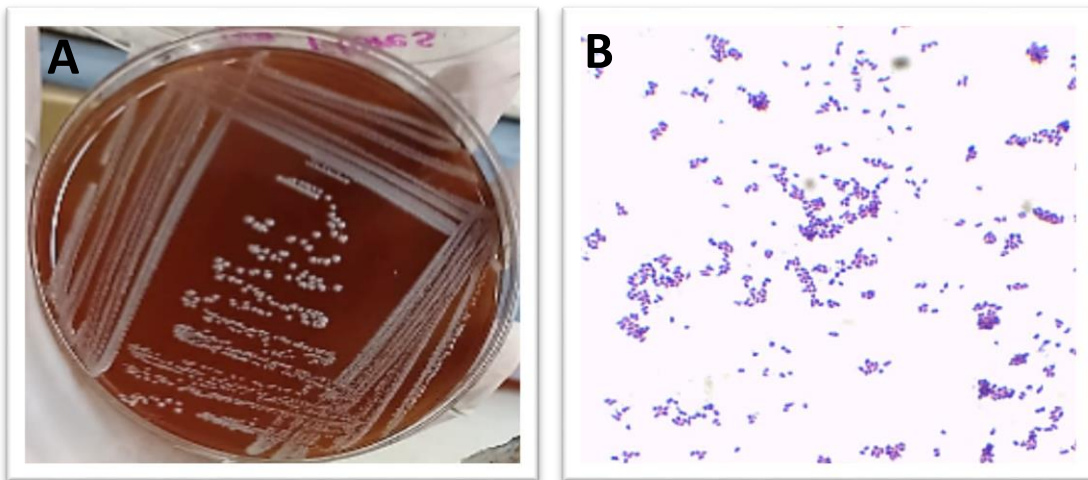
Tabla 6. Muestras de lesiones abscedativas superficiales en corderos del Estado de Jalisco, México; para la identificación microbiológica, bioquímica y PCR multiplex de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

MUNICIPIO	LOCALIDAD	# DE MUESTRAS	PORCENTAJE	SEXO		LINFONODO AFECTADO			TIPO DE EXUDADO			CONDICIÓN CORPORAL			EDAD (MESES)			
				HEMERA	MAACHO	RETROFARINGED	MANDIBULAR	PAROTÍDEO	CASEOSO	SANGUINOLENTO	SEROPURULENTO	2.5	3	4	3	4	5	6
ARANDAS	ARANDAS	1	5.2	1		1			1			1					1	
EL GRULLO	EL AGUACATE	4	21	4		2	2		3	1		3	1				1	3
EL SALTO	EL SALTO	3	15.8	2	1	1	2		3			2	1		2	1		
SAN JUAN DE LOS LAGOS	EL SAUZ	6	31.6	5	1	4	1	1	4	1	1	3	1	2	1	3		2
VILLA CORONA	ESTIPAC	2	10.6	1	1	2			1	1		2						2
ZAPOPAN	TESISTÁN	1	5.2	1			1		1			1			1			
ZAPOTLANEJO	LA PURÍSIMA	2	10.6	2				2	1		1	1	1					2
TOTAL		19	100	16	3	10	6	3	14	3	2	13	4	2	3	5	2	9
PORCENTAJE %		100	100	84.2	15.8	52.7	31.5	15.8	73.7	15.8	10.5	68.4	21.0	10.6	16	26	11	47

9.2. Identificación bacteriológica:

En la figura 1-A se observa la presencia de colonias en el medio agar sangre, 24 horas posterior a su siembra, de un tamaño de 1mm de longitud, de un color blanco grisáceo. A las 72 horas las colonias fueron más grandes y cambio a color blanco, secas y rodeadas por una zona de beta hemólisis.

En la figura 1-B se observa en la tinción de Gram, bacterias las cuales de tiñen de color morado, presentan una morfología de cocos, bacilo y cocobacilo empalizadas.



Figuras 1-A y 1-B; A) Morfología de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, crecimiento de colonias en agar sangre. **B)** *Corynebacterium pseudotuberculosis* teñido con tinción de Gram con objetivo 100X.

9.3. Pruebas bioquímicas:

Las pruebas de catalasa y urea fueron positivas en los aislados de *C. pseudotuberculosis* (Figura 2 A y B). La prueba de reducción de nitratos a nitritos fue negativa (Figura 2 C); lo que diferencia al biovar *ovis* del biovar *equi*, el cual es positivo.

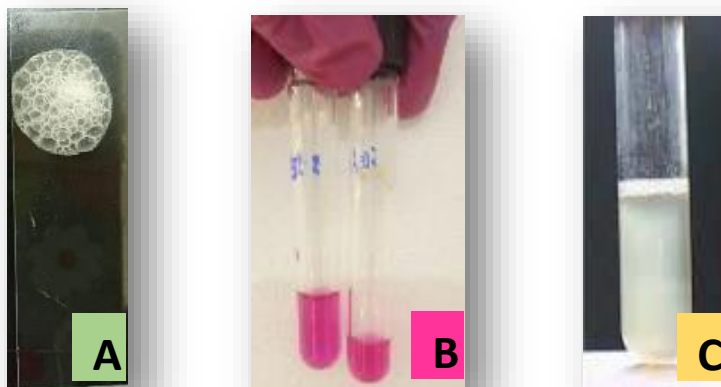


Figura 2. (A, B y C). A. Catalasa positiva, presencia de burbujas. B. Urea positiva. C. Prueba de reducción de nitratos a nitritos negativa.

En la tabla 7 se consignan un total de 19 muestras, las cuales dieron positivo a las pruebas de catalasa y urea. La prueba de reducción de nitratos a nitritos fue negativa, correspondiente al biovar *ovis* a diferencia del biovar *equi* (positivo).

9.4. Determinación de la pureza del ADN

Se determinó el grado de pureza del ADN de las muestras las cuales tuvieron una concentración aceptable para realizar el PCR. El ADN extraído con el kit comercial, el cual tuvo una concentración entre ~30 a 80 ng/ul y la relación 260/280 tuvo un valor entre 1.8 a 2.0, lo cual indica que se encontró en los rangos óptimos de pureza.

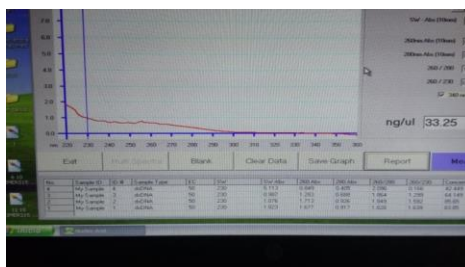


Figura 3. Nivel de pureza de ADN de las muestras de abscesos en corderos.

Tabla 7. Aislados obtenidos a partir de lesiones abscedativas superficiales en corderos de los municipios del Estado de Jalisco, México; para la identificación bioquímica y variación de los genes en el PCR multiplex de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Aislado	Municipio	Localidad	Pruebas bioquímicas			PCR multiplex (Variación de genes)		
			Catalasa	Urea	Reducción de nitratos a nitritos	Gen 16s (816 pb)	Gen rpoB (446pb)	Gen pId (203 pb)
1J	San Juan de los lagos	El Sauz	+	+	--	+	+	+
2J	San Juan de los lagos	El Sauz	+	+	--	+	+	+
3J	San Juan de los lagos	El sauz	+	+	--	+	+	+
5J	San Juan de los lagos	El sauz	+	+	--	+	+	+
6J	San Juan de los lagos	El sauz	+	+	--	+	+	+
7J	San Juan de los lagos	El Sauz	+	+	--	+	+	+
8J	Villa corona	Estipac	+	+	--	+	+	+
9J	Villa corona	Estipac	+	+	--	+	+	+
32J	Zapopan	Tesistán	+	+	--	+	+	+
42J	El salto	El salto	+	+	--	+	+	+
51J	El salto	El salto	+	+	--	+	+	+
52J	El salto	El salto	+	+	--	+	+	+
55J	El grullo	El aguacate	+	+	--	+	+	+
55A	El grullo	El aguacate	+	+	--	+	+	+
57A	El grullo	El aguacate	+	+	--	+	+	+
57J	El grullo	El aguacate	+	+	--	+	+	+
60J	Zapotlanejo	Purísima	+	+	--	+	+	+
71J	Zapotlanejo	Purísima	+	+	--	+	+	+
38-55-J	Arandas	Arandas	+	+	--	+	+	+

9.5. Identificación de los aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante PCR

Los 19 aislamientos que fueron identificados mediante pruebas bioquímicas se confirmaron mediante la técnica de PCR multiplex, se logró amplificar correctamente los fragmentos de los tres genes *16s* (816pb), *pld* (203pb), *rpoB* (446pb) en los aislamientos obtenidos de lesiones abscedativas en ovinas.

En la figura 3 se observa que todos los aislamientos amplificaron los fragmentos correspondientes a los genes de acuerdo con la metodología establecida y según el peso molecular esperado. Los controles tanto positivo como negativo también dieron los resultados esperados.

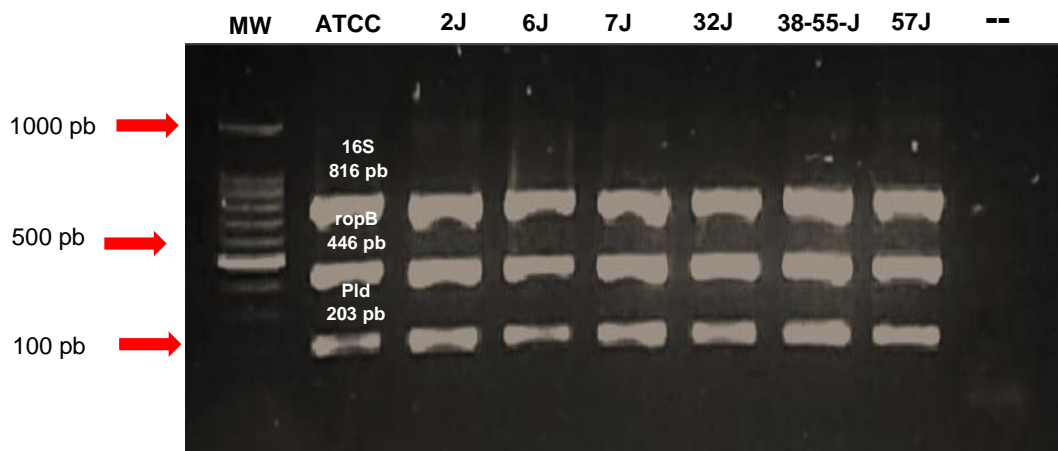


Figura 4. Identificación de PCR de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* (n=19). MW, marcador de peso molecular (Promega); segundo carril (control positivo *C. pseudotuberculosis* ATCC 43926); 16s+; *C. pseudotuberculosis rpoB*+ y *C. pseudotuberculosis pld*+, tercer carril: muestra 2J, cuarto carril muestra 6J, quinto carril muestra 7J (San Juan de los lagos), sexto carril muestra 32J (Zapopan), séptimo 38-55J (Arandas) y último carril control negativo.

X. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se aisló e identificó a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*, agente causal de la linfadenitis caseosa (LCA), que afecta principalmente a los pequeños rumiantes (Odhah *et al.*, 2018; Faeza *et al.*, 2019), en las 19 muestras de lesiones abscedativas cutáneas de corderos provenientes de las unidades de producción pecuarias de Jalisco.

Actualmente en México, hay poca información sobre la infección natural de LCA en corderos, siendo este trabajo un referente importante en virtud de que se observa incremento del padecimiento en ovinos y caprinos menores a un año, por lo que se destaca que los corderos examinados fueron de un rango de edad entre 3 y 6 meses, lo cual difiere con lo establecido en otros reportes en donde se considera que la enfermedad es más prevalente en animales adultos de un año en adelante (Al-Gaabary *et al.*, 2009; Fikre & Abraha, 2014).

El microorganismo fue detectado en todas las unidades de producción muestreadas de siete municipios del estado de Jalisco. Los resultados obtenidos coinciden con trabajos previos que indican que LCA se distribuye en varios rebaños de ovinos y caprinos de esta entidad federativa, por ejemplo un estudio realizado en 2013 encontró LCA en 33% de muestras de ovinos, el estudio incluyó los municipios de Tlaquepaque, Tlajomulco, Tepatitlan, Zapopan Acatic y Zapotlanejo (Valdivia, 2013); mientras que otro estudio realizado dos años después logró identificar mediante PCR 60 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad *ovis* en instalaciones ovinas y caprinas en estos mismos municipios, aunque las localidades fueron diferentes (Hernández, 2015).

En este estudio se encontró *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* en diferentes municipios a los ya reportados, lo que podría indicar que la enfermedad está distribuida en otras localidades aun no estudiadas. Al menos en dos municipios que se incluyeron en el muestreo han reportado previamente la presencia de *C. pseudotuberculosis* en ovinos: Zapopan y Zapotlanejo (Hernández, 2015; Valdivia, 2013). A pesar de su descripción en esta región del país, los estudios previos se

han centrado en la detección del patógeno y se ha sugerido el ampliar el estudio epidemiológico, sin embargo, no se han emitido recomendaciones o se le ha dado seguimiento para incluir actividades encaminadas a ayudar a los productores a controlar la diseminación de la enfermedad. Consideramos necesario profundizar en las medidas para controlar los factores de riesgo en las unidades de producción ovinas y realizar campañas informativas para ayudar a disminuir la enfermedad, ya que hasta el momento se siguen presentando casos de LCA.

Otros estudios realizados en el país incluyen el Estado de México, en el municipio de Xalatlaco en donde hallaron que el 5.4 % de los exudados nasales de ovejas presentaron *Corynebacterium spp.* (Ochoa *et al.*, 1996), mientras que Barrientos *et al.*, (1996) aislaron a *Corynebacterium spp.* en el 65% de los casos con lesiones en nódulos linfáticos. Estas investigaciones previas indican que *C. pseudotuberculosis* se encuentra a lo largo del país en diferentes estados. Sin embargo, se carece de información con respecto a otras entidades federativas, por lo que no se puede determinar a nivel nacional su frecuencia en ovinos y caprinos.

En México los estudios realizados para aislar *C. pseudotuberculosis* han sido realizados solamente con abscesos cutáneos. En la Tabla 7 se observa que los abscesos asociados a LCA se localizaron en los linfonodos retrofaríngeos, submandibulares y parotídeos; lo cual coincide con un estudio reciente en España en ovinos sacrificados por cuestiones humanitarias en el que encontraron que el 72.79% de los animales examinados presentaban LCA visceral, mientras que solo el 21.77% presentaban la forma superficial y el linfonodo más afectado fue el retrofaríngeo (Ruiz *et al.*, 2020), a diferencia de un estudio en Etiopia que mostraron que los abscesos se encontraban a nivel superficial en los linfonodos preescapular y prefemoral tanto en ovinos como en cabras (Abebe & Sisay Tessema, 2015).

Entre los pocos estudios que reporten LCA en corderos, esta una investigación que informó sobre la presencia de LCA a lo largo de tres años (2013-2015) en las islas Malvinas, con una frecuencia menor al 1% (Listos *et al.*, 2016); sin embargo, en Etiopia se encontró que existe un mayor riesgo de contraer LCA en animales recién nacidos y que es posible observar signos clínicos a los 6 meses de edad, esto difiere

de la mayoría de publicaciones que indican que a mayor edad aumenta el riesgo de contraer LCA y es algo que se identificó en los 19 animales empleados en este trabajo.

Otro aspecto para destacar es la información respecto al sexo de los animales con LCA. En un estudio realizado en Iraq se encontró que la LCA es más predominante en hembras (10.6%) que en machos (0.85%) (Issa *et al.*, 2021). En este trabajo, se observó una similitud en cuanto a la distribución del sexo, donde hubo un mayor número de hembras (16 animales) en comparación con los machos (3 ejemplares).

Además de los factores de riesgos conocidos, otro problema que observamos y que pudiera contribuir a la persistencia de la enfermedad es la carencia de inmunógenos disponibles en el país; mientras que en otros países ya está establecida la aplicación de dos dosis en animales jóvenes y una vacunación anual (Lacasta *et al.*, 2015). El desarrollo de bacterinas podría ayudar a disminuir su presencia en las unidades de producción ovina. En México se han realizado estudios con modelos murinos y también con una vacuna experimental en ovinos en los estado de Veracruz, Puebla y Yucatán (Ibarra Zazueta *et al.*, 2016; Murguía-Olmedo & Morales-Álvarez, 2017), sin embargo no se ha realizado estudios a mayor escala ni se ha planteado la venta de un biológico contra esta enfermedad. Los aislamientos obtenidos de corderos en el estado de Jalisco pudieran tener potencial para ser empleados en el desarrollo de vacunas para prevenir la LCA.

En el futuro, deben de investigarse los factores que predisponen al incremento de la frecuencia de LCA en corderos y cabritos ya que no se ha esclarecido el rol de estos específicamente en las unidades de producción estudiadas; al mismo tiempo, se debe hacer énfasis en la limpieza y desinfección, la mejora de las instalaciones de corrales, comederos y bebederos, además de eliminar a los animales enfermos, ya que por el momento se carece de medidas de vacunación.

Se ha descrito a *C. pseudotuberculosis* como el principal patógeno de LCA en diversas regiones del mundo (Latif *et al.*, 2015). Nuestro trabajo se centró en el aislamiento e identificación de *C. pseudotuberculosis*; sin embargo, varias especies bacterianas pueden afectar los linfonodos en los pequeños rumiantes generando

abscesos (Dorneles *et al.*, 2014). En un estudio bacteriológico realizado a partir de linfonodos con abscesos en ovinos se observó que *C. pseudotuberculosis* constituye el 43,7% de los microorganismos aislados, seguido de *estreptococos* γ -hemolíticos 8,6% y *Trueperella pyogenes* 6,1% (Zamproga *et al.*, 2021). La correcta identificación de *C. pseudotuberculosis* es indispensable ya que se trata de un proceso crónico y persistente a diferencia de otros agentes causales que pueden ser transitorios o con menor diseminación dentro del rebaño.

XI. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se aisló e identificó a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* en las 19 muestras de lesiones abscedativas de corderos provenientes de municipios del estado de Jalisco, México.
2. De las lesiones abscedativas en corderos de la raza Pelifolk, presentaron condición corporal de 2.5 (68.4%), el tipo de exudado caseoso fue el que predominó (73.7%) y el linfonodo retrofaríngeo fue el más afectado (52.7%).
3. Hubo una correlación del 100% entre las pruebas bioquímicas y PCR multiplex para la identificación de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

XII. SUGERENCIAS

1. Capacitación a los productores de las unidades de producción ovinas y caprinas acerca de la importancia de *C. pseudotuberculosis* causante de Linfadenitis caseosa, las repercusiones que tiene y su impacto en la salud pública, así como recomendaciones para llevar a cabo buenas prácticas de higiene en las instalaciones, separación de los animales por etapa fisiológica, la obtención de un control y registro de los corderos recién nacidos.
2. Recolectar muestras de sangre para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico.
3. Inspeccionar otras unidades de producción en otros municipios para saber si existe la enfermedad.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abebe, D. y Sisay Tessema, T. (2015). Determinación de la prevalencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de ganglios linfáticos de ovejas y cabras en un matadero de exportación orgánica, Modjo, Etiopía. *Cartas en Microbiología Aplicada*, 61 (5), 469-476.
2. Aiello SE, Mays A, Amstutz H. E, Merck & Co. 2000. El manual Merck de Veterinaria. 5a ed. Barcelona: Océano Grupo Editorial. 2558p
3. Aleman, M., & Spier, S. J. (2001). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Large animal internal medicine*, 5, 1080-1083.
4. Al-Gaabary, M. H., Osman, S. A., & Oreiby, A. F. (2009). *Caseous lymphadenitis* in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Ruminant Research*, 87(1-3), 116-121.
5. Almeida, S., Dorneles, E.M.S., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J., et al. (2017). Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC Veterinary Research*. 13: 290.
6. Andrade, J. S. L., Azevedo, S. S., Teles, J. A. A., Higino, S. S., & Azevedo, E. O. (2012). Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 116-120.
7. Araújo, C.L., Blanco, I., Souza, L., Tiwari, S., Pereira, L.C., Ghosh, P., Azevedo, V., Silva, A., Folador, A. (2020). In silico functional prediction of hypothetical proteins from the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. *Peer J*. 8: e9643.
8. Auad, J., Cerutti, J., Cooper, L. G., Camussone, C. M., Lozano, N. A., Crespo, F. M., & Lozano, A. (2018). Humoral immune response of pregnant goats to two *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin formulations. *Austral journal of veterinary sciences*, 50(2), 101-105.
9. Augustine, J.L., Renshaw, H.W. (1986). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. *American Journal of Veterinary Research*. 47:713-715.

10. Baird GJ, & Fontaine MC. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*; 137:179–210. <https://doi.org/10.1016/j.icpa.2007.07.002>.
11. Barral TD, Mariutti RB, Raghuvir Krishnaswamy A, Santos AJ, Loureiro D, Sokolonski AR, et al. A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microb Biotechnol* 2019; 12(6): 1313–1323.
12. Barrientos, P.J.S., García, GDA., Cuellar, OJA., Garcia, VS., 1996. Distribución de lesiones de linfadenitis caseosa en ovinos Libro Resúmenes del XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Brasil. 495, 252
13. Bastos BL, Dias PRW, Dorella FA, Ribeiro D, Seyffert N. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological responses in animal models and zoonotic potential. *J Clin Cell Immunol* 2012; S4 (005):1-15.
14. Belchior, E., Graciela, S., Gallardo, A., Abalos, M., Alvarez, L., Núñez, N., Guevara, D., Jensen, O. (2009). *Corynebacterium Pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. *Revisión de casos. REDVET*. 10(10): 1-16.
15. Belchior, S. E., Gallardo, A., Abalos, A., Jodor, N., Jensen, O.G. (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Revista Veterinaria Argentina*. 23: 258-278.
16. Bernard, K.A., and Funke, G. (2012). Genus *Corynebacterium*. En: Whitman, W.B. (Ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp.245–289). New York, USA: Springer.
17. Binns, S.H., Green, L.E., Bailey, M. (2007). Development and validation of anELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary Microbiology*. 20: 169-179.
18. Brown, CC., Olander, HJ., 1987. *Caseous Lymphadenitis* of Goat and Sheep: A Review. *Veterinary Bulletin*. 57, 1-12.
19. Burkovski, A. (2013). Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. *International Scholarly Research Notices*, 2013.

20. Burkovski, A. (2018). The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie van Leeuwenhoek*. 111: 717-725.
21. Carillo, G.M., Ortega, S.J.L., Hernández, S.J.R. (2005). Prevalencia de linfadenitis caseosa en hatos caprinos de la comarca lagunera de Durango. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 4: 51-55.
22. Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., *et al.* (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*. 88: 75-83.
23. Chávez, E.D., Jiménez, R.Y., Burgos, H.T. (2016). Diagnóstico de *Pseudotuberculosis* en ovinos a partir del estudio hematológico. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 17(11): 1-7.
24. Cheuquepan, V.F., Ríos, C.M., Abalos, P.P., M.Sc, M.V., Retamal, M.P., MSC, M.V. (2008). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Una breve actualización. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 23: 30-34.
25. Chikamatsu, S., Zhao, H. K., Kikuchi, N., & Hiramune, T. (1989). Seroepidemiological survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep in Japan using enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, 51(5), 887–891. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.51.887>
26. Chikhaoui, M. and Khoudja, FB (2013). Investigación clinicopatológica de la linfadenitis caseosa en ovinos de raza local en Argelia. *Salud y producción animal tropical*, 45 (7), 1641-1643.
27. Chirino, Z.C., Scaramelli, A., Rey, V.C. (2006). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research*. 65: 170-175. *CL affected goats. Vet Rec* 1990;127(15):387.
28. Clark KA, Robinson RM, Weishuhn LL, Litton GW, Marburger RG. (1972). Caseous Lymphadenitis in Pronghorns (*Antilocapra americana*). *Journal of Wildlife Diseases*; 8(1):67-71. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-8.1.67>.

29. Collett MG, Bath GF, Cameron CM. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: Coetzer J, Thomson GR, Justin RC, editores. Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa. Cape Town, South Africa: Oxford University Press; 1994:1387–1395.
30. Connor, K.M., Fontaine, M.C., Rudge, K., *et al.* (2007). Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Research*. 38: 613-623.
31. Connor, K.M., Quiere, M., Baird, G., *et al.* (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 2633-2637.
32. Corbeil, L.E., Morrissey, J.K., Léguillette, R. (2016). Is *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (pigeon fever) in horses an emerging disease in western Canada?. *Canadian Veterinary Journal*. 57: 1062-1066.
33. Corrêa, J.I., Stocker, A., Trindade, S.C., Vale, V., Brito, T., Bastos, B., Raynal, J.T., Miranda, P.M., Alcantara, A.C., Freire, S.M., Costa, L.M., Meyer, R. (2018). In vivo and in vitro expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. *AMB Express*.8(1): 89.
34. D'Afonseca, V., Moraes, P.M., Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Meyer, R., Portela, R.W., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2008). A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular Research*. 7: 252-260.
35. de Farias AEM, Alves JRA, Alves FSF, Pinheiro, RR, Faccioli, MPY, Lima, AMC, *et al.* Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. *Trop Anim Health Pro* 2019;51(4): 745-752.
36. de Oliveira Zamprogna, T., Ribeiro, D., Azevedo, V., Lara, G., Motta, R. G., da Silva, R. C., Siqueira, A. K., de Nardi Júnior, G., Listoni, F., de

Souza Araújo Martins, L., da Silva, A. V., Portilho, F., da Rocha Mota, A., Rodrigues, C. A., de Almeida, B. O., & Ribeiro, M. G. (2021). Bacteriological, cytological, and molecular investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mycobacteria, and other bacteria in caseous lymphadenitis and healthy lymph nodes of slaughtered sheep. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 52(1), 431–438. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00403-0>

37. de Pinho, RB, de Oliveira Silva, MT, Bezerra, FSB y Borsuk, S. (2021). Vacunas para la linfadenitis caseosa: estrategias actualizadas y prospectivas. *Microbiología aplicada y biotecnología*, 105 (6), 2287-2296.
38. de Sa Guimaraes, A., Dorneles, E. M. S., Andrade, G. I., Lage, A. P., Miyoshi, A., Azevedo, V., ... & Heinemann, M. B. (2011). Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using ERIC-PCR. *Veterinary microbiology*, 153(3-4), 299-306.
39. Debien E, Hélie P, Buczinski S, Leboeuf A, Bélange D y Drolet R. Proportional mortality: A study of 152 goats submitted for necropsy from 13 goat herds in Quebec, with a special focus on Caseous lymphadenitis. *Can Vet J* 2013; 54: 581–587.
40. Delgado Duno A., Zárraga J. Chirino-Zárraga, C.I, Carrero Portillo, L.L. (2015). Caracterización epidemiológica de la Linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Praguana, Venezuela. *Rev. Med. Vet.* 31: 35-45.
41. Dercksen, D.P., Brinkhof, J.M.A., Dekker-Nooren, T., *et al.* (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. 75: 167-175.
42. Didkowska, A., Żmuda, P., Kwiecień, E., Rzewuska, M., Klich, D., Krajewska-Wędzina, M., ... & Anusz, K. (2020). Microbiological assessment of sheep lymph nodes with lymphadenitis found during post-mortem examination of slaughtered sheep: implications for veterinary-sanitary meat control. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 1-7

43. Dorella, F.A., Pacheco, L.G., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*. 37(2): 201-18.
44. Dorneles, E. M., Santana, J. A., Ribeiro, D., Dorella, F. A., Guimarães, A. S., Moawad, M. S., Selim, S. A., Garaldi, A. L., Miyoshi, A., Ribeiro, M. G., Gouveia, A. M., Azevedo, V., Heinemann, M. B., & Lage, A. P. (2014). Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. *PLoS one*, 9(6), e98758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098758>
45. Egen, N.B., Cuevas, W., McNamara, P.J., Sammons, D.W., Humphreys, R., Songer, J.G. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *American Journal of Veterinary Research*. 50: 1319-1322.
46. Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Jensen O. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Rev Vet Arg*. 2006; 23:258-278.
47. Estevao, B., Gallardo, A., Abalos, A., Díaz, Y., Álvarez, L., et al. (2007). Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep from Patagonia. *Revista Argentina de Microbiología*. 39: 44-46.
48. Faeza NMN, Jesse FFA, Hambal IU, Odhah MN, Umer M, Wessam MMS, et al. Responses of testosterone hormone concentration, semen quality, and its related pro-inflammatory cytokines in bucks following *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its mycolic acid infection. *Trop Anim Health Prod* 2019;51(7):1855-1866
49. Fontaine, M.C., Baird, G.J. (2008). Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*. 76: 42-48.
50. Z. Fikre and G. K. Abraha, "Caseous lymphadenitis in goats from Borena Range land south Ethiopia slaughtered at Luna export abattoir," *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, vol. 6, no. 6, pp. 168–173, 2014.

51. Gallardo, A.A., Toledo, R.A., González, P.R.A., Azevedo, V., Robles, C., Paolicchi, F.A., Estevao, B.S.G. (2019). *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis: evaluación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*. *Revista Argentina de Microbiología*. 51(4): 334-338.
52. Gao H, Ma Y, Shao Q, Hong Q, Zheng G y Li Z. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain KM01, isolated from the abscess of a goat in Kunming, China. *Genome Announc* 2018; 6(11): e00013-18.
53. Gascoigne, E., Ogden, N., Lovatt, F., & Davies, P. (2020). Update on caseous lymphadenitis in sheep. *In Practice*, 42, 105– 114.
54. González, C.; Jorge, M.C.; Zeballos, H.; West, M.; Mateos, E.; Yotti, C. (1991). Actualización y estudio de situación de la Linfadenitis caseosa de los lanares en el partido de Tandil. *Veterinaria Argentina*.3 (75):304-310.
55. Guerrero, J. A. V., de Oca Jiménez, R. M., Dibarrat, J. A., León, F. H., Morales-Erasto, V., & Salazar, H. G. M. (2018). Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. *Microbial pathogenesis*, 117, 304-309.
56. Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (2008). Pathogenesis of bacterial infections in animals. John Wiley & Sons.
57. Hassan, S.S., Guimarães, L.C., Pádua, P.U. de., Islam, A., Ali, A., Bakhtiar, S.M., *et al.* (2012). Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis strain P54B96 isolated from antelope in South Africa obtained by rapid next generation sequencing technology. *Standards in Genomic Sciences*. 7: 189-199.
58. Hernandez, F. (2015). Caracterización molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislados de muestras de casos clínicos de linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos. Tesis de Maestría, FMVZ., Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México
59. Hodgson, A.L., Tachedjian, M., Corner, L.A., Radford, A.J. (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral

- dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*. 62:5275-5280.
60. Holstad, G. and J. Teige jr.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats VI. Clinical and pathological changes after intravenous inoculation of the organism. *Acta vet. scand.* 1988, 29, 281-286.
61. İlhan, Z. (2013). Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 164: 60-66.
62. Issa, N., Fatah, R., Taha, Z., Hussien, M., Kareem, K., Hamadamin, H., ... & Hameed, H. (2021). Prevalence and molecular investigation of caseous lymphadenitis among the slaughtered sheep at Duhok Abattoirs; experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in rabbits. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(2), 263-270.
63. Ivanović, S., Žutić, M., Pavlović, I., Žujović, M. (2009). Caseous lymphadenitis in goats. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 25(5-6): 999-1007.
64. Jesse, F.F.A., Odhah, M.N., Abbad, Y., Garba, B., Mahmood, Z., Hambali, I.U., Haron, A.W., *et al.* (2020). Responses of female reproductive hormones and histopathology in the reproductive organs and associated lymph nodes of Boer does challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic corynomycolic acid Extract. *Microbial Pathog.* 139: 103852.
65. Join-Lambert, OF, Ouache, M., Canioni, D., Beretti, JL, Blanche, S., Berche, P. y Kayal, S. (2006). Linfadenitis necrosante por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en un paciente de doce años. *Revista de enfermedades infecciosas pediátricas*, 25 (9), 848-851.
66. Kelly, E. J., Rood, K. A., & Skirpstunas, R. (2012). Abscesses in captive elk associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Utah, USA. *Journal of wildlife diseases*, 48(3), 803–805.
67. Khamis, A., Raoult, D., La Scola, B. (2004). *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 3925-3931.

68. Khamis, A., Raoult, D., La Scola, B. (2005). Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(4): 1934-1936.
69. Latif NAA, Abdullah FFJ, Othman AM, Rina A, Chung ELT, Zamri-Saad M, Lila MAM. Isolation and detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the reproductive organs and associated lymph nodes of non-pregnant does experimentally inoculated through intradermal route in chronic form. *Vet World*. 2015;8:924–927. doi: 10.14202/vetworld.2015.924-927.
70. Li H, Yang H, Zhou Z, Li X, Yi W, Xu Y, Wang Z, Hu S. (2018). Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in south western China. *Small Ruminant Research*. 168: 69-75.
71. Listos, P., Gryzinska, M., Martychiewicz, M., Pointing, S., Barton, A. & Dylewska, M. (2016). Caseous Lymphadenitis in Sheep in the Falkland Islands. *Acta Veterinaria*, 66(3) 406-412. <https://doi.org/10.1515/acve-2016-0034>
72. Literák, I., Horváthová, A., Jahnová, M., Rychlík, I., Skalka, B. (1999). Phenotype and genotype characteristics of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 32: 107-111.
73. Lopes T, Silva A, Thiago R, Carneiro A, Dorella FA. Complete Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp267, isolated from a Llama. *J Bacteriol* 2012; 194: 3567–3568.
74. Mahmood ZKH, Jesse FF, Saharee AA, Jasni S, Yusoff R y Wahid H. Clinico-pathological changes in goats challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (PLD). *Am J Anim Vet Sci* 2015; 10 (3): 112-132.
75. Menzies, P.I., Hwang, Y-T., Prescott, J.F. (2004). Comparison of an interferon- γ a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*. 100: 129-137.

76. Mondragón, AJ; Domínguez, A; Rebollar, RS; Bórquez, GJL; Hernández, MJ. 2010. Canales de comercialización de la carne de ovino en Capulhuac, Estado de México. En el XI Congreso Nacional de Investigación socioeconómica y Ambiental de la producción pecuaria. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, México. 433 pág.
77. Muñoz-Bucio, A. V., Cortés-Pérez, Y. A., Arellano-Reynoso, B., Hernández-Gil, M., Hernández-Castro, R., & Díaz-Aparicio, E. (2017). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from muscular abscesses in two horses: First report in Mexico. *Equine Veterinary Education*, 29(8), 431-435.
78. Nabih, A.M., Hussein, H.A., El-Wakeel, S.A., Abd El-Razik KA, Gomaa AM (2018). *Corynebacterium pseudotuberculosis* mastitis in Egyptian dairy goats, *Veterinary World*. 11(11): 1574-1580.
79. Nassan AFC, Daniel GT, Miyashiro S, Ruiz R, Scannapieco EM, de Souza J, et al. Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. *Arq Inst Biol* 2015; 82: 1-6.
80. Ochoa UG, Deuces LP, Martínez BMR, Jiménez RM, Pérez R. 1996. Aislamiento de agentes bacterianos a partir de exudados nasales en rebaños ovinos trashumantes de Xalatlaco México. XV Congreso Panamericano de Ciências Veterinárias; 21-25 oct 1996; *Campo Grande, Brasil. Campo Grande: PANVET*; 1996.
81. Odhah MN, Abdullah FFJ, Haron AW, Mohd LMA, Zamri SM, Khuder Z, et al. Hemogram responses in goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogen mycolic acids. *Vet World* 2017; 10(6), 655-661.
82. Odhah MN, Jesse FFA, Lawan A, Idris UH, Marza AD, Mahmood ZK, et al. Responses of haptoglobin and serum amyloid A in goats inoculated intradermally with *C. pseudotuberculosis* and mycolic acid extract immunogen. *Microb Pathog* 2018; 117: 243–246.

83. Odhah, M. N., Jesse, F. F. A., Chung, E. L. T., Mahmood, Z., Lila, M. A. M., & Zamri-Saad, M. (2019). Clinico-pathological responses and PCR detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. *Microbial pathogenesis*, 135, 103628.
84. Oliveira M, Barroco C, Mottola C, Santos R, Lemsaddek A, Tavares L y Semedo-Lemsaddek, T. First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *Vet Res* 2014; 10: 218.
85. Oliveira, A., Oliveira, L. C., Aburjaile, F., Benevides, L., Tiwari, S., Jamal, S. B., ... & Wattam, A. R. (2017). Insight of genus *Corynebacterium*: *ascertaining* the role of pathogenic and non-pathogenic species. *Frontiers in microbiology*, 8, 1937.
86. Oliveira, A., Teixeira, P., Azevedo, M., Babar, J.S., Tiwari, S., Almada, S., *et al.* (2016). *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under anagenesis and biovar *Equi* forms biovar *Ovis*: a phylogenic inference from sequence and structural analysis. *BMC Microbiology*. 16: 100.
87. O'reilly, KM, Green, LE, Malone, FE y Medley, GF (2008). Estimación de parámetros y simulaciones de un modelo matemático de transmisión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos. *Medicina veterinaria preventiva* , 83 (3-4), 242-259.
88. O'reilly, KM, Medley, GF y Green, LE (2010). El control de la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en rebaños de ovejas: un modelo matemático del impacto de la vacunación, pruebas serológicas, examen clínico y punción de abscesos. *Medicina veterinaria preventiva* , 95 (1-2), 115-126.
89. Osman, A.Y., Nordin, M.L., Kadir, A.A., Saharee, A.A. (2018). The Epidemiology and Pathophysiology of Caseous Lymphadenitis: A Review. *Jornal of Veterinary Medicine Research*. 5(3): 1129.
90. Othman, A. M., Abba, Y., Jesse, F. F. A., Ilyasu, Y. M., Saharee, A. A., Haron, A. W., ... & Lila, M. M. (2016). Reproductive pathological changes

associated with experimental subchronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in nonpregnant boer does. *Journal of pathogens*, 2016.

91. Pacheco, L., Pena, R. R., Castro, T., Dorella, F. A., Bahia, R. C., Carminati, R., Frota, M., Oliveira, S. C., Meyer, R., Alves, F., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of medical microbiology*, 56(Pt 4), 480–486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46997-0>
92. Pacheco, L.G.G., Pena, R.R., Castro, T.L.P., *et al.* (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 1-7.
93. Parise, D., Parise, M.T.D., Viana, M.V.C., Muñoz, B.A.V., Cortés, P.Y.A., Arellano, R.B., *et al.* (2018). First genome sequencing and comparative analyses of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains from Mexico. *Standards in Genomic Sciences*. 13: 21.
94. Pascual, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A., Gimenez, M.N., Collins, M.D. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45: 724–728.
95. Paton M, Rose I, Hart R, Sutherland S, Mercy A, Ellis T. Post-shearing management affects the seroincidence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks. *Prev Vet Med* 1996;26(3-4):275-284.
96. Paton MW, Rose IR, Hart RA, Sutherland SS, Mercy AR, Ellis TM, *et al.* new infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust Vet J* 1994; 71:47-49.
97. Paule, B. J. A., Azevedo, V., Regis, L. F., Carminati, R., Bahia, C. R., Vale, V. L. C., ... & Meyer, R. (2003). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and

- interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Veterinary immunology and immunopathology*, 96(3-4), 129-139.
98. Pépin, M.; Pardon, P.; Marly, J.; Lantier, F. (1988). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in external ear. *Am J Vet Res* 49 (4):459- 63.
- Pinochet, L. (1992). Linfadenitis Caseosa-un problema aún sin solución. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 14(1).
99. Pinto, A.C., Caracciolo, G. de Sá P.H., Ramos, R.T.J., Barbosa, S., Barbosa, H.P.M., Ribeiro, A.C., *et al.* (2014). Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics*. 15: 14.
100. Primera, L., Zambrano, J., Boggiano, E., Vera, M., Carrero, L., Chirino, Z.C. (2016). Linfadenitis caseosa en rebaños ovinos de la península de Paraguaná, Municipio de Falcón, Estado de Falcón, Venezuela. *Revista Científica*. 26: 5-12.
101. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Microbiología veterinaria y enfermedades microbianas*. 2ª ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2011.
102. Riet-Correa F. *Doenças de ruminantes e eqüideos*. 3a ed. Santa Mariá : Pallotti. 2007
103. Rizvi, S., Green, L.E., Glover, M.J. (1997). Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Veterinary Record*. 140: 586-587.
104. Ruiz, H., Ferrer, L. M., Ramos, J. J., Baselga, C., Alzuguren, O., Tejedor, M. T., ... & Lacasta, D. (2020). The relevance of caseous lymphadenitis as a cause of culling in adult sheep. *Animals*, 10(11), 1962.
105. Ruiz, J.C., D'Afonseca, V., Silva, A., Ali, A., Pinto, A.C. (2011). Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*. 6: e18551.
106. Ruiz, L., Jerónimo, R.; Barrera Valle, M.; Frias, MT. (2007). Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. *RECVET*. 2 (8).

107. Sá, G.A. de., Borgues-do Carmo, F., Barbosa, P.R., Seyffert, N., Ribeiro, D., Pereira, L.A., *et al.* (2011). Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *The IIOAB Journal*. 2: 33-43.
108. Sá, M. da C.A. de., Gouveia, G.V., Krewer, C. da C., Veschi, J.L.A., Mattos-Guaraldi, A.L. de., Costa M.M. da. (2013). Distribution of *PLD* and *FagA*, *B*, *C* and *D* genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*. 36: 265-268.
109. Schiffler, B., Barth E., Daff'e, M., Benz, R. (2007). *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of a channelforming protein in the cellwall. *Journal of Bacteriology*. 189(21): 7709-7719.
110. Schreuder BE, Ter Laak EA, De Gee AL. *Corynebacterium pseudotuberculosis* in milk of CL affected goats. *Vet Rec* 1990; 127(15): 387.
111. Sellyei, B., Bányai, K., Bartha, D., Hajtós, I., Fodor, L., Makrai, L. (2017). Multilocus Sequencing of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biotype Ovis Strains. *BioMed Research International*. 1: 1-7.
112. Senturk, S. y Temizel, M. (2006). Eficacia clínica de la rifamicina SV combinada con oxitetraciclina en el tratamiento de la linfadenitis caseosa en ovejas. *Registro veterinario*, 159 (7), 216.
113. Smith Bradford. P. (2015) Large animal internal medicine (5th edn. Ppp.1080-1083). Missouri: Elsevier
114. Songer JG., Beckenbach K., Marshall MM., Olson GB & Kelley L., (1988). Biochemical and Genetic Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 49, 223- 226.
115. Songer, J.G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*. 5: 156-160.
116. Sprake, P., Gold, J.R. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis* liver abscess in a mature alpaca (*Lama pacos*). *Canadian Veterinary Journal*.53: 387-390.

117. Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47(2): 479-491.
118. Stanford, K., Brogden, K.A., McClelland, L.A., Kozub, G.C., Audibert, F., 1998. The incidence of *caseous lymphadenitis* in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.* 1, 38-43.
119. Szwako, A., Ortiz, N., & Lopez, D. (2014). Prevalencia de Linfadenitis caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) en caprinos de establecimientos lecheros del departamento central-Paraguay, año 2012. *Compendio de Ciencias Veterinarias*.
120. Tadich, N., Alvarez, C., Chacón, T., Godoy, H. (2005). Linfadenitis Caseosa (LAC) en ovinos en la XI Región, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 37(2): 161-167.
121. Tarello, W., & Theneyan, M. (2008). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Corynebacterium renale* isolated from two Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *The Veterinary record*, 162(26), 862–863. <https://doi.org/10.1136/vr.162.26.862>
122. Tejedor, M. T., Martín, J. L., Lupiola, P., & Gutiérrez, C. (2000). Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in the dromedary camel. *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne*, 41(2), 126–127.
123. Tejedor, MT, Martín, JL, Corbera, JA, Shulz, U., & Gutiérrez, C. (2004). *Pseudotuberculosis* en dromedarios en Canarias. *Salud y Producción Animal Tropical*, 36 (5), 459.
124. Valdivia, P. (2013). "Identificación bioquímica de aislados bacterianos obtenidos de abscesos cutáneos en ovinos y caprinos del Estado de Jalisco, México". Tesis de licenciatura, FMVZ., Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
125. Valero, G., Alley, M. R., & Manktelow, B. W. (1992). A slaughterhouse survey of lung lesions in goats. *New Zealand veterinary journal*, 40(2), 45–51. <https://doi.org/10.1080/00480169.1992.35696>

126. Varela, G.J.A., Montes de Oca, J.R., Acosta, D.J., Hernández, L.F., Morales, E.V., Monroy, S.H.G. (2018). First report of isolation and molecular characterization of the pathogenic *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico.
127. Villalonga D.V. (2013). Estudio de la etiología e impacto económico de los decomisos de un matadero de ovinos. Tesis Doctoral Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Depto de Medicina y Sanidad Animal p 51- 60
128. Von-Graevenitz, A. y Bernard, K. (2006). The Genus *Corynebacterium*-Medical. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (Ed.) *The Prokaryotes*. New York, USA: Springer.
129. Williamson L. H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 17(2), 359–vii. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30033-5](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30033-5)
130. Windsor P. Managing control programs for ovine Caseous lymphadenitis and Paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Vet Med Auckl* 2014; 5: 11-22.
131. Windsor PA. Control of Caseous Lymphadenitis. *Vet Clin Food Anim* 2011; 27: 193–202
132. Yeruham, I., Elad, D., Friedman, S., Perl, S. (2003). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli dairy cattle. *Epidemiology and Infection*. 131: 947-955.
133. Yitagesu, E., Alemnew, E., Olani, A., Asfaw, T. y Demis, C. (2020). Análisis de supervivencia de casos clínicos de linfadenitis caseosa de cabras en North Shoa, Etiopía. *Medicina Veterinaria Internacional*, 2020.
134. Zhou, Z., Li, H., Zhang, M., Wang, Z., Zhou, R., Hu, S., ... & Zhu, Z. (2016). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain XH02 isolated from a Boer goat in Xuanhan, China. *Genome Announcements*, 4(6), e01329-16.

