



Academia Internacional
IAPAS
CIENCIAS
POLÍTICO-
ADMINISTRATIVAS
Y ESTUDIOS
DE FUTURO

***Actualidad y Prospectiva de la
Investigación Científica en el
Centro Universitario
Amecameca de la Universidad
Autónoma del***



COORDINADORES

Miguel Ángel Sánchez Ramos | Linda Guiliana Bautista Gómez



***Actualidad y Prospectiva de la
Investigación Científica en el
Centro Universitario Amecameca
de la Universidad Autónoma del
Estado de México***

COORDINADORES

Miguel Ángel Sánchez Ramos | Linda Guiliana Bautista Gómez

3





Consejo Científico

Bernardo Kliksberg
ORGANIZACIÓN DE LAS
NACIONES UNIDAS

Luis F. Aguilar Villanueva
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Leonardo Morlino
LUISS UNIVERSITÀ GUIDO CARLI

Nuria Cunill Grau
UNIVERSIDAD DE LOS LAGOS-
CENTRO LATINOAMERICANO DE
ADMINISTRACIÓN PARA EL
DESARROLLO

Manuel Villoria Mendieta
FUNDACIÓN ORTEGA Y GASSET

Diego Valadés Ríos
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Roberto Moreno Espinosa
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO

Ricardo Carneiro
ESCOLTA DE GOVERNO PAULO
NEVES DE CARVALHO

Donald E. Klingner
UNIVERSITY OF COLORADO

Alejandro Romero Gudiño
UNIVERSIDAD PANAMERICANA

Juan de Dios Pineda
UNIVERSITY OF NEW MEXICO

Ricardo Uvalle Berrones
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Ricardo Varela Juárez
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Gianfranco Pasquino
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Enrique Cabrero Mendóza
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
DOCENCIA ECONÓMICAS

Fred Lazin
BEN-GURION UNIVERSITY OF THE
NEGEV

Juan Fernando Galván Reula
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Mario Martín Bris
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

María P. Aristigueta
UNIVERSITY OF DELAWARE

Rubén Garrido Yserte
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Carles Ramió Matas
UNIVERSITAT POMPEU FABRA

Rafael Bañón i Martínez
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

José Manuel Canales Aliende
UNIVERSIDAD DE ALICANTE

Guillermo Escobar Roca
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

María del Carmen Rubio
Armendariz
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Judit Bokser Misses-Liwerant
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Adriana Plasencia Díaz
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Consejo Directivo

Roberto Moreno Espinosa
PRESIDENTE

Oscar Mauricio Covarrubias Moreno
VICEPRESIDENTE

Elena Jeannetti Dávila
DIRECTORA DE DESARROLLO ACADÉMICO

César Nicandro Cruz Rubio
DIRECTOR DE PROMOCIÓN Y DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Adriana Plasencia Díaz
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN Y LOGÍSTICA

Rodolfo Ortiz Ortiz
DIRECTOR DE DESARROLLO INSTITUCIONAL

José Antonio Rosique Cañas
DIRECTOR DE RELACIONES INTERNACIONALES

Rogelio Rodríguez Rodríguez
DIRECTOR DE RELACIONES CON HISPANOAMÉRICA

José Morales Ramírez
DIRECTOR DE VINCULACIÓN INSTITUCIONAL

Juan Miguel Morales y Gómez
DIRECTOR DE ADMISIÓN Y MEMBRESÍA

Miguel Moreno Plata
DIRECTOR DE ESTUDIOS DE FUTURO

María de los Ángeles Maya Martínez
TESORERA

Jorge Enrique Pérez Lara
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y REPRESENTANTE LEGAL

Actualidad y Prospectiva de la Investigación Científica en el Centro Universitario Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México
ISBN: 978-607-98268-6-4

Autor: Sánchez Ramos, Miguel Ángel (coordinador)
Bautista Gómez, Linda Guiliana (coordinadora)

Edición/corrección de estilo:
María Concepción Beltrán López

Editorial: Academia Internacional de Ciencias Político-Administrativas y Estudios de Futuro

Materia: Multidisciplinaria

Publicado: 2021-10-04
No de Edición: 1

Idioma: Español

Hecho en México / *Made in Mexico* Cada uno de los capítulos que integran este volumen fueron sometidos a dictamen a través del sistema de *doble ciego o de pares*, a fin de lograr una mayor consistencia y rigor científico.

La Academia Internacional de Ciencias Político Administrativas y Estudios de Futuro, AC (AICPAEF) o *International Academy of Political & Administrative Sciences and Future Studies* (IAPAS-FS) -por su denominación y siglas en inglés- es una iniciativa impulsada por una red de investigadores a nivel internacional, para contribuir al debate y la generación de nuevo conocimiento en las ciencias político administrativas y escenarios de futuro en favor del desarrollo.

www.iapas.mx

Email: jorge.perez@iapas.mx

Twitter: @iapasfs **Facebook.com/IAPASF**

Documento editado y preparado por:
Miguel Ángel Sánchez Ramos, y Linda Guiliana Bautista Gómez

Antiguo Camino a San Pedro Mártir No. 42, Casa 5,
Colonia Villa Tlalpan, Alcaldía Tlalpan. Ciudad de México, 14630, México

Registro RENIECYT: 1800606

ISBN: 978-607-98268-6-4

El contenido de los capítulos es responsabilidad de los autores.



Licencia *Creative Commons License 3.0* Reconocimiento-No Comercial-Sin Obras Derivadas. Usted es libre de copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra bajo las condiciones siguientes: Reconocimiento - Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra). No comercial - No puede utilizar esta obra para fines comerciales. Sin obras derivadas - No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
Más información en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>

Linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos, vacunas y perspectivas de investigación en México

Roberto Montes de Oca Jiménez^{1*}, Maria Carla Rodríguez Domínguez²

Humberto Gustavo Monroy Salazar³.

Resumen: La linfadenitis caseosa es una enfermedad que afecta la producción ovina y caprina a nivel mundial. El agente etiológico es una bacteria Gram positiva, intracelular facultativa denominada *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. La enfermedad puede cursar con un desarrollo cutáneo o visceral, provocando pérdidas en la producción de leche y carne, decomiso de las canales, rechazo de las pieles y como consecuencia, grandes pérdidas económicas. Existen vacunas comerciales pero la protección conferida por estas no ha sido eficaz en el control de la enfermedad. Actualmente el uso de nuevas tecnologías ha permitido la obtención y caracterización de proteínas con potencial inmunogénico para el desarrollo de nuevas vacunas, las cuales podrían ser una alternativa para incrementar la protección. El presente trabajo incluye una revisión de las temáticas referentes al microorganismo patógeno, las características de la enfermedad, así como las tendencias en el desarrollo de vacunas e investigación en México.

Palabras clave: Linfadenitis caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Vacunas, Investigación en México

Introducción

La Linfadenitis Caseosa (LAC) es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano, también llamada pseudotuberculosis o enfermedad de Preisz-Nocard, la cual conlleva a importantes pérdidas económicas en el sector ganadero, principalmente el ovino y caprino. El microorganismo agente causal de la enfermedad fue identificado en 1888 de un caso clínico de linfangitis en bovinos por Edmond Isidore Etienne Nocard y posteriormente en 1891 Hugo von Preisz aisló la bacteria de un absceso de riñón ovino. Como consecuencia de estos hallazgos el microorganismo se nombró como bacilo “Preizz-Nocard” y en 1948 se estableció según la 6ta edición del Manual del Bergy’s el nombre *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) (Von-Graevenitz y Bernard, 2006). La LAC ocasiona daños a la ganadería a nivel mundial, con pérdidas de rendimiento en el rebaño, con menor ganancia de peso y decomiso de las 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).

La LAC ha sido identificada en diversos países, dentro de los que se encuentran productores ovinos de reconocimiento mundial, como Australia (Windsor., 2014), Nueva Zelanda (Valero *et al.*, 1992), China (Gao *et al.*, 2018), Estados Unidos (Williamson, 2001), Canadá (Debien *et al.*, 2013), Brasil (de Farais *et al.*, 2019) y México (Parise *et al.*, 2018). La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial aunque a veces es poco notificada, siendo identificados como factores de riesgo el tipo de explotación y los protocolos de manejo y control establecidos en las granjas.

Encuestas epidemiológicas realizadas en Australia, uno de los principales países productores y exportadores de pequeños rumiantes (Behrendt y Weeks, 2019), evidencian que la enfermedad se encuentra distribuida en granjas de diferentes regiones del país como Nueva Gales del Sur (97%), región de Victoria (91%) y en Australia occidental (88%). Un análisis de la prevalencia de la enfermedad se realizó a partir del muestreo de 1, 604,659 ovejas sacrificadas, indicando que la enfermedad estaba presente en la región de Victoria para un 12.9%, Tasmania con 12.8% seguido de

¹ *Roberto Montes de Oca Jiménez, Profesor de Tiempo Completo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, CP 50295, Toluca, Estado de México. Profesor del Centro Universitario UAEM. Amecameca. Carretera Amecameca – Ayapango. Amecameca, Estado de México. México. C.P. 50900.

³ Humberto Gustavo Monroy Salazar, Profesor de Tiempo Completo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, CP 50295, Toluca, Estado de México.

Australia del Sur con 9.5%, Nueva Gales del Sur con 5.3%, 4.8% para Queensland y 1.0% en Australia Occidental (Windsor y Bush, 2016; Bush *et al.*, 2012).

En los últimos años China se ha ganado un lugar importante entre los países productores de ovinos, y a su vez se han intensificado los estudios para el aislamiento y secuenciación del genoma completo de nuevas cepas de *C. pseudotuberculosis* (Zhou *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018). En el Suroeste de China el análisis de abscesos externos de cabras de la región, resultó en la presencia de un 39.22 % (40/102) de aislados identificados como *C. pseudotuberculosis*, así como se amplificaron genes de virulencia y de diferenciación entre el biovar *ovis* y *equi* (Li *et al.*, 2018a).

En Estados Unidos y Canadá también la LAC es considerada una enfermedad causante de importantes pérdidas económicas en la industria de pequeños rumiantes (Williamson *et al.*, 2001; Promed, 2007). En Canadá el análisis de 157 muestras permitió la identificación de *C. pseudotuberculosis* en el 24.3% del total de casos, con formación de abscesos como manifestaciones clínicas de la enfermedad en el 54.1% (Debien *et al.*, 2013).

En Brasil se han realizado diversos estudios que evidencian la presencia de enfermedad, la cual se encuentra ampliamente extendida por todo el país. En la región de Río de Janeiro de un total de 202 muestras evaluadas por la técnica de PCR (por sus siglas del inglés, *Polymerase chain reaction*), se identificó *C. pseudotuberculosis* en el 54% de las muestras evaluadas (Nassan *et al.*, 2015). En la región Noreste del país se realizó un estudio de sero-prevalencia por técnica de ELISA, a nivel de granja y hospedero, con la evaluación de un total de 230 instalaciones y 2744 muestras de sueros de cabras, estimándose valores de prevalencia de un 87.8% y 30.3% respectivamente, lo que indicó la presencia del patógeno en los rebaños de esta región (de Farias *et al.*, 2019).

En México diversos estudios han demostrado la presencia de la LAC en los rebaños ovinos y caprinos en diferentes regiones del país. En el 2015 se evaluaron un total de 160 muestras de casos clínicos del Estado de Jalisco, de las cuales se realizó el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* de 57 de las muestras. Los aislados se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas convencionales, bacteriología miniaturizada API Coryne e identificación molecular mediante PCR, obteniéndose una frecuencia del 33% (Varela *et al.*, 2018). Por otra parte se ha estudiado la secuencia del genoma completo de seis cepas de origen mexicano obtenidas de casos clínicos de diferentes tipos de hospederos (equino, ovino y caprino), cuyas secuencias se encuentran reportadas en la base de datos del GenBank (Muñoz *et al.*, 2016; Parise *et al.*, 2018).

Debido a su elevada incidencia a nivel mundial, la LAC constituye una de las enfermedades de mayor relevancia para el sector productor y científico, los cuales trabajan en conjunto para dar solución a esta problemática. Las estrategias actuales de las investigaciones asociadas a esta enfermedad están dirigidas hacia la identificación y caracterización del microorganismo agente causal, el desarrollo de vacunas y nuevos medios diagnósticos. En este capítulo abordaremos los temas referentes a las características principales de la bacteria, la enfermedad, las estrategias de vacunas y los avances de investigaciones desarrolladas en México.

Corynebacterium pseudotuberculosis

El agente etiológico causal de la LAC pertenece al phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Corynebacteriaceae*, género *Corynebacterium*, especie *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* (Von graevenitz y Bernard, 2006; Bernard y Funke, 2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis* es una bacteria Gram-positiva con morfología cocobacilar, de amplitud de 0.5-0.6 μm y 1.0-3.0 μm de longitud. Es un microorganismo intracelular facultativo, que no presenta flagelos, no forma esporas ni capsula, con un contenido G+C de aproximadamente 51 a 68%. Es un patógeno anaerobio facultativo, que puede utilizar como fuente de carbono la glucosa, maltosa, galactosa y la lactosa, sin producción de gases (Dorella *et al.*, 2006a; Ruiz *et al.*, 2011). En medio geloso sangre a las 24 horas de incubación se evidencia la formación de colonias de tamaño de 1mm y color blanco grisáceo. Posteriormente pasadas las 48 a 72h a 37°C las colonias crecen alcanzando

3 mm de diámetro, el color se torna más blanco, son secas y rodeadas por una zona de beta hemólisis (Bastos *et al.*, 2012). El uso de caldo de Infusión Cerebro-Corazón, BHI (por sus siglas en inglés, *Brain Heart Infusion*) permite un crecimiento abundante con sedimento de color blanco amarillento (Pacheco *et al.*, 2011). Las cepas de *C. pseudotuberculosis* son clasificadas en biovar *equi* si presentan la enzima nitrato reductasa (nitrato-positivo) y *ovis* para las que no presentan la actividad enzimática y no reducen nitratos a nitrito (nitrato-negativo) (Dorella *et al.*, 2006).

La pared celular presenta una estructura y composición compleja, con presencia de ácidos micólicos (ácidos corynomicólicos) de aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono que se unen a una red de heteropolisacáridos formados por arabinogalactanos, glicolípidos y proteínas. A diferencia de los ácidos grasos lineales de los fosfolípidos, los ácidos corynomicólicos son ácidos grasos hidroxil- β -ramificados, que requieren carboxilación y condensación de dos ácidos grasos para su síntesis (Burkovski *et al.*, 2013). Estos ácidos micólicos se encuentran unido a trehalosa en sus extremos más expuestos al exterior de la bacteria y forman una barrera, con permeabilidad selectiva, mediada por proteínas integrales de membranas llamadas porinas. Extractos lipídicos de *C. pseudotuberculosis* se han utilizado para la infección experimental *in vitro* de células de macrófagos de ovejas, donde se constató que afectan la actividad glicolítica, la viabilidad celular así como la integridad de la membrana. Estas moléculas lipídicas también se asocian con mecanismo de protección de la bacteria, ya que actúan como barrera que proporciona impedimento estérico contra las lisozimas, evitando que estas puedan acceder a los enlaces del peptidoglicano (Burkovski *et al.*, 2018). Por otra en ovinos como modelo experimental se han estudiado los efectos de la inoculación de ácidos corynomicólicos, demostrándose aumentos significativos en los niveles de haptoglobina (Hp), así como también de amiloide sérico A (SAA), lo que indica su potencial virulento, siendo por sí solos capaces de inducir en el hospedero el aumento de estas proteínas indicadoras de inflamación e infecciones agudas (Odhah *et al.*, 2018). Estudios histopatológicos en ovejas infectadas experimentalmente con ácidos corynomicólicos han permitido identificar lesiones en el sistema reproductivo como congestión, degeneración y necrosis (Jesse *et al.*, 2020). Estas moléculas lipídicas constituyen factores de virulencia de gran importancia a considerar para el diseño de nuevos fármacos terapéuticos y el desarrollo de vacunas contra esta enfermedad.

La mayoría de los genes de virulencia de *C. pseudotuberculosis* están agrupados en el genoma en regiones denominadas islas de patogenicidad (PAIs, del inglés, *Pathogenicity islands*). En *C. pseudotuberculosis* se han identificado 16 PAI, denominadas PiCp, donde en la PiCp1 se identificó un gen de transposasa que probablemente fue el responsable de la incorporación de estas estructuras en el genoma. Estas regiones contienen varios genes implicados en la adhesión, invasión, colonización, propagación dentro del hospedero, supervivencia en el interior de las células infectadas y la evasión del sistema inmune (Ruiz *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2017).

Las secuencias de las PiCp tienen un alto porcentaje de similitud (82–100%) intra-biovar en las cepas *ovis* a diferencia de los niveles de similitud (78–91%) estudiados en el biovar *equi*. Las cepas biovar *ovis* tienen un patrón de delección conservado en las mismas islas de patogenicidad, independientemente del aislamiento o cepa, mientras que para el biovar *equi* estas regiones del genoma presentan grandes delecciones y menor nivel de similitud intra-biovar (77–88%) y en comparación con las PiCp de biovar *ovis* (62-74%) (Soares *et al.*, 2013).

La exotoxina Fosfolipasa D (PLD) es una proteína de 31.4KDa que constituye el factor de virulencia más importante de esta bacteria (Sá *et al.*, 2013), cuyo gen *pld* se identificó formando parte de la isla de patogenicidad PiCp1 (Hodgson *et al.*, 1990). La comparación de la secuencia de la proteína PLD reveló que presenta mayor similitud con Fosfolipasa A2 (Hodgson *et al.*, 1990); clasificada como una Esfingomielinasa D (SMasa D; EC 3.1.4.41), que cataliza la escisión hidrolítica de la esfingomielina para producir colina y ceramida 1-fosfato o colina y ácido lisofosfatídico (LPA) (Dias-Lopes *et al.*, 2013). Las características de esta proteína han sido estudiadas en comparación con proteínas similares de otros organismos como la SMDasa de *Loxosceles spp.* (araña), con la cual comparte un 30% de similitud de secuencia y efectos fisiopatológicos tales como: agregación plaquetaria, hiperpermeabilidad endotelial, hemólisis y necrosis cutánea dependiente de neutrófilos (Cordes y Binford, 2006).

La actividad enzimática de la PLD se centra principalmente en la degradación de la esfingomielina componente principal de las membranas celulares endoteliales. Esta acción incrementa la permeabilidad vascular y junto con la capacidad de la bacteria de persistir en el interior de fagocitos, favorece el transporte y diseminación del patógeno hacia los nódulos linfáticos más cercanos al sitio de infección donde tendrá lugar la formación de abscesos (lesión característica de la enfermedad) (Hodgson *et al. al.*, 1994; Baird y Fontaine, 2007). Aunque su acción no se ha considerado directamente hemolítica, se ha informado que es capaz de producir hemólisis sinérgica (Jost y Billington, 2004). La presencia de la enzima en cultivos bacterianos de *C. pseudotuberculosis* se puede determinar mediante la siembra de este microorganismo en conjunto con *Rhodococcus equi* donde se produce hemólisis sinérgica o también mediante inhibición de la β -hemolisina del *Staphylococcus aureus*.

Es importante destacar que *C. pseudotuberculosis* es un microorganismo que puede infectar a un amplio rango de hospederos. El biovar *ovis* ha sido identificado en ovinos, caprinos (Ruiz *et al.*, 2011; Varela *et al.*, 2018), antílopes (Muller *et al.*, 2011), bovinos (Silva *et al.*, 2011), alpacas (Sprake y Gold, 2012), llamas (Lopes *et al.*, 2012), cabra montés (Colom-Cadena *et al.* 2014), y cerdos (Oliveira *et al.*, 2014). Por su parte el biovar *equi* ha sido obtenido de lesiones de tipo absceso de tejido muscular del área pectoral de equinos (Muñoz *et al.*, 2016), así como en camellos (Borham *et al.*, 2017) y bovinos. Es un microorganismo zoonótico por lo que también afecta al hombre siendo considerada una enfermedad ocupacional (Fernández-Alonso *et al.*, 2018). Los casos de infecciones en humanos se han reportado en países como Australia (Bernard, 2012), Nueva Zelanda (Lester *et al.*, 1997), Francia (Troost *et al.*, 2010) y China (Bastos *et al.*, 2012).

La estructura genética de la bacteria ha sido caracterizada por diversos investigadores, destacándose en el análisis del Pan-genoma de 15 cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas de diferentes tipos de hospederos la presencia de 314 genes ortólogos compartidos entre las cepas del biovar *ovis*, que a su vez están ausentes de una o más cepas del biovar *equi*. Para el caso de las cepas biovar *equi* estas solo presentan alrededor de 95 genes ortólogos que pueden encontrarse o no en las cepas del biovar *ovis*. La mayoría de los genes que presentan variaciones en su secuencia en el caso del biovar *ovis* se adquirieron mediante transferencia horizontal y se conservan en diferentes cepas, mientras que el biovar *equi* contienen gran variabilidad, tanto intra como inter-biovar (Soares *et al.*, 2013). Otros autores consideran que *C. pseudotuberculosis* se encuentra en una fase de surgimiento de nuevas especies debido a la evolución progresiva de los caracteres genéticos que aparecen o se modifican, lo cual puede alterar la frecuencia genética (Oliveira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017a). El análisis de la secuencia genética de la cepa 162 clasificada como biovar *equi* (nitrato positiva), mostro una tendencia hacia la cercanía filogenética con respecto a las cepas biovar *ovis*. Probablemente este acercamiento filogenético se debe a que presenta mutaciones específicas detectadas en cepas del biovar *ovis*. Con respecto a esta observación los autores sugieren que el biovar *ovis* pudo originarse a partir del biovar *equi* (Oliveira *et al.*, 2016).

El estudio a escala filogenómica de 29 cepas de *C. pseudotuberculosis* (biovares *ovis* y *equi*) obtenidas de diferentes hospederos, permitió identificar un total de 27 genes que experimentaron cambios adaptativos. El análisis del dendograma permitió comparar los clados en función de las diferentes especies, biovares, genes específicos y genes que responden a la presión selectiva, mostrando diferencias que indican la adaptación y la especialización en diferentes clados. El hecho de que algunos de estos genes en evolución tienen homología con factores de virulencia conocidos, genes de resistencia a los antimicrobianos y objetivos farmacológicos muestra que este tipo de análisis podría utilizarse para identificar nuevas moléculas dianas para el control de este patógeno (Viana *et al.*, 2018).

La capacidad de supervivencia de *C. pseudotuberculosis* se ha estudiado en diferentes condiciones ambientales y superficies. En este sentido se realizó un trabajo en la región del noreste semiárido de Brasil, donde se determinó la supervivencia de cuatro cepas de *C. pseudotuberculosis*, en tallo y espinas de cuatro especies de plantas (*Cereus jamacaru* (mandacaru), *Poincianella microphylla* (catingueira), *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) y *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta). Las diferencias en el tiempo de supervivencia de la bacteria se asociaron a la actividad antimicrobiana de cada especie de planta y a la morfología. La superficie de las plantas mientras más rugosa, permiten mayor retención de humedad, nutrientes y menor exposición al sol,

aumentando la supervivencia de *C. pseudotuberculosis*. En este estudio la pérdida de humedad se asoció con una reducción en las tasas de supervivencia de *C. pseudotuberculosis*. También se analizó la supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en muestras de suelo con residuos orgánicos, madera (10cm x 3cm), espinas de mandacaru y alambre galvanizado (5 cm x 5 cm), con incubación a diferentes temperaturas (28 °C, 37 °C y 42 °C). La media de los valores obtenidos indicó que el mayor periodo de supervivencia tiene lugar en alambre (93 días), madera (78 días), seguido de suelo (63 días) y espinas (54 días). En condiciones de suelo seco, con diferente humedad relativa, la supervivencia fue de 39 días (Sá *et al.*, 2018).

La evaluación de la presencia de *C. pseudotuberculosis* en diferentes regiones de la provincia del Chubut (Patagonia), basados en el análisis de 5 muestras de suelos con características fisicoquímicas diferentes en lo que respecta a contenido de materia orgánica (alto o inexistente), pH (neutro u alcalino), conductividad eléctrica (soluciones salinas) y textura (arenosa, arcillosa y franco-limosa), permitió determinar que el 60% de *C. pseudotuberculosis* sobrevivió un periodo comprendido entre 80 - 210 días. El estudio concluyó que la supervivencia de la bacteria se favorece por el contenido de materia orgánica sumado a la textura franco-limosa del suelo, sin influencia de factores como el pH y la salinidad (Alvarez *et al.*, 2017).

Linfadenitis Caseosa

La enfermedad se caracteriza por la formación de abscesos a nivel cutáneo y/o visceral (Mahmood *et al.*, 2015), causando en menor frecuencia afectaciones neonatales, icterohemoglobinuria, artrosinovitis, endometritis, mastitis y orquitis, con la posibilidad de presentación de diversas manifestaciones de la LAC en un mismo hospedero (Othman *et al.*, 2016).

Las lesiones cutáneas se caracterizan por la presencia de abscesos en ganglios linfáticos subcutáneos, nódulos con engrosamiento de tamaño variable, visibles y palpables a través de la piel con localización que depende en gran medida del sitio de inoculación o entrada de la bacteria al organismo. Los abscesos son redondos, con encapsulación 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 ganglios linfáticos 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 ganglios internos necróticos encapsulados pueden ser compatibles con un desarrollo aparentemente normal, asintomático (Odhah *et al.*, 2017; Odhah *et al.*, 2019).

La transmisión horizontal de la enfermedad se favorece mediante contacto con alimentos o inhalación de polvos contaminados con el microorganismo, así como por heridas ocasionadas durante el pastoreo o la esquila. A través de un modelo matemático basado en la localización de los abscesos, se postularon tres vías de transmisión posibles: vía cutánea abierta a abierta, vía respiratoria a cutánea abierta y vía respiratoria a respiratoria. En la comparación de cuatro granjas del Norte de Irlanda, con animales infectados con *C. pseudotuberculosis*, el modelo estimó que la vía de transmisión número uno es la más frecuente, con valores de coeficiente de transmisión de 0.1087 en comparación con 0.0002 y 0.0014 obtenido para las otras dos vías propuestas respectivamente. El modelo consideró la vía de transmisión cutánea en función de la formación de abscesos cutáneos (visibles) en linfonodos parotidos, linfonodos submandibulares, linfonodos prefemorales, linfonodos poplíteos y linfonodos mamarios. Por otra parte la vía de transmisión respiratoria se estimó en función de los abscesos formados en los pulmones y linfonodos mediastínicos y bronquiales. El tiempo promedio para desarrollar la infección cutánea fue estimado en 1 a 12 días y para el desarrollo de la infección respiratoria de 1 a 41 días. El 25% de los animales que desarrollaron abscesos cutáneos derivaron en una infección respiratoria. Los autores proponen que debido al elevado coeficiente de transmisión de la vía uno, los abscesos cutáneos son la principal fuente de transmisión y propagación de la infección durante una epidemia. También se estimó que el período de transición para considerar la LAC como una enfermedad endémica sería de 2 a 3 años, aunque en el estudio no se consideraron las prácticas de manejo (O'Reilly *et al.*, 2008). Otros autores han descrito que la transmisión de la infección se puede producir debido a un

inadecuado manejo y empleo de utensilios de esquila y castración contaminados, ya que están expuestos a las descargas purulentas de las lesiones superficiales. El uso frecuente de vallas con alambre de púas provoca lesiones en la piel, que hacen más susceptible al animal a contraer la infección por vía cutánea (Heidrum *et al.*, 2005). Por otra parte la incidencia de LAC en 126 grupos de ovejas, de 1 y 2 años de edad, en 70 rebaños de Australia Occidental, se relacionó con los baños para el control de ectoparásitos después de la esquila. Mantener a las ovejas juntas durante 1 hora después de la esquila aumentó tres veces las probabilidades de estar en categorías de alta incidencia de LAC. La sero-prevalencia aumentó dentro de cada grupo, sugiriendo que existe mayor propagación de la enfermedad entre las ovejas esquiladas juntas (Paton, 1996).

La entrada de la bacteria puede ocurrir a través de lesiones en la piel, mismas que se producen como consecuencia de cortes de cola, marcaje de los animales, castración, esquila, baños o lesiones en la mucosa oral provocadas por alimentos o forraje espinoso (Dorella *et al.*, 2006a). El periodo de incubación puede durar de 2 semanas a meses, siendo muy variable (Al-Gaabary *et al.*, 2009; Odhah *et al.* 2017; Odhah *et al.*, 2019).

La infección primaria tiene lugar en el sitio de inoculación o entrada de la bacteria, con diseminación hematológica y linfática hacia los ganglios linfáticos (parótidos, submandibulares, prefemorales, preescapulares, poplíteos o mamarios) más cercanos. Los nódulos mandibulares y preescapulares son los más afectados de forma general (Al-Gaabary *et al.*, 2009).

Posteriormente se desarrolla una infección secundaria con formación de abscesos en ganglios linfáticos (torácicos, bronquiales y mediastínicos) y diversos órganos viscerales afectándose principalmente los pulmones. La enfermedad puede adoptar un curso crónico con evolución hacia la recuperación cuando el contenido purulento se libera al exterior, mientras que por el contrario la forma visceral grave provoca deterioro de la condición orgánica general del animal. Existe una relación directa entre la edad de los animales y la prevalencia de la enfermedad, la cual se ve favorecida en animales adultos mayores de 1 año (Chirino-Zarraga *et al.*, 2005; Al-Gaabary *et al.*, 2009).

La morfología de los ganglios linfáticos abscedados en ovinos es la característica de capas concéntricas de tejido, con apariencia de capas de cebolla, de distribución en láminas fibrosas separadas por material caseoso. Por el contrario, en cabras los abscesos no forman esta estructura definida y por lo general el exudado tiene composición de pasta uniforme seca. Se plantea que estas diferencias morfológicas pueden estar condicionadas por el tipo de enzima fagocítica de cada especie, donde en caprinos estas enzimas presentan mayor actividad lítica que en ovinos (Aleman y Spier, 2001).

El análisis histopatológico de abscesos ovinos ha permitido identificar en el centro de la estructura necrosis eosinófila, una capa fina de linfocitos, células plasmáticas, algunas células epitelioides y polimorfonucleares neutrófilos, rodeados por una red de fibroblastos (Baird y Fontaine, 2007). Las características clínicas incluyen, anemia, elevados valores de fibrinógeno, incremento en los niveles de anticuerpos (IgG) y aumento de Interferón gamma (IFN- γ) (Paule *et al.*, 2003; Odhah *et al.*, 2017). En cabras el estudio histopatológico de lesiones a nivel de sistema reproductivo y ganglios linfáticos tras la inoculación experimental con *C. pseudotuberculosis*, evidenció infiltración de leucocitos, congestión generalizada, degeneración, infiltración de células del estroma y necrosis en los ovarios. En animales inoculados con ácidos micólicos obtenidos de una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* se detectaron lesiones leves, moderadas y degenerativas en las trompas de Falopio (Jesse *et al.*, 2020). Los ovinos son una especie más sensible que las cabras al estímulo inhibitorio de la explosión respiratoria de los macrófagos y al efecto bactericida del suero, hecho que podría dificultar la eliminación del patógeno por el sistema inmunológico (Valdivia *et al.*, 2015). La presencia de ácidos coynomicólicos está estrechamente relacionada con la capacidad de desarrollar daños en ganglios poplíteos de oveja. Estas moléculas lipídicas constituyen un factor piogénico, que se relaciona con la habilidad de la bacteria para producir infiltración de células mononucleares, que transportan el patógeno a ganglios linfáticos, así como también con el efecto tóxico que origina la lisis de los macrófagos (Aleman y Spier., 2001; Burkovski *et al.*, 2018).

La exotoxina PLD participa activamente en el proceso de resistencia y supervivencia de la bacteria una vez fagocitada por los macrófagos, debido a los efectos de su acción enzimática que provoca la degradación de la

esfingomielina de las membranas celulares. La PLD ocasiona lisis celular, incrementa la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edema. La exotoxina actúa a nivel de células endoteliales presentes en el sitio de infección, así como en los macrófagos reclutados hacia esa región (Oliveira *et al.*, 2017a). Como consecuencia del transporte vía sistema linfático, ocurre la diseminación regional y sistémica del microorganismo con formación de abscesos en los ganglios linfáticos (Dorella *et al.*, 2006; Baird y Fontaine, 2007). La producción de isquemia se desarrolla debido a la oclusión de capilares y vasos por bacterias que escapan de la contención del absceso, lo cual en unión a la acción de la toxina aumenta la masa necrótica. Eventualmente el microorganismo pasa a vasos sanguíneos, vía hematogena desde el conducto eferente de los nódulos linfáticos abscedados con diseminación generalizada hacia órganos, donde se repite la producción de múltiples abscesos. Este comportamiento conlleva a la forma de la LAC visceral, con afectaciones en ganglios linfáticos internos y órganos especialmente pulmones e hígado (Mahmood *et al.*, 2015; Odhah *et al.*, 2019).

El hospedero para contener y eliminar la infección provocada por esta bacteria intracelular facultativa requiere fundamentalmente de la activación del sistema inmune celular, con mayor participación de los linfocitos T CD8⁺ para respuesta de citotoxicidad e hipersensibilidad retardada (Abbas *et al.*, 2018). *C. pseudotuberculosis* tiene la capacidad de evadir los mecanismos de eliminación de patógenos presentado por los macrófagos ya que presenta enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasas (SODs) (Oliveira *et al.*, 2017b) y Catalasa (Dorella *et al.*, 2006), que intervienen en la eliminación de algunas moléculas generadas en la cascada de reacciones iniciada por NADPH oxidasa fagocítica, eliminando productos reactivos del oxígeno y del nitrógeno. El análisis de cepas deficientes del Factor Sigma, evidenciaron que este se encuentra relacionado con la respuesta ante la acción del óxido nítrico liberado por los macrófagos como parte de mecanismos de eliminación de patógenos por estrés oxidativo (Pacheco *et al.*, 2012). La disminución de pH en el interior del fagolisosoma se ha asociado con un aumento en la expresión del gen *pld*, con producción de PLD, que participa en la lisis de la membrana del fagolisosoma liberando la bacteria en el citoplasma del macrófago (Oliveira *et al.*, 2017a).

Debido a la persistencia y la capacidad de supervivencia de la bacteria en el interior de los macrófagos, la liberación de citoquinas y el reclutamiento de células del sistema inmune provocan la formación de piogranulomas, estructuras formadas como secuencia de la acción del sistema inmune del hospedero para contener y restringir la diseminación bacteriana. El piogranuloma se forma por el acumulo de macrófagos infectados, células dendríticas, células epiteloides, linfocitos y citoquinas pro-inflamatorias. Los animales que desarrollan estas estructuras suelen padecer de una respuesta inmune vigorosa que conlleva a necrosis y fibrosis del granuloma (Paule *et al.*, 2003; Bastos *et al.*, 2012).

La producción de anticuerpos tiene lugar entre el 6 - 11 día post infección, con expresión IFN- γ de corta duración en etapas tempranas de la infección, seguido de un aumento significativo en una segunda producción de esta citoquina con concentraciones más prolongadas en el tiempo. Otras citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α e IL6 se detectaron en el sitio de inoculación, mientras que el IFN- γ se detectó en ganglios linfáticos drenados. La patogénesis de la LAC está estrechamente relacionada con la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y la formación de piogranulomas (El-Enbaawy *et al.*, 2005; Dorella *et al.*, 2009).

La determinación de la composición celular de lesiones pulmonares en ovinos infectados con *C. pseudotuberculosis* permitió establecer que existe un predominio de macrófagos aumentados de tamaño conformando las paredes del absceso, rodeando el parénquima pulmonar, con expresión principalmente de moléculas MHC II. Las células T fueron abundantes mientras que las células B y granulocitos se encontraron en menor cuantía en los infiltrados celulares. Las lesiones encapsuladas se caracterizaron por presencia de linfocitos en el interior de la masa necrótica, con representación de células CD5⁺, CD4⁺ y CD8⁺ distribuidas a través del tejido linfático. Generalmente en las lesiones caseosa inmaduras se encuentran linfocitos T CD4⁺ y en las lesiones más desarrolladas la concentración de células T CD8⁺ es predominante, lo que se relaciona con el mecanismo del sistema inmune para evadir la diseminación de los macrófagos infectados. El estudio evidenció el rol de los macrófagos, la respuesta mediada por MHC clase II y la participación de las células T en la patogénesis de esta enfermedad (Paule *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2009). La inducción de una respuesta del sistema inmune para lograr el control de la LAC, deberá estar enfocada hacia el estímulo de una respuesta T CD8⁺ (respuesta de memoria), que favorezca la eliminación de este patógeno intracelular

(Martin y Badovinac, 2018).

La característica principal de la infección por *C. pseudotuberculosis* es la formación de absceso a nivel de nódulos linfáticos superficiales; sin embargo, existen diferentes microorganismos como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Arthrobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Moraxella* spp., y *Pasteurella* spp (Ellis, 1991) que también pueden provocar la formación de abscesos cutáneos, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para la identificación diferencial de *C. pseudotuberculosis*. El diagnóstico se puede realizar mediante el empleo de pruebas bioquímicas convencionales (Almuzara *et al.*, 2006), moleculares como PCR multiplex (amplificación de segmentos de los genes ARNr 16S, *pld*, *rpoB*, *narG*) (Almeida *et al.*, 2017) y serológicas como ELISA (Barral *et al.*, 2019) y Western Blot (Baird *et al.*, 2010).

Las evidencias experimentales indican que *C. pseudotuberculosis* es sensible a diversos antibióticos *in vitro* (Robaj *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018); sin embargo, el tratamiento en campo tiene un valor limitado debido a que el microorganismo está protegido por su localización intracelular y por la cápsula de los abscesos (Aleman y Spier, 2001). Algunos trabajos se han enfocado en la búsqueda de compuestos alternativos al uso de antibióticos, extractos de *Moringa oleífera* (Fouad *et al.*, 2019), butirato de sodio (Zhou *et al.*, 2019) y nano partículas de plata (Santos *et al.*, 2019).

Las prácticas de manejo incluyen la inspección en busca de lesiones y abscesos en los ganglios linfáticos superficiales, en particular alrededor del área de la cabeza y el cuello. Como las lesiones pueden no ser visibles si son internas, un análisis serológico puede determinar la presencia de la enfermedad. La evidencia experimental ha demostrado que las lesiones pueden aparecer hasta 2 meses después de una infección primaria, por lo tanto los tiempos de cuarentena deben ser de al menos 2 meses, aunque a menudo esto no es práctico (Fontaine, 2015). Los animales confirmados como positivos deben ser mantenidos separados del resto del rebaño (O'Reilly *et al.*, 2008). La incidencia de la enfermedad aumenta con la edad, por lo que se recomienda que los animales mayores sean manipulados al final de la rutina, como procedimiento para minimizar el riesgo de propagación de la infección. No se debe dejar que un absceso madure y drene por sí solo puesto que conlleva a la contaminación de las instalaciones, suelo y alimento. Por lo que se recomienda el tratamiento quirúrgico de los abscesos maduros, con la incisión y drenaje del contenido purulento, siguiendo las medidas de higiene adecuadas. Esta práctica debe realizarse con guantes, asegurándose de coleccionar todo el material infeccioso, para su desecho posterior mediante incineración. En la herida se aplica yodo al 10%, repitiendo la práctica de drenado y desinfección cada dos o tres días hasta que el absceso cicatrice (Fontaine, 2015).

La desinfección de las áreas (corrales y cobertizos) y materiales de esquila se recomienda como práctica que ha demostrado disminuir la incidencia de la enfermedad. La susceptibilidad de *C. pseudotuberculosis* al tratamiento con compuestos cuaternarios de amonio demostró ser eficaz en la eliminación de la bacteria presente en tijeras de podar, cortadores y peines contaminados. En este trabajo también se eliminó la bacteria tras una exposición de 30 segundos a una dilución de 1:200 de desinfectantes con compuestos cuaternarios de amonio y en 10 min con una dilución de 1:10⁴. La descontaminación de los utensilios de esquila contaminados experimentalmente con *C. pseudotuberculosis*, demostró que durante 40 min a 40 °C la bacteria disminuyó de 6.67 a 5.95 log y de 6.67 a 4.55 log a una temperatura de 50 °C durante 60 min, siendo constantes los valores de las bacterias sobrevivientes. La inactivación se logró a 65 °C luego de 5 min de exposición (Estevao *et al.*, 2014). En otro trabajo se evaluó el efecto de los desinfectantes clorhexidina (0.5%), hipoclorito (0.125%) y compuesto cuaternario de amonio (15%), suministrados en intervalos de 15 días sobre diferentes materiales: suelo, áreas de cobertura vegetal, madera y tejas. En condiciones experimentales los materiales se contaminaron con 10⁶ UFC de *C. pseudotuberculosis* manteniéndose a temperatura ambiente (28°) por 48 h. El compuesto cuaternario de amonio fue más eficiente en eliminar la bacteria en comparación con el resto de los desinfectantes evaluados (Sá *et al.*, 2018). Para complementar las medidas de control se deben combinar buenas prácticas de manejo y la aplicación de programas de vacunación.

Vacunas

Existen vacunas comerciales que se han empleado principalmente en Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos, las cuales han contribuido en disminuir la incidencia y severidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, a pesar de que no logran un control total en los rebaños vacunados. La mayoría de las vacunas comerciales son polivalentes presentando una combinación de antígenos de varios agentes patógenos incluyendo *C. pseudotuberculosis*. Las formulaciones comerciales se desarrollan principalmente mediante la inactivación de cultivos bacterianos totales, que presenten elevadas concentraciones de la PLD, ya que se considera una de las moléculas con mayor potencial inmunogénico para esta enfermedad (El-Enbaawy *et al.*, 2005).

La vacuna Glanvac 3 (Zoetis, London) es de tipo toxoide, que combina toxinas de *Clostridium perfringens* Tipo D, *Clostridium tetani* y *C. pseudotuberculosis* con 0,1 mg/mL de Tiomersal como preservante (Zoetis, 2020). Esta se ha utilizado para el control de la LAC en granjas del Reino Unido donde los productores han reportado un buen control a nivel de campo (Fontaine, 2015; Silk y Lovatt, 2016).

De esta misma serie de vacunas la variante Glanvac 6® (Zoetis, West Ryde, Australia), constituye una formulación multicomponente que incluye antígenos inactivados y ultrafiltrados de *C. pseudotuberculosis* (PLD), *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novy* tipo B, *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei* (Paton, *et al.*, 1995). El uso de esta vacuna ha permitido la disminución de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, así como el desarrollo de la fase visceral y la producción de abscesos a nivel de pulmón. Para la aplicación de la vacuna se recomiendan dos dosis separadas por un 1 mes y un refuerzo cada año (Windsor, 2014; Windsor y Bush., 2016). Glanvac 6® es una de las vacunas más comercializadas, con uso rutinario en Australia, Canadá y Nueva Zelanda, sin embargo diversos estudios han manifestados que existe una pobre respuesta serológica y una respuesta protectora variada de lote a lote (Williamson, 2001; Windsor y Bush., 2016). Por otra parte en Canadá se llevó a cabo un estudio de eficacia para esta vacuna en relación con la vacuna comercial Case-Bac (Colorado Serum, EUA) y una vacuna experimental compuesta por muramil dipéptido. Los resultados indicaron que Glanvac 6® y la vacuna experimental presentaron un mayor título de IgG en comparación con Case-Bac; sin embargo, también se asoció la vacuna Glanvac 6® con mayor número de manifestaciones de alergia en el sitio de inoculación (Stanford *et al.*, 1998).

Biodectin™ (Zoetis, España) es otra de las vacunas comerciales inactivadas que están disponibles a nivel mundial. Esta consta de seis fracciones antigénicas: Moxidectina (antiparasitario), *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Tipo B, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* Tipo D, *C. pseudotuberculosis* y *Clostridium chauvoei*, hidróxido de aluminio y Tiomersal. Su uso en cronogramas de vacunación y desparasitación se recomienda en un volumen de 2mL (vía subcutánea) para animales de hasta 50kg y una dosis de 3mL en animales con un peso de 51 a 75kg. También se plantea la necesidad de la reactivación de la vacuna una vez al año y en ovejas gestantes de 4 a 6 semanas antes de la fecha del parto, con el fin de lograr tanto una transferencia óptima de los anticuerpos calostrales como para evitar la infestación parasitaria de los corderos (Zoetis, 2020).

La vacuna Case-Bac (Colorado Serum, EUA), se ha utilizado principalmente en Estados Unidos y su formulación se basa en la presencia de abundante toxina PLD. La administración de 2mL de Case-Bac se realiza vía subcutánea, con un refuerzo a las 4 semanas y anualmente. Se ha registrado que esta vacuna ocasiona reacciones adversas en el sitio de inoculación, así como letargo, rigidez y fiebre en caprinos (Williamson, 2001).

También existe la vacuna Caseous D-T (Colorado Serum, EUA) cuya composición se basa en la presencia de toxinas de *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani* y PLD de *C. pseudotuberculosis*. Este producto ayuda a la prevención y control de la LAC; sin embargo, se han identificado reacciones adversas como cojera (dolor) y letargo tanto en corderos como animales adultos (Valleyvet, 2020). Estudios previos han demostrado que Case-Bac previene la formación de abscesos internos y externos en ovejas infectadas experimentalmente con *C. pseudotuberculosis*. Se ha utilizado de forma limitada en caprinos ya que los efectos secundarios suelen ser más graves provocando fiebre, malestar general, edema ventral, ataxia y convulsiones, razón por la cual esta vacuna no cuenta con licencia para su uso en cabras (Williamson, 2001). También existe la vacuna de la USDA (Nacional Animal Disease Center, Ames, IA USA) que contiene pared celular de *C. pseudotuberculosis* no viable con o sin muramyl dipéptido y se utiliza en

Estados Unidos para la inmunización de ovejas y cabras (Bastos *et al.*, 2012).

Las vacunas comerciales confieren protección que se asocia principalmente con la inducción de una respuesta de tipo humoral, conformada por anticuerpos anti-PLD, que neutralizan esta toxina y disminuyen el daño tisular y la diseminación bacteriana. Sin embargo, la protección es parcial ya que no son capaces de inducir un aumento de la respuesta inmune de tipo celular, la cual es requerida para la resolución de infecciones intracelulares. Por tal razón las nuevas investigaciones se enfocan en el diseño de vacunas que estén guiadas a alcanzar una protección completa y eficaz. México no cuenta con empresas que brinden el servicio de comercialización de estos productos profilácticos, por lo que unido a la falta de eficacia de estos fármacos se hace más necesario el estudio y desarrollo de un fármaco de producción nacional (Zoetis, 2020).

El uso de las vacunas contra LAC en un rebaño infectado, con un alto índice de prevalencia, permite que disminuya el número de animales que llegan a desarrollar lesiones pulmonares. A medida que se sacrifican ovejas más viejas, la prevalencia de la enfermedad disminuye y con el tiempo existen menos ovejas portadoras de la enfermedad, disminuyendo la capacidad de propagación. Es importante que la vacunación sea aplicada siguiendo las recomendaciones del fabricante, ya que un estudio en Australia demostró que solo los productores que aplicaron según las recomendaciones 2 administraciones seguidas de vacunación de refuerzo anual, lograron disminuir la prevalencia promedio de LAC a un 3% en comparación con el 22% en rebaños con 2 dosis sin refuerzo anual, 29% en rebaños no vacunados, 31% en rebaños con una sola dosis y 33% en rebaños con una sola dosis y refuerzo anual (Windsor, 2011). Otros estudios realizados en Australia, país con largo historial en la aplicación de vacunas contra LAC, estimó que solo entre un 10-15% de los productores aplicaban correctamente la vacuna, lo cual podría relacionarse con la persistencia de la enfermedad a pesar de la vacunación. También se recomienda una inmunización de refuerzo antes del parto o la actividad de esquila. En corderos menores de 10 semanas la respuesta inmune ante la vacuna no es fuerte; sin embargo, se ha visto en rebaños comerciales que es práctico administrar la vacuna de 6 a 8 semanas después del inicio de la temporada de partos, con una segunda dosis de 4 a 5 semanas después. La protección de los corderos menores de 10 semanas probablemente sea satisfactorio, si no tienen un alto riesgo de exposición a la enfermedad y si reciben la segunda dosis. Estas medidas permitirían que los animales más jóvenes que ya están vacunados reemplacen a los más viejos infectados, para con el tiempo lograr disminuir la incidencia de la enfermedad en el rebaño (Windsor, 2014).

También se han evaluado vacunas inactivadas experimentales, formulaciones donde el microorganismo se encuentra muerto por lo que no confieren peligro de desarrollo de la enfermedad; sin embargo, la respuesta principalmente es de tipo humoral, menos intensa, requiere de altas concentraciones del microorganismo y de varias dosis (Jorge y Dellagostin, 2017). Un precipitado proteico, con elevada concentración de PLD inactivada, de una cepa de *C. pseudotuberculosis* aislada de alpaca en Perú se utilizó para la inmunización de 20 ratones BALB/c. La vacuna redujo los efectos tóxicos ante el desafío con 10^4 UFC de una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, lo cual se evidenció con una disminución de los abscesos (en cuanto a cantidad y tamaño) en el grupo vacunado con solo un 40% de animales afectados. En el caso del grupo control-no vacunado se formaron múltiples abscesos tanto a nivel subcutáneo como visceral en riñón e hígado, para un total de 95% de animales afectados. No se observaron diferencias estadísticas significativas en los niveles de anticuerpos entre los grupos control y vacunados (Medrano *et al.*, 2003).

Otro trabajo realizado en Egipto estableció una comparación entre la eficacia conferida por cuatro vacunas no comerciales en base a PLD como antígeno principal evaluadas en ovejas como modelo experimental. Como respuesta inmune inespecífica se evaluó la concentración de iones superóxido, la cual aumentó en todos los animales vacunados. La actividad de lisozimas fue superior en el grupo vacunado con PLD toxoide + bacterina, seguido de PLD toxoide, PLD + vacuna comercial Covexin8 (antígenos de *Clostridium spp.*, Schering Animal Health) y la vacuna experimental local. El grupo vacunado solo con PLD presentó una mayor respuesta de proliferación de linfocitos en comparación con el resto de los grupos. Los resultados indicaron que PLD estimuló la respuesta inmune celular específica e

inespecífica (Syame *et al.*, 2018).

Las vacunas atenuadas presentan microorganismos vivos que pueden desarrollarse en el hospedero, sin llegar a causar la enfermedad ya que no presentan algunas estructuras determinantes de virulencia. Estas logran inducir una respuesta inmune muy intensa y de larga duración ya que dan lugar a una infección similar a la natural. Sin embargo, hay que tener en consideración que al estar formadas por microorganismos vivos puede revertir la virulencia y desencadenar la enfermedad (Jorge y Dellagostin, 2017). Para LAC se evaluó el efecto de la cepa denominada Toxminus, cuyo gen *pld* cromosómico fue inactivado. La necropsia de los animales vacunados con 10^5 a 10^7 UFC de esta cepa atenuada evidencio que solo se formaron abscesos de 0.2cm y 1cm en solo dos animales en el sitio de inoculación de la cepa virulenta para el desafío. Mientras que los animales del grupo control desarrollaron abscesos de 2.5 cm en ganglios poplíteos. La capacidad de persistencia de la cepa atenuada Toxminus se vio afectada debido a la ausencia de PLD, así como también la producción de anticuerpos anti-PLD (Hodgson *et al.*, 1992). Por lo que en otro estudio se modificó la cepa Toxminus con un plásmido que contenía el gen de *pld* con una variación para la obtención de la exotoxina con un cambio de histidina por tirosina en la posición 20, lo que elimina la actividad enzimática. Sin embargo esta variación no mejoro los resultados alcanzados por el grupo anterior ya que de los animales vacunados el 50% de las ovejas desarrollaron abscesos, así como también el 66% de animales del grupo control no vacunado. Además la cepa atenuada *Toxminus* no permitió una expresión elevada de la proteína PLD, así como se evidencio la excreción de la bacteria viva atenuada en las heces (Hogdson *et al.*, 1994).

La cepa atenuada T1 fue evaluada en una concentración de 10^7 UFC/mL, como candidato vacunal en un modelo murino de ratones BALB/c para la determinación de la respuesta inmune humoral y celular. Los ratones vacunados no mostraron manifestaciones características de la enfermedad y el cultivo de las células del bazo de estos ratones estimuladas con antígenos secretados por T1, aumentaron su proliferación en comparación con los cultivos de células estimuladas con antígenos intracelulares de T1 (Vale *et al.*, 2016). Los resultados indican que los linfocitos fueron estimulados por la presencia de antígenos secretados, dentro de los que se encuentran las proteínas PLD y CP40, antígenos de relevancia inmunológica (Paule *et al.*, 2004). También la vacunación experimental con la cepa atenuada T1 aumentó los niveles de IgG subclases IgG1 e IgG2 y la producción significativa de IFN- γ (Vale *et al.*, 2016).

Las vacunas de ADN desnudo utilizan un vector o plásmido modificado con los genes de interés, que tiene la capacidad de replicarse en las células del organismo inmunizado para la producción de las moléculas inmunogénicas. Este tipo de vacunas solo están formuladas de ADN, y su eficacia depende de la capacidad del vector para expresar el antígeno inmunizante. En la mayoría de los casos presentan una baja actividad de adsorción, siendo limitada la entrada del material genético a la célula del hospedero.

Para la prevención de la LAC se evaluó un plásmido portador del gen que codifica para el dominio extracelular de CTLA-4 bovino fusionado al gen *pld* inactivado (boCTLA-4-HI γ - Δ PLD), como vacuna de ADN desnudo en un modelo ovino. El CTLA-4 es una molécula que media la unión con el antígeno de membrana B7 en células presentadoras de antígeno (APC), mejorando la respuesta inmune humoral. En este estudio aumentaron los niveles de significativamente, pero la protección de los ovinos inmunizados fue parcial ante el desafío experimental con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* (Chaplin *et al.*, 1999). Diferentes sitios de inoculación fueron evaluados para la aplicación de la vacuna de ADN desnudo como: vía intramuscular, subcutánea y bombardeo con pistola génica. La vacuna administrada por vía intramuscular presentó mejores resultados con niveles de protección similares a los observados en vacunas proteicas, mientras que subcutánea y con pistola genética no protegió a las ovejas contra el desafío bacteriano (De Rose *et al.*, 2002).

El potencial de otra vacuna basada en ADN con el empleo del plásmido pTARGET transformado para la producción de la proteína esterasa cp09720 se comparó con una vacuna de subunidades a partir de la esterasa CP09720 recombinante adyuvada con hidróxido de aluminio, ambas formulaciones evaluadas en ratones BALB/c (Brum *et al.*, 2017). La vacuna de subunidades recombinantes indujo mayor título de anticuerpos IgG1 (asociado a respuesta Th2) e IgG2 (respuesta celular Th1), a los 21 y 42 días post-inoculación. Las dos vacunas aumentaron la expresión de IFN- γ ; sin embargo, la vacuna de subunidades recombinante mostro niveles superiores de ARNm de IFN- γ . Los niveles de protección conferidos por las vacunas en los animales desafiados con la cepa virulenta MIC-6 fueron de 58.3% para la

vacuna de subunidades recombinante y de 16.6% para la vacuna de ADN pTARGET/ proteína esterasa cp09720 (Brum *et al.*, 2017).

Las vacunas de subunidades presentan múltiples moléculas que pueden ser de diferente naturaleza como lipopolisacáridos, proteínas recombinantes purificadas o péptidos sintéticos. Pueden utilizarse fragmentos de una molécula como esta en su totalidad, siempre y cuando se garantice que la región responsable de la patogenicidad o virulencia esté incluida. No se utiliza el microorganismo completo con lo que se evita el riesgo de desencadenar la enfermedad y la manipulación de grandes volúmenes de cultivo, que en caso de *C. pseudotuberculosis* es una ventaja fundamental ya que es zoonótico y puede afectar al hombre durante la producción de las vacunas. Estas vacunas no son muy inmunogénicas por lo que se requiere del empleo de adyuvantes que potencien la respuesta del sistema inmune (Jorge y Dellagostin, 2017).

Actualmente las nuevas estrategias para el diseño de vacunas contra la LAC se han enfocado al uso de proteínas obtenidas mediante tecnología de ADN recombinantes. La combinación de la proteína PLD recombinante con cultivos de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* y *equi*, inactivados con formalina, se utilizaron como vacunas para la inmunización de ovejas. Las formulaciones contenían cada una 50µg de proteína PLDr y 20mg de células inactivadas (vacuna 1 biovar *ovis* y vacuna 2 biovar *equi*). Los animales vacunados mostraron un incremento en el título de anticuerpos anti-PLD después de la segunda dosis de refuerzo. No se observaron lesiones en ganglios linfáticos externos e internos, en comparación con el grupo control no vacunado donde el 80% de los animales mostraron manifestaciones de la LAC. Las vacunas protegieron a los animales desafiados con la cepa virulenta y es relevante destacar que una de las formulaciones vacunales (biovar *equi* + PLDr) mostró resultados de la inmunización por primera vez de ovinos con una cepa del biovar *equi* (Moussa *et al.*, 2016).

La combinación de la proteína rCP09720 (estearasa) o rCP01850 (proteína L14 de unión a la subunidad 50S) y la rPLD obtenida por vía recombinante fue evaluada en un modelo murino de ratones BALB/c. Las tasas de supervivencia luego del desafío con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, fueron de 30% (rPLD), 40% (rPLD + rCP09720) y 50% (rPLD + rCP01850). La combinación de rCP01850 con rPLD mostro mayor porcentaje de protección (50% de los animales desafiados) con un aumento significativo en el título de IgG2. La vacuna fue capaz de aumentar la respuesta inmune de tipo celular ya que se mostraron niveles elevados de INF-γ y TNF-α, mientras que la producción de IL-4 e IL-12 no fue detectada (Silva *et al.*, 2018).

También se ha utilizado para la expresión de PLD vía recombinante una cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus-Calmette- Gueri) con el uso del plásmido pUS2000. El grupo de animales vacunas y desafiados con mayor porcentaje de protección fue el vacunado con *M. bovis* plásmido pUS2000/PLD+ 50µg de PLDr, para un 88% del total de animales, mientras que el grupo *M. bovis* plásmido pUS2000/PLD confirió un 77% y 66% para el grupo *M. bovis* no modificado (Leal *et al.*, 2018).

La proteína CP40 obtenida Vía recombinante también se ha utilizado para la formulación de vacunas de subunidades. Existen evidencias que demuestran la presencia de esta proteína en el sobrenadante de cultivo de la bacteria y a través de ensayos de inmunoblot, se observó que los sueros de animales vacunados con Glanvac 6 podían reconocer de manera intermitente esta proteína, lo que sugiere que está presente en algunos lotes de vacuna.

La inmunización de ovejas con 100µg/mL de la proteína CP40r confirió protección al 82% del total de animales, con una disminución de la formación de abscesos a nivel de pulmón en el 98% de los animales. Se plantea que los anticuerpos anti-CP40 podrían estar involucrados en la protección a través de mecanismos indirectos, como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. El suero de los animales vacunados se analizó mediante inmunoblot, mostrando una fuerte respuesta de anticuerpos específica, restringida a la proteína de 40 kDa (Hodgson *et al.*, 1994).

Cuatro formulaciones vacunales diferentes (en cuanto a concentraciones) que utilizaron como antígeno principal la proteína CP40 obtenida vía recombinante en combinación con la cepa atenuada CP09 se evaluaron para la determinación de la capacidad inmuno-protectora ante el desafío con 10⁴ UFC de la cepa virulenta MIC-6 en un modelo murino. La cepa viva atenuada CP09 en una concentración de 10⁶ UFC, no fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en los animales vacunados, ni desafiados, mientras que los animales vacunados con CP40r, así como la

combinación de la cepa atenuada CP09 + CP40r y el grupo con una dosis de CP40r seguido de una re-inmunización con la cepa CP09, presentaron un aumento significativo en los niveles de anticuerpos IgG1. Después del desafío los animales de todos los grupos aumentaron de manera significativa los niveles de IgG2, siendo el máximo alcanzado por los animales inmunizados con CP40r. Los anticuerpos de tipo IgG2 se relacionan principalmente con una respuesta inmune de tipo celular asociada a linfocitos Th1, los cuales median la eliminación de microorganismos intracelulares, activan macrófagos y células T citotóxicas, aumentan la producción de opsoninas y conducen a la activación del sistema complemento. La vacuna formulada con CP40r confirió protección al 90% de los animales ante el desafío con la cepa virulenta, seguido del grupo vacunado con la cepa atenuada CP09 + CP40r para un 70%. La inmunización con CP40r seguido de una segunda dosis formulada con CP09 solo protegió al 60%, mientras que la formulación a base de la cepa atenuada CP09 solo protegió al 50% de los animales. Estos resultados indican que las formulaciones con la proteína CP40 recombinante fueron más eficientes en la protección asociada a una respuesta celular Th1, en ausencia de un perfil Th2 después del desafío (Silva *et al.*, 2014).

La evaluación en ratones BALB/c de una vacuna de subunidades con la proteína CP40 recombinante adyuvada con saponina o adyuvante completo de Freud (ACF), mostró que la formulación CP40r/saponina aumentó los anticuerpos anti-CP40r IgG y de las subclases IgG2a, IgG2b e IgG3, con diferencia estadísticamente significativas con respecto al grupo control. Por otra parte el grupo de animales inmunizados con CP40r /ACF también presentó un aumento significativo en los niveles completos de IgG, IgG2a e IgG2b. Ambas vacunas experimentales protegieron al 100% de los animales desafiados con una cepa virulenta, a diferencia del grupo control negativo. Los resultados sugieren una tendencia hacia una respuesta de linfocitos Th1, mientras que los isotipos de anticuerpos asociados a una respuesta de tipo Th2, como IgG1 e IgG3, reaccionaron menos a la proteína CP40r. La evaluación de dos adyuvantes diferentes no influyó en la respuesta de anticuerpos; sin embargo, se ha demostrado que el adyuvante ACF es tóxico para ovinos por lo que se recomienda la Saponina como alternativa válida con la obtención de resultados similares. La saponina estimula la proliferación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos lo cual constituye una ventaja para la activación del sistema inmune celular y la resolución de infecciones intracelulares. La proteína CP40 recombinante fue capaz de inducir una respuesta tanto humoral como celular (Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

La identificación de nuevas moléculas con potencialidades para el desarrollo de vacunas así como medios diagnósticos constituye la meta a alcanzar en investigaciones futuras. La descripción de los mecanismos de patogenicidad y virulencia de la bacteria, es de suma importancia para establecer el rol de cada molécula y con ello identificar posibles nuevos candidatos vacunales. Los resultados más alentadores se han obtenido con formulaciones que utilizan las proteínas PLD o CP40, obtenidas por vía recombinante. Estas moléculas no se han evaluado en una misma formulación vacunal, lo cual sería una opción a considerar para favorecer tanto la respuesta inmune humoral como la celular, en base a sus capacidades individuales anteriormente comprobadas.

Perspectivas de la investigación sobre LAC en México

La ovinocultura en México es una actividad en pleno desarrollo, con una producción que aún no satisface la demanda, por lo que se importa carne de otros países como Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (FAO, 2018). Las importaciones de carne de ovino se han mantenido elevadas en los últimos años y actualmente oscilan entre el 43.5 al 50% del consumo nacional (Bobadilla-Soto *et al.*, 2017). Datos internacionales indican que la producción de carne de ovino continuara aumentando en la próxima década (13% entre 2017- 2027), impulsado fundamentalmente por la demanda de importaciones por países en desarrollo y China (Behrendt y Weeks, 2019).

México se encuentra en el tercer lugar de América en la producción de ovinos, con una población que ha incrementado a 8.7 millones de cabezas (SIAP, 2019). Los productores se han organizado en 3 uniones y 64 asociaciones especializadas de ovinocultores que se agrupan en la Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos, A.C. (AMCO), que a su vez forman parte de la Confederación Nacional de Organizaciones Ganaderas (CNOG). Con el propósito de lograr fortalecimiento gremial de la asociación se cambió el esquema de socios individuales por el de delegaciones estatales, sustentadas en asociaciones locales, integrando el Organismo de la Unión Nacional de

Ovinocultores (UNO).

A pesar de la existencia de numerosas empresas productoras y comercializadoras de fármacos veterinarios a nivel nacional, ninguna ofrece dentro de sus productos vacunas ni medios diagnósticos contra la LAC.

Existen grupos de investigación en el país consolidados en el estudio de la problemática que representa la Linfadenitis Caseosa. Los resultados obtenidos por los investigadores permitieron identificar en 160 muestras de ovinos provenientes del Estado de Jalisco un total de 57 aislamientos de *C. pseudotuberculosis*. Estos aislados se caracterizaron mediante pruebas bacteriológicas y moleculares con la amplificación de los genes *16S rRNA*, *rpoB* y *pld*. Además se identificaron genes involucrados en la virulencia y patogenicidad como: *fag A*, *fag B*, *fag C*, *fag D* y *hsp60*. El análisis filogenético de los aislamientos, en base a la secuencia parcial del gen *rpoB*, permitió identificar porcentajes de similitud entre 98, 99 y 100% con respecto a las secuencias reportadas a nivel mundial. El árbol filogenético agrupó los 57 aislados con cepas de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Los genes involucrados en la virulencia y patogenicidad se identificaron en el 98.2% de los aislamientos (Varela *et al.*, 2018).

En otro estudio se realizó la secuenciación del genoma completo de cepas obtenidas de diferentes regiones del territorio Mexicano. La cepa MEX1 (NZ_CP017711.1) fue obtenida de un absceso retrofaríngeo de cabra, en la región de Tlaxcala, mientras que MEX29 (NZ_CP016826.1) se aisló de absceso retrofaríngeo de oveja, en la región de Río Frío de Juárez, ambos aislamientos obtenidos con una distancia de 50 Km. También se estudió la cepa MEX25 (NZ_CP013697.1) la cual fue identificada de absceso parotídeo en oveja y la cepa MEX9 (NZ_CP014543.1) aislada de absceso pre-escapular en cabra, ambas cepas obtenidas de la región de Guanajuato, con una distancia de 450 Km con respecto a los aislados anteriores (Parise *et al.*, 2018). En el análisis se incluyeron cepas del biovar *equi*, MEX30 (NZ_CP017291.1) y MEX31 (NZ_CP017292.1) las cuales fueron aisladas de abscesos de músculo pectoral de equinos de la región de Valparaiso, constituyendo el primer reporte en México de cepas biovar *equi* (Muñoz-Bucio *et al.*, 2016). El análisis filogenético de estas cepas agrupó cada una en función del tipo de biovar, y en el caso de las cepas biovar *ovis* no se agruparon en función de su cercanía geográfica. Las cepas biovar *ovis* también se relacionaron con otras reportadas en la base de datos del GenBank provenientes de hospederos diferentes. En este trabajo la comparación de los aislados mexicanos con 46 cepas reportadas en el GenBank, permitió identificar dos clusters de genes que podrían ser empleados para la diferenciación de las cepas biovar *equi* (cluster: CRISPR-Cas) y biovar *ovis* (cluster: proteínas de tipo III de Restricción-modificación). Los genes relacionados con proteínas de modificación de restricción de tipo III se encontraron exclusivamente en el biovar *ovis* mientras que los genes relacionados con las proteínas de Sistemas de repeticiones palindrómicas cortas (CRISPR-Cas), se presentaron exclusivamente en el biovar *equi*, lo cual podría emplearse como diferenciación entre los biovars (Parise *et al.*, 2018).

En otro estudio se realizó la caracterización de los genes *pld* y *cp40*, factores de virulencia obtenidos de un aislado de *C. pseudotuberculosis* obtenido en un estudio previo en el estado de Jalisco, municipio Zapotlanejo, localidad Tauquilla. *C. pseudotuberculosis* aislamiento 4-2.2LJ (345929), fue obtenido en un ovino, a partir de un absceso menor de 5cm, de constitución dura y seropurulento, de la cabeza de una hembra Pelifolk. Los genes se amplificaron mediante PCR y se insertaron en el plásmido replicativo pGEM-T Easy mediante reacción de ligazón con la enzima T4 ligasa. Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α se utilizaron para la transformación por métodos químicos (Ca Cl₂) con las reacciones de ligazón entre el plásmido pGEM-T Easy y los genes *pld* y *cp40*. Los clones bacterianos recombinantes se identificaron mediante el empleo de medio de cultivo de selección LBA-IPTG-Xgal, sistema que genera colonias azules y blancas, siendo estas últimas indicativas de colonias transformadas con los genes de interés. Los plásmidos recombinantes se identificaron mediante el análisis por digestión enzimática y electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v). Los plásmidos recombinantes se purificaron a escala masiva y se enviaron a secuenciar para el análisis de los genes (Rodríguez-Domínguez, 2020).

Las secuencias de los genes presentaron altos porcentajes de similitud (99%) en comparación con las secuencias de otros aislamientos de *C. pseudotuberculosis* reportadas en la base de datos GenBank. Se plantea que en los árboles filogenéticos donde se agrupan las cepas en dependencia del tipo de hospedero se debe a que las granjas de cabras y ovejas podrían tener diferentes fuentes de cepas de biovar *ovis*. Los resultados coincidieron en la idea de que

las cepas biovar *ovis* y biovar *equi* se agrupan en diferentes clados filogenéticos y que las cepas mexicanas son más similares entre cepas aisladas del mismo tipo de hospedero, sin influencia de la distancia geográfica.

También se trabajó en la caracterización de los parámetros físico-químicos de ambas proteínas (secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de nucleótidos de los genes), la identificación de sitios activos y estructuras secundarias y terciarias. Los genes *pld* y *cp40* se insertaron en un plásmido de expresión en *E. coli*, para la obtención de ambas proteínas vía recombinante.

Los estudios *in silico* con el uso de técnicas bioinformáticas constituyen un nuevo campo de acción para el análisis de nuevas formulaciones vacunales. Estos programas informáticos incluyen modelos que combinan resultados previos obtenidos mediante inmunología experimental con el cálculo estadístico para lograr aproximaciones computacionales lo más real posible. Estas herramientas bioinformáticas son una alternativa para obtener resultados basado en el uso de programas predictivos, antes de evaluar experimentalmente las proteínas o péptidos, evitando el uso de animales de experimentación en las primeras etapas del diseño de las vacunas, así como un ahorro significativo en tiempo y gastos de la investigación. La capacidad de las proteínas PLDr 2J-L y CP40r 2J-L para la activación de los linfocitos B, así como la predicción de la estructura secundaria de los residuos de aminoácidos que componen los epítomos lineales de células B, se realizó mediante el empleo de Bepipred 2.0. Las proteínas se evaluaron como posibles candidatos vacunales, teniendo en cuenta sus propiedades físico-químicas, mediante el empleo del programa VaxiJen. Este programa clasificó las proteínas teniendo en cuenta todo su conjunto, como antígenos Probables para el desarrollo de vacunas (Rodríguez-Domínguez, 2020).

Por otra parte a partir de los aislados provenientes de Jalisco (Varela *et al.*, 2018), se desarrolló una vacuna experimental, (Bacterina), compuesta por cultivos totales inactivados con formaldehído y adyuvante Incompleto de Freud. Se emplearon los aislamientos H14X y 1.2 2J-L, debido a que presentaron características bioquímica diferenciales, la presencia de los genes de virulencia *pld*, *hsp60*, *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fag D*, así como desarrollaron cuadros clínicos graves en los hospederos. La composición antigénica de las bacterinas se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE, demostrándose la presencia de proteínas de 14,17, 28, 31, 75, 108 y 125 kDa, rango dentro del que se encuentran los principales factores de virulencia (Ortiz, 2016). Posteriormente se evaluó la capacidad protectora de la vacuna en ovinos desafiados con la cepa 43926 ATCC biovar *ovis*. Luego del desafío en los animales del grupo vacunado no se observaron lesiones ni signos clínicos de la enfermedad a diferencia del grupo control, donde 3 de 4 animales desarrollaron abscesos en pulmón y nódulo linfóide. La vacuna de cultivos totales inactivados de las cepas H14X y 1.2 2J-L fue capaz de conferir protección, aunque deben ampliarse los estudios para determinar qué respuestas protectoras del sistema inmune fueron activadas por esta vacuna (García, 2017).

Conclusiones

La Linfadenitis caseosa es una enfermedad con impacto negativo en la economía de los productores de pequeños rumiantes en México y a nivel mundial. Actualmente se continúan con los estudios para el desarrollo de vacunas de nueva generación (vacunas de subunidades recombinantes) y medios de diagnóstico de tipo ELISA, que permitan mejorar los programas de control de esta enfermedad. En este sentido los análisis bioinformáticos agregan valor a los estudios de caracterización microbiana y vacunología en la búsqueda de nuevos candidatos para el desarrollo de vacunas eficaces.

Referencias

- Abbas AK, Lichtman AH y Pillai S. Capítulo 3: Circulación y Migración de leucocitos a los tejidos. In: Inmunología celular y molecular. España: Elsevier. 2018.
- Aleman M y Spier SJ. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. Large Animal Internal Medicine 2001, 3: 1078-1084.
- Al-Gaabary MH, Osman SA, y Oreiby AF. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. Small Rumin Res 2009; 87: 116–121.
- Almeida S, Dorneles E, Diniz C, Abreu V, Sousa C, Alves J, et al. Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. BMC Vet Res 2017; 13: 290.

- Almuzara MN, De Mier C, Rodríguez CR, Famiglietti AMR, Vay CA. Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la identificación de bacilos gram-positivos difteroides de importancia clínica. *Rev Argent de Microbiol* 2006; 38(4): 197-201.
- Alvarez L, William A, Castro I, Valenzuela F, Estevao S. Capacidad de supervivencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis en distintos suelos de la provincia de Chubut, Patagonia argentina. *Rev Argent Microbiol* 2017; 49(1): 105-109.
- Augustine JL, Renshaw HW. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. *Am J Vet Res* 1986; 47(4): 713-715.
- Baird GJ y Fontaine MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J Comp Pathol* 2007; 137(4): 179-210.
- Baird GJ y Malone FE. Control of Caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA testing. *Vet Record* 2010; 166: 358-362.
- Baird G, Synge B, Dercksen D. Survey of Caseous lymphadenitis seroprevalence in British terminal sire sheep breeds. *Vet Record* 2004; 154: 505-506.
- 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.
- Bastos BL, Dias PRW, Dorella FA, Ribeiro D y Seyffert N. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunologic* 2012; 4: 1-15.
- Behrendt K y Weeks P. How are global and Australian sheepmeat producers performing? *MLA Market Information Report* 2019. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/331464399>. Acceso marzo 2020.
- Bernard KA y Funke G. Genus *Corynebacterium*. En: Whitman, W.B. (Ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (pp.245-289). New York, USA: Springer. 2012.
- Bobadilla-Soto EE, Flores-Padilla JP y Perea-Peña M. Comercio exterior del sector ovino mexicano antes y después del Tratado de Libre Comercio con América del Norte. *Economía y Sociedad* 2017; 21(37): 35-49.
- Borham M, Oreiby A, El-Gedawy A y Al-Gaabary M. Caseous Lymphadenitis in Sudanese and Somalian camels imported for meat consumption in Egypt. *AJVS* 2017; 55(2): 52-59.
- Brum AA, Silva AFR, Silvestre FB, Collares T, Begnine K, Kommling F, Veiras T, et al. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. *J Med Microbiol* 2017; 66: 635-642.
- Bush RD, Barnett R, Links I, Windsor PA. Using abattoir surveillance and producer surveys to investigate the prevalence and current preventative management of Caseous lymphadenitis in Merino flocks in Australia. *An Prod Sci* 2012; 52: 675-679.
- Burkovski A. Cell Envelope of *Corynebacteria*: Structure and Influence on Pathogenicity. *ISRN Microbiol* 2013; 935736: 11.
- Burkovski, A. The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie van Leeuwenhoek* 2018; 111(5): 717-725.
- Chirino-Zarraga C, Scamelli A y Rey-Valerion C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Rumin Res* 2005; 65: 170-175.
- Chaplin PJ, De Rose R, Boyle JS, McWaters P, Kelly J, Tennent JM, Lew AM, Scheerlinck JPY. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun* 1999; 67: 6434-6438.
- 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: 1387-1395.; 1994.
- Colom-Cadena A, Velarde R, Salinas J, Borge C, Garca-Bocanegra I, Serrano E, Gass D, Bach E, et al. Management of a caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2014; 56: 83.
- Cordes MHJ y Binford GJ. Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria. *Bioinformatics* 2006; 22: 264-268.
- 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.
- 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.
- De Rose R, Tennent J, Mc Waters P, Chaplin PJ, Wood PR, Kimpton W, et al. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 90: 55-63.
- Dias-Lopes C, Neshich IAP, Neshich, G, Ortega JM, Granier C, Chávez-Olortegui C, et al. Identification of new Sphingomyelinases D in pathogenic fungi and other pathogenic organisms. *PLoS ONE* 2013; 8(11): e79240.
- Dorella FA, Pacheco LG, Oliveira SC, Miyoshi A y Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary research* 2006; 37(2): 201-218.
- Dorella FA, Pacheco LGC, Seyffert N. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Exp Rev of Vaccines* 2009; 8: 205-213.
- Droppa-Almeida D, Franceschi E, Ferreira FP. Immune-informatic analysis and design of peptide vaccine from multi-epitopes against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bioinform Bio Insights* 2018; 12: 1-9.
- Droppa-Almeida D, Vivas WLP, Fraga RE, Rezende AFC, Alves LL, Meyer R, et al. Response with TH1 profile obtained in vaccine formulation against Caseous Lymphadenitis in animal model C57 Black/6. *Biotechnology Research and Innovation* 2019; 3(1): 192-196.
- El-Enbaawy MI, Saad MM y Selim SA. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Egypt J Immunol* 2005; 12(2): 13-9.
- Ellis JA. Caseous Lymphadenitis: the disease and its control. In: *Symposium on Health an Disease of Small Ruminants Texas*, American Association of Small Ruminant Practitioners AASRP. New York: Western Regional Coordinating Committee 46 WRCC46 Texas Veterinary Medical Center Texas A&M University: 90-93.; 1991.
- Estevao BS, Alvarez L. Effect of quaternary ammonium compounds and temperature on shearing utensils contaminated by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Onl J Vet Res* 2014; 18: 587-595.
- Faeza, NMN, Jesse FFA, Hambal IU, Odhah MN, Umer M, Wessam M.S., 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 Pro* 2019; 51 (7): 1855-1866.
- Fernández-Alonso M, Reina G, Rubio M y Leiva J. Infecciones por *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. y *Listeria* spp. *Medicine* 2018; 12 (49): 2901-2909.
- Fontaine M. Caseous lymphadenitis in sheep. *The Moredun Foundation News Sheet* 2015; 6(5).

- Fouad EA, Azza SM, Abu E, Kandil MM. Antibacterial efficacy of *Moringa oleifera* leaf extract against pyogenic bacteria isolated from a dromedary camel (*Camelus dromedarius*) abscess. *Vet World* 2019; 2231-0916.
- García PC. Evaluación de un inmunógeno para el control de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. México. 2017.
- 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.
- Guimarães AS, Seyffer N, Bastos BL, Portela RWD, Carmo FB, Meyer R, et al. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Ruminant Res* 2009; 87: 86–91.
- Guimarães AS, Carmo FB, Heinemann MB, Portela RWD, Meyer R, Andrey PL, et al. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Vet Res* 2011; 7: 68.
- Heidrun P, Birgit H, Werner P, Reinhard, B. Desinfection of shearing clippers to prevent pseudotuberculosis in sheep. *ISAH 2005 - Warsaw, Poland*. 2: 279. 2005.
- Hodgson ALM, Bird P y Nisbett, IT. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 1990; 172: 1256–1261.
- Hodgson ALM, Krywult J, Corner LA, Rothel JS y Radford AJ. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect and Immunol* 1992; 60(7): 2900-2905.
- Hodgson ALM, Tachedjian M, Corner LA y Radford AJ. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect and Immunol* 1994; 62(12): 5275-5280.
- Jesse FFA, Odhah MN, Abbad Y, Garba B, Mahmood Z, Hambali IU, Haron AW, et al. 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* 2020; 139: 103852.
- Jorge S y Dellagostin OA. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnol Res Innov* 2017; 1: 6-13.
- Jost BH y Billington SJ. *Corynebacterium* and *Arcanobacterium*. En: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, G., y Thoen, C.O. (Eds). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (p.77-86). Yowa, USA: John Wiley & Sons. 2004.
- Leal KS, Silva TO, Silva AFR, Brilhante FSB, Beghini K, Seixas F, Collares T, et al. Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine* 2018; 36: 3578–3583.
- Lester WA, Schousboe M, Chambers S y Patton WN. A second case of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in New Zealand. *NZ Med J* 1997; 110: 469-470.
- Li H, Yang H, Zhou Z, Li X, Yi W, Xu Y, Wang Z, et al. Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research* 2018; 168: 69-75.
- Li H, Yang H, Zhou Z, Li X, Yi W, Xu Y, et al. Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research* 2018; 168: 69-75.
- 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.
- 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.
- Martin MD y Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol* 2018; 9: 2692.
- Medrano G, Hung ACh, Alvarado AS y Li EO. Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. *Rev Inv Vet* 2003; 14(1): 61-67.
- Moussa IM, Mohamed SA, Ashgan M, Hessain SA, Kabli E, Hassan AH, Salha AS. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematousskin disease. *Saudi J Biol Scie* 2016; 23: 718–723.
- Muller B, de Klerk-Lorist LM, Henton MM, Lane E, Parsons S, Gey van Pittius, et al. Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Veterinary Microbiology* 2011; 147: 340–345.
- Muñoz BAV, Cortés PYA, Arellano RB, Hernández GM, Hernández CR y Díaz AE. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from muscular abscesses in two horses: first report in Mexico. *Equine Vet Educ* 2016; 29(8): 431-435.
- 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.
- 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.
- 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.
- Odhah MN, Jesse FFA, Teik CEL, Mahmood Z, Wahid HA, Mohd LMA, et al. Clinico-pathological responses and PCR detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. *Microb Pathog* 2019; 135: 103628.
- 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 domestica*). *Vet Res* 2014; 10: 218.
- Oliveira A, Teixeira P, Azevedo M, Jamal SB, Tiwari S, Almeida S, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under anagenesis and biovar *Equi* forms biovar *Ovis*: a phylogenic inference from sequence and structural analysis. *BMC Microbiol* 2016a; 16:100.
- Oliveira A, Teixeira P, Barh D, Barh D, Ghosh P y Azevedo, V. Key amino acids in understanding evolutionary characterization of Mn/Fe-Superoxide dismutase: A phylogenetic and structural analysis of proteins from *Corynebacterium* and Hosts. *Trends Artif Intell* 2017b; 1(1): 1-11.
- Oliveira A, Oliveira LC, Aburjaile F, Benevides L, Tiwari S, Jamal SB, Silva A, et al. Insight of genus *Corynebacterium*: Ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. *Front Microbiol* 2017; 8: 1937.
- O'Reilly KM, Green LE, Malone FE, Medley GF. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Prev Vet Med* 2008; 83: 242–259.
- Ortiz GA. Producción de una bacterina para Linfadenitis caseosa y la evaluación de su composición a través de electroforesis. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Mexico. 2016.

- Othman AM, Abba Y, Jesse A, Ilyasu YM, Saharee AA, Haron AW, et al. Reproductive pathological changes associated with experimental subchronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in nonpregnant Boer Does. *J Pathog* 2016; 7.
- Parise D, Parise M, Viana MVC, Muñoz BAV, Cortés-Pérez YA, Azevedo V, et al. First genome sequencing and comparative analyses of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains from Mexico. *Stand in Genomic Sci* 2018; 13(21).
- 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.
- Paton MW, Sutherland SS, Rose IR, Hart RA, Mercy AR y Ellis TM. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. *Aust Vet J* 1995; 72: 266-9.
- 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.
- Paule BJA, Azevedo V, Regis LF, Carminati R y Bahia R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96: 129-139.
- Paule BJ, Meyer R, Moura-Costa LF, Bahia RC, Carminati R y Regis LF. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction / concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr Puri* 2004; 34: 311-16.
- Promed. Pigeon Fever, equine USA (Oregon). Recuperado de <http://promedmail.org/post/20071018.3408>. Acceso marzo 2020.
- Robaj A, Hamidi A, Bytyqi H, Sylejmani D. Frequency and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from caseous lymphadenitis in sheep in Kosovo. *Bulg J Agric Sci* 2017; 23(6): 1033-1036.
- Rodríguez Domínguez MC. Obtención y caracterización de las proteínas recombinantes PLD y CP40, factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* con potencial inmunogénico. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. México. 2020.
- Ruiz JC, D'Afonseca V, Silva A, Ali A y Pinto AC. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One* 2011; 6: e18551.
- Sá MC, Oliveira SAS, Dantas EM, Gouveia, GV, Gouveia, JJC, Veschi, et al. Resistance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the Brazilian semiarid environment. *Pesq Vet Bras* 2018; 38(6).
- Sá MCA, Veschi JLA, Santos GB, Amanso ES, Oliveira SAS, Mota RA, et al. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesq Vet Bras* 2013; 33(11): 1319-1324.
- Santos LM, Stanisic D, Menezes UJ, Mendonça MA, Barral TD, Seyffert N, et al. Biogenic silver nanoparticles as a post-surgical treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in small ruminants. *Front Microbiol* 2019; 10: 824.
- Schreuder BE, Ter Laak EA, De Gee AL. *Corynebacterium pseudotuberculosis* in milk of CL affected goats. *Vet Rec* 1990; 127(15): 387.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). Reporte de producción pecuaria. Recuperado de http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp. Acceso abril 2020.
- Silk L y Lovatt F. Sheep vaccinations: latest research and farmer communication. *Vet Times*. Recuperado de <https://www.vettimes.co.uk>. 2016.
- Silva A, Schneider MPC, Cerdeira L, Barbosa MS y Ramos RTJ. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. *J Bacteriol* 2011; 193: 323-324.
- Silva JW, Droppa-Almeida D, Borsuk S, Azevedo V, Portela RW. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res* 2014; 10: 965.
- Silva MTO, Bezerra, FSB, de Pinho RB, Beghini KR, Seixas FK, Collares T, et al. Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. *Vaccine* 2018; 36(1): 74-83.
- Soares SC, Silva A, Trost E, Blom J, Ramos R y Carneiro A. The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. *PLoS ONE* 2013; 8(1): e53818.
- Sprake P y Gold JR. *Corynebacterium pseudotuberculosis* liver abscess in a mature alpaca (*Lama pacos*). *Can Vet J* 2012; 53: 387-390.
- Stanford K, Brogden KA, McClelland LA, Kozub GC y Audibert F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can J Vet Res* 1998; 62: 38-43.
- Syame SM, Abuelnaga ASM, Ibrahim ES y Hakim AS. Evaluation of specific and non-specific immune response of four vaccines for Caseous lymphadenitis in sheep challenged. *Vet World* 2018; 11(9): 1272-1276.
- Trost E, Ott L, Schneider J, Schröder J, Jaenicke S, Goesmann A, Husemann P, et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics* 2010; 11: 728.
- Valdivia, J. Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Tesis de Doctorado). Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Sanidad animal y Seguridad alimentaria. España. 2015.
- Vale CVL, da Costa SM, Pacheco SA, Castro TS, Ferreira de MCL, Nobre SEK, de Oliveira NIL, et al. Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a *C. pseudotuberculosis* strain. *BMC Vet Res* 2016; 12: 195.
- Valero G, Alley MR y Manktelow BW. A slaughterhouse survey of lung lesions in goats. *New Zealand Veterinary Journal* 1992; 40(2): 45-51.
- Valley Vet. Colorado Serum Company. 4950 York Street, P.O. Box 16428, Denver, CO, 80216-0428. 2020.
- Viana MVC, Figueiredo H, Ramos R, Guimares LC, Pereira FL, Dorella FA, Salah A, et al. Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. *PLoS ONE* 2017; 12(4): e0176347.
- Viana MVC, Sahn A, Go'es Neto A, Figueiredo HCP, Wattam AR, Azevedo V. Rapidly evolving changes and gene loss associated with host switching in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *PLoS ONE* 2018; 13(11): e0207304.
- Von-Graevenitz A y Bernard K. The Genus *Corynebacterium*-Medical. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (Ed.) *The Prokaryotes*. New York, USA: Springer.; 2006.
- Williamson LH. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001; 17(2), 359-371.
- Windsor PA. Control of Caseous Lymphadenitis. *Vet Clin Food Anim* 2011; 27: 193-202.
- 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.
- Windsor PA, Bush RD. Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination?. *Small Rumin Res* 2016; 142: 6-10.
- Zoetis 2020. Zoetis Spain, S.L. Avda. de Europa 20 B, Parque Empresarial La Moral. https://www.zoetis.es/_locale-assets/spc/biodyectin.pdf. Acceso Abril, 2020.

- Zhou Z, Li H, Zhang M, Wang Z, Zhou R, Hu S, Li X, et al. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain XH02 isolated from a Boer goat in Xuanhan, China. *Genome Announc* 2016; 4(6): e01329-16.
- Zhou Z, Yang H, Li H, Li X, Wu B, Tian S, et al. Sodium butyrate ameliorates *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in RAW264.7 macrophages and C57BL/6 mice. *Microbial Pathogen* 2019; 131: 144–149.