



REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS PECUARIAS

Edición Bilingüe
Bilingual Edition
ISSN: 2448-6698

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias - Rev. Mex. Cienc. Pecu. Vol. 12 Núm. 4, pp. 996-1337, OCTUBRE-DICIEMBRE-2021



inifap
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Rev. Mex. Cienc. Pecu. Vol. 12 Núm. 4, pp. 996-1337, OCTUBRE-DICIEMBRE-2021

Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas.
Revisión

Maria Carla Rodríguez Domínguez *

Roberto Montes de Oca Jiménez **

Jorge Antonio Varela Guerrero *

* Universidad Autónoma del Estado de México. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. km 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México, México.

* Autor de correspondencia: romojimenez@yahoo.com

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 deterioro en la condición física del animal, así como pérdidas en la producción de leche y carne, decomiso de las canales, rechazo de las pieles y como consecuencia, grandes pérdidas económicas. El estudio de los factores de virulencia y los mecanismos de patogénesis han permitido comprender esta enfermedad, así como establecer las moléculas diana para el desarrollo de nuevas vacunas. Existen vacunas comerciales disponibles a nivel mundial; sin embargo, la protección conferida por éstas 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. En el presente trabajo se exponen los principales factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sus implicaciones en la patogénesis y las tendencias actuales en las formulaciones vacunales.

Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas.

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 deterioro en la condición física del animal, así como pérdidas en la producción de leche y carne, decomiso de las canales, rechazo de las pieles y como consecuencia grandes pérdidas económicas. El estudio de los factores de virulencia y los mecanismos de patogénesis han permitido comprender esta enfermedad, así como establecer las moléculas diana para el desarrollo de nuevas vacunas. Existen vacunas comerciales disponibles a nivel mundial; sin embargo, 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. En el presente trabajo exponemos los principales factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sus implicaciones en la patogénesis y las tendencias actuales en las formulaciones vacunales.

Palabras clave: Linfadenitis Caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Factores de virulencia, Patogenesis, Vacunas.

Caseous lymphadenitis: virulence factors, pathogenesis and vaccines.

Abstract

Caseous lymphadenitis is a worldwide distributed disease that affects sheep and goat industry. *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis* is a facultative intracellular Gram positive bacteria, considered the causal etiologic agent of the disease. The clinical manifestations are characterized by abscess formation in lymph nodes and visceral organs, causing deterioration in organic condition of the animal, as well as reduction in milk and meat production, skin and carcasses condemnation with great economic losses. The study of virulence factors and pathogenesis mechanisms have allow to get better understanding of disease, as well as to establish new molecular targets for vaccines development. The commercially available vaccines have shown different results in capacity of protection and control of the disease. Currently the use of new technologies has allowed obtaining and characterizing proteins with immunogenic potential for the development of new vaccines, which could be an alternative to increase protection. In the present work, we expose the main virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, its implications on the pathogenesis and the current trend in new vaccine formulations.

Keywords: Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, virulent factors, pathogenesis, vaccine.

INTRODUCCIÓN

La Linfadenitis caseosa (LAC) es una de las enfermedades que más afecta las producciones ovinas y caprinas (1, 2). El agente etiológico de la enfermedad, *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis* (3, 4), causa una infección crónica que se caracteriza por la formación de abscesos en nódulos linfáticos cutáneos y/o viscerales. Esta enfermedad provoca el deterioro en las condiciones físicas de los animales, disminución de la producción de lana, carne y leche, así como desórdenes reproductivos (5, 6, 7). *Corynebacterium pseudotuberculosis* es un microorganismo zoonótico por lo que también afecta al hombre, siendo más vulnerable el personal que trabaja en la producción de pequeños rumiantes (2). El estudio de esta enfermedad constituye una prioridad, para lograr mejoras en las producciones de carne de ovino y caprino, cuya demanda se prevé que aumente en los próximos años en el mercado internacional (8, 9). La LAC ha sido reportada en diversos países como China (10), Australia (11), Brasil (12), Chile (13), Paraguay (14), Canadá (15), Turkia (16), Argentina (17) y Estados Unido (18), mostrando evidencias de afectaciones en la producción. México ocupa el tercer lugar de América en la producción de ovinos, con una población que ha incrementado a 8.6 millones de cabezas. Según el reporte anual de la SIAP en el 2019 la producción de canales ovinas fue de 64.031 Toneladas y de caprinos 39,937 Toneladas (19, 20, 21). La ovinocultura en México es una actividad en aumento y aun así la producción no satisface la demanda por lo que se importa carne de otros países como Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (22). Diversos estudios han demostrados la presencia de la LAC en los rebaños ovinos y caprinos en diferentes regiones de México. En el municipio de Xalatlaco, hallaron que el 5.4 % de los exudados nasales de ovejas analizadas presentaron *Corynebacterium spp.* (23). Otro análisis permitió el aislamiento de *Corynebacterium spp.* en el 65% de animales con lesiones en nódulos linfáticos (24).

También se ha reportado una prevalencia del 1.75 % en el municipio de Mapimí y 4.69 % en Tlahualillo, en cabras del estado de Durango (25). En el 2015 se realizó la identificación de 57 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de un total de 160 muestras procedentes del Estado de Jalisco. Las cepas se identificaron mediante bacteriología miniaturizada API Coryne, pruebas bioquímicas y PCR, obteniéndose una frecuencia del 33% (26). Estudios recientes han permitido la secuenciación del genoma completo de seis cepas de origen mexicano, de diferentes biovares, aisladas de diferentes hospederos, cuyas secuencias se encuentran reportadas en la base de datos del GenBank (27, 28)

Existen vacunas comerciales a nivel mundial contra LAC; sin embargo, la protección conferida por estas no ha sido eficiente en el control de la enfermedad. Actualmente el uso de tecnologías de nueva generación ha permitido el desarrollado de nuevas vacunas experimentales las cuales podrían ser una alternativa para mejorar la protección. En esta revisión de la literatura abordamos las características generales de la bacteria, factores de virulencia y su relación en la patogénesis, así como las estrategias empleadas para el desarrollo de nuevas vacunas para el control y prevención de la Linfadenitis Caseosa.

Corynebacterium pseudotuberculosis: Características generales

Corynebacterium pseudotuberculosis pertenece al phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Corynebacteriaceae*, género *Corynebacterium* (3,4). Presenta una morfología cocobacilar con amplitud de 0.5-0.6 μm y 1.0-3.0 μm de longitud. Este microorganismo es un patógeno intracelular facultativo, no flagelado, no formador de esporas ni capsula. Tienen la capacidad de crecer en anaerobiosis, degradan la galactosa, maltosa, L-y D-arabinosa y glucosa sin producción de gases (1). La estructura y composición de la pared celular es compleja ya que

presentan ácidos micólicos de aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono que se unen a una red de heteropolisacaridos formados por arabinogalactanos, glicolípidos y proteínas (29). La exotoxina PLD es considerada el principal factor de virulencia y puede ser detectada mediante un ensayo de hemólisis sinérgica frente a *Rhodococcus equi* o por inhibición de la β hemolisina del *Staphylococcus aureus*. Las cepas de *C. pseudotuberculosis* son clasificadas en biovar *equi* para los aislamientos que presentan actividad enzimática nitrato reductasa (nitrato-positivo) y biovar *ovis* para aquellas cepas que no presentan dicha capacidad (nitrato-negativo) (30).

El biovar *ovis* es el agente causal de la enfermedad LAC y ha sido aislado de ovejas, cabras (31), antílopes (32), vacas (33), alpacas (34), llamas (35), cabra montés (36) y cerdos (37).

El biovar *equi* provoca abscesos en tejido muscular del área pectoral de equinos y en menor medida lesiones internas (39, 40, 41), así como también se ha aislado de camellos (38) y búfalos (42, 43). *C. pseudotuberculosis* es un microorganismo zoonótico y la mayoría de los casos reportados corresponden a individuos asociados a la producción pecuaria en Australia (4), Nueva Zelanda (44, 45), Francia (46,47), España (48), Estados Unidos (49) y China (2). Los síntomas clínicos incluyen adenopatías axilares, inguinales o cervicales, fiebre y mialgias, con evolución crónica o subaguda, en algunos casos neumonía (50, 51).

La transmisión horizontal se favorece mediante contacto directo con alimento o inhalación de polvo contaminado con el microorganismo, así como por heridas abiertas. A través de un modelo matemático basado en la localización de los abscesos, se estimó que la vía de transmisión a través de la piel es más frecuente en comparación con la vía respiratoria (52). El material procedente de los abscesos contiene concentraciones muy elevadas de microorganismos viables que contaminan no solo las herramientas de esquila, sino también

el suelo. En paja de cama puede permanecer viable durante tres semanas, en heno durante dos meses, en puestos de esquila cuatro meses y por más de ocho meses en el suelo (53). Las bacterias presentes en el pus se organizan formando agregados que facilitan su resistencia a cambios ambientales (54). La evaluación de la supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en 5 muestras de suelos de distintas zonas de la provincia del Chubut (Patagonia), con características fisicoquímicas diferentes en lo que respecta a contenido de materia orgánica, pH, conductividad eléctrica y textura, permitió determinar que el 60% de *C. pseudotuberculosis* sobrevivió durante 80 a 210 días. La supervivencia de la bacteria por largos períodos se vio favorecida por el mayor contenido de materia orgánica sumado a la textura franco-linosa y no se observó la influencia de variables como el pH y la salinidad (55). La transmisión vertical provoca desórdenes reproductivos como abortos, mortalidad neonatal y reducción de la tasa de crecimiento de los corderos afectados, con persistencia de la enfermedad dentro del rebaño. También se ha estudiado que la infección por *C. pseudotuberculosis* disminuye la calidad del semen y la producción de la hormona testosterona (7, 56, 57).

La identificación de *C. pseudotuberculosis* mediante PCR (por sus siglas del inglés, *Polymerase chain reaction*) se ha ido modificando incluyendo diferentes genes que permiten la clasificación hasta biovar. El empleo de la secuencia del gen ARNr 16S permite diferenciar *Corynebacterium diphtheriae* de *C. pseudotuberculosis* con una similitud de un 97.8%, lo que indica que estas especies están estrechamente relacionadas pero son diferentes. Sin embargo, entre *C. pseudotuberculosis* y *Corynebacterium ulcerans* la similitud entre especies es de 99.7% por lo que este gen no permite la diferenciación entre ambas (58, 59, 60). Debido al elevado grado de similitud entre estas especies se realiza de manera simultánea la

amplificación de otros genes más específicos como *pld* y *rpoB* (61). El gen *rpoB* codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa (62), y la amplificación de un fragmento de 434 a 452 pb permite la identificación a nivel de especie ya que presenta un elevado polimorfismo. El mayor grado de semejanza de esta secuencia parcial entre dos especies ha sido de 95,9% frente a un 99,7% para la secuencia del ARNr 16S (63).

El gen *pld* codifica para la fosfolipasa D, factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis* (64) y constituye un blanco de amplificación por PCR para discriminar entre aislados de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* (61). Recientemente quedo establecido el PCR Quadruplex que incluye la amplificación de los genes anteriormente citados, así como el gen *narG*, que codifica para la cadena alfa de la enzima nitrato reductasa. La presencia de este gen es indicativo de que la cepa es biovar equi y la ausencia del mismo permite identificar a la cepa como biovar ovis. Este nuevo sistema de diagnóstico por PCR permite la clasificación de las cepas hasta nivel de biovar (65).

Diferentes técnicas se han utilizado para el análisis y genotipificación de las cepas de *C. pseudotuberculosis*. En Australia se realizó un trabajo para establecer variaciones genéticas entre cepas aisladas de diferentes regiones geográficas del país en comparación con aislados de animales provenientes de Norteamérica. Los resultados indicaron que los aislamientos tenían propiedades bioquímicas, patrones de endonucleasas de restricción y ribotipos similares (66). El empleo de la técnica de electroforesis de campos pulsados, PFGE (por sus siglas en inglés, *Pulsed-field gel electrophoresis*) permitió establecer 6 pulsotipos en el estudio de 50 aislados de *C. pseudotuberculosis* del Reino Unido. Este trabajo mostró que las cepas de *C. pseudotuberculosis* presentan un arreglo clonal conservado, con diferencias establecidas entre los aislados biovar ovis y biovar equi (67). Este mismo grupo de

investigadores realizó la caracterización mediante PFGE de 42 aislados de *C. pseudotuberculosis* de ovejas y cabras provenientes de Australia, Canadá, Irlanda y los Países Bajos. Este análisis permitió identificar 4 pulsotipos distintos entre 36 cepas de origen ovino y 6 caprinas que mostraron homogeneidad por lo que se plantea que existen regiones del genoma que están altamente conservados, independientemente del país de origen de la cepa (68). En Polonia el empleo de diferentes técnicas como BOX-PCR, RAPD (por sus siglas del inglés, *Random amplified polymorphic DNA*), ADSRRS (por sus siglas del inglés, *Fingerprinting amplification of DNA surrounding rare restriction sites*) y AFLP (por sus siglas en inglés, *Amplified fragment length polymorphism*) permitió evaluar la diversidad genética en la distribución de las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Se observaron patrones de genomas idénticos en cepas aisladas de animales de rebaños de diferentes regiones y por otra parte hubo cepas que mostraron perfiles diferentes aun siendo aisladas de un mismo rebaño (69,70). El análisis del Pan-genoma de 15 cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas de diferentes hospederos, 9 biovar *ovis* y 6 biovar *equi*, proporcionó información sobre los genes variables, genes conservados y genoma completo de ambos biovars. El biovar *ovis* contiene 314 genes que comparten todas las cepas de este biovar, pero están ausentes de una o más cepas de biovar *equi*. Por otra parte las cepas biovar *equi* presentan 95 genes centrales que están ausentes de una o más cepas de biovar *ovis*. La mayoría de los genes variables de las cepas biovar *ovis* se adquirieron en un bloque a través de transferencia horizontal de genes y están altamente conservados, mientras que las cepas biovar *equi* contienen una gran variabilidad, tanto intra como inter-biovar. También existe una elevada similitud en las secuencias de los genes que codifican

para la estructura del pili en las cepas biovar *ovis* en comparación con la gran variabilidad de estos genes en las cepas biovar *equi*. Esto podría ser responsable de la capacidad de las cepas biovar *ovis* para propagarse por los tejidos del hospedero y penetrar en las células, viviendo intracelularmente, ocasionando manifestaciones de la enfermedad a nivel visceral, en contraste con el biovar *equi*, que rara vez infecta órganos internos (71). La evaluación de la técnica ERIC-PCR (por sus siglas del inglés, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*) fue utilizada para la tipificación de 101 cepas aisladas de hospederos diferentes provenientes de 12 países. El árbol de expansión mínimo reveló tres complejos clonales alrededor de las cepas biovar *equi* y biovar *ovis*, mostrando diferencias en el patrón de agrupación. Los análisis de segregación de las cepas con respecto al origen geográfico y la distribución del hospedero entre los grupos determinados mostró que todos los aislamientos de biovar *equi* se ubicaron en el mismo grupo, mientras que los biovar *ovis* se organizaron en diferentes grupos independientemente del tipo de hospedero o región geográfica (72). Los estudios realizados sugieren que la especie *C. pseudotuberculosis* presenta eventos de especiación biológica, lo que significa que se encuentra bajo un proceso de anagénesis, donde la evolución progresiva de los caracteres que aparecen o se modifican pueden alterar la frecuencia genética (73, 74).

En México también se han estudiado algunas cepas de *C. pseudotuberculosis*. La cepa MEX1 (NZ_CP017711.1) fue aislada de absceso retrofaríngeo de cabra y la cepa MEX29 (NZ_CP016826.1) de absceso retrofaríngeo de oveja, con una distancia de 50 Km entre ambos aislamientos. Por otra parte, las cepas MEX25 (NZ_CP013697.1) identificada de absceso parotídeo en oveja y MEX9 (NZ_CP014543.1) de absceso pre-escapular en cabra, ambas aisladas en la región de Guanajuato, con una distancia de 450 Km con respecto a los

aislados anteriores (27). Las cepas MEX30 (NZ_CP017291.1) y MEX31 (NZ_CP017292.1) fueron obtenidas de abscesos de musculo pectoral de equinos de la región de Valparaiso, siendo el primer reporte en México de cepas biovar equi (28). En el análisis filogenético las cepas biovar ovis no quedaron agrupadas en función de su cercanía geográfica, aunque tampoco por el tipo de hospedero ya que se agruparon con cepas provenientes de animales diferentes. Las cepas biovar ovis contienen un elevado grado de clonalidad, pero no presentan el mismo grado de agrupación filogenética en los clados que las cepas biovar *equi* (27). Otro estudio en México permitió la identificación de 57 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de Jalisco, mediante pruebas bioquímicas y la amplificación de los genes *ARNr 16S*, *rpoB* y *pld*, así como los genes implicados en la virulencia y patogenicidad: *fag A*, *fag B*, *fag C*, *fag D* y *hsp60*. El análisis filogenético de los aislamientos se realizó en base a la secuencia parcial del gen *rpoB* con porcentajes de similitud entre 98, 99 y 100% con respecto a las secuencias reportadas a nivel mundial (26).

Factores de virulencia

La mayoría de los genes de virulencia de *C. pseudotuberculosis* están agrupados en el genoma en regiones denominadas islas de patogenicidad (PAI). Se han identificado 16 PAI (en *C. pseudotuberculosis*, PiCp) y la presencia de un gen de transposasa en la PiCp1, posiblemente permitió la incorporación de esas islas de patogenicidad 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 (31, 43, 71, 75). Las secuencias de las PiCp tienen un alto nivel de similitud (82–100%) intra-biovar en las cepas ovis, las cuales presentan de (78–91%) de similitud con respecto al biovar equi. Sin embargo, las cepas de biovar equi contienen

grandes deleciones y un menor nivel de similitud intra-biovar (77–88%) y también en comparación con las PiCp de biovar ovis (62-74%) (71). Los factores de virulencia más estudiados han sido los ácidos micólicos presentes en la pared celular y la exotoxina Fosfolipasa D, los cuales contribuyen a la inflamación, edema y diseminación del microorganismo durante el desarrollo de los abscesos. La membrana plasmática de la bacteria está cubierta por una capa de peptidoglicano compuesto por ácido meso-diaminopimelico (meso-DAP), arabinosa y galactosa como azúcares principales. En las reacciones de la vía de biosíntesis II de peptidoglicano; el ácido meso-DAP es el producto de la reacción catalizada por UDP-N-acetilmuramil-tripéptido sintetasa, enzima que ha sido identificada en cepas de *Corynebacterium* (31). El peptidoglicano a su vez está unido covalentemente con arabinogalactanos que forman un enrejado, que se encuentra unido a una capa externa de ácidos micólicos. Los ácidos micólicos se unen a trehalosa en sus extremos más expuestos al exterior, y en *Mycobacterium tuberculosis* forman una estructura llamada factor cordon, que se ha relacionado con la inhibición de la fusión dentro de los macrófagos y con la activación de estas células. Esta estructura lipídica actúa como una barrera, con permeabilidad selectiva mediada por proteínas integrales de membranas llamadas porinas (76). La infección de macrófagos con extractos lipídicos de *C. pseudotuberculosis* tuvo efectos negativos sobre la actividad glucolítica, viabilidad e integridad de la membrana. Esta estructura lipídica brinda protección a la bacteria ante la acción de las lisozimas, ocasionando impedimento estérico que evita que las enzimas accedan a los enlaces del peptidoglicano (29). La inoculación de ácidos micólicos en ovinos demostró que la haptoglobina (Hp) aumento 3 veces su concentración, así como también 2 veces los niveles de amiloide sérico A (SAA). Estos resultados indican el potencial virulento de los ácidos micólicos, ya que por sí solos fueron

capaces de inducir en el hospedero el aumento de estas proteínas indicadoras de inflamación e infecciones agudas (6). La inoculación de ácidos micólicos en cabras provocó la formación de lesiones como congestión, degeneración y necrosis en los órganos reproductivos (55).

La exotoxina Fosfolipasa D es considerada el factor de virulencia principal de *C. pseudotuberculosis* (31, 77). El gen *pld* fue identificado y secuenciado en 1990, forma parte de la isla de patogenicidad PiCp1 y codifica para una proteína de 31.4KDa. Las fosfolipasas son un grupo variado de enzimas capaces de hidrolizar uno o más enlaces éster en glicerofosfolípidos. Las letras A-D se usan para distinguir las fosfolipasas y denotar el fosfolípido específico en el que escinden el enlace éster. La comparación de la secuencia de la proteína PLD reveló que presenta mayor similitud con Fosfolipasa A2 (78,79). La PLD es una exotoxina con actividad enzimática dependiente de magnesio, que cataliza la disociación de la esfingomielina en fosfatoceramida y colina. La PLD aumenta la permeabilidad vascular, contribuye a la diseminación y persistencia de la bacteria en los fagocitos, que la transportan a nódulos linfáticos donde se desarrollan los abscesos (80, 81, 82). Presenta una secuencia ampliamente conservada en todas las cepas, y cuando esta se encuentra modificada se dificulta la capacidad de producir la enfermedad (71).

La proteína CP40 fue identificada en 1994 como antígeno con capacidad protector contra la LAC. El gen presenta un marco abierto de lectura de 1,137 pb y se encuentra ubicado corriente abajo del gen *pld* en la PiCp1 (83). Inicialmente fue descrita como enzima con actividad proteasa serina (84), pero en otro estudio el análisis de la secuencia permitió su agrupación más cercana junto a otras endoglicosidasas y más lejos de las secuencias de proteasas de serina (85). En este mismo trabajo se propuso que la actividad enzimática desarrollada por esta proteína es de endoglicosidasa mediadora de la hidrólisis de enlaces

glicosídicos, proteínas de la familia GH18, similar al dominio a- Endo E perteneciente a *Enterococcus faecalis* (86). Las enzimas GH18 contienen una secuencia consenso conservada motivo (LIVMFY) - (DN) -G- (LIVMF) - (DN) - (LIVMF) - (DN) -X-E, donde el ácido glutámico terminal es esencial para la actividad enzimática (87, 88). Al alinear el sitio activo GH18 en CP40, quedo establecida su similitud con las enzimas EndoE y EndoS, solo con cambios en uno o dos aminoácidos respectivamente. La función de esta proteína como factor de virulencia se ha asociado a la capacidad demostrada *in vitro* de degradar la región Fc de los anticuerpos IgG. La endoglicosidasa CP40 no hidroliza los glicanos en la IgG bovina y caprina, mientras que la IgG ovina se hidroliza de manera parcial y la IgG equina por completo. También se realizó el análisis con todas las subclases de IgG humano, presentando actividad en todas y de manera parcial en IgG4. No hubo actividad enzimática detectable en otras glicoproteínas, incluido algunos de los otros isotipos de inmunoglobulina (IgA, IgD y IgA) (85). Esta proteína también ha sido ampliamente estudiada en los últimos años para su utilización en la formulación de vacunas. Según varios informes las proteínas exportadas o secretadas por las bacterias participan activamente en el proceso de infección (89, 90). Por tal motivo la expresión y secreción de las proteínas PLD y CP40 han sido sumamente estudiadas. El desarrollo de una infección experimental evidenció mediante inmunoblot que la producción de anticuerpos estuvo dirigida en un 88% al reconocimiento de proteínas de 30-31Kda (PLD) y en un 75%-88% hacia proteínas de 38-41KDa (CP40), rango en el que se encuentran ambas proteínas (91). El análisis del exoproteoma de la cepa 1002 de origen brasileño antes y después de la reactivación de la virulencia tras 2 pases en ratones BALB/c, mostró dos perfiles proteicos diferentes. Un total de 118 proteínas se expresaron de manera diferente, de estas 48 solo se detectaron en la cepa no virulenta y 32

en la cepa tras 2 pases en el modelo animal. El análisis por espectrometría de masas permitió la identificación de las proteínas PLD y CP40 únicamente en la cepa cuya virulencia fue reactivada. La cepa 1002 se había mantenido en el laboratorio y tras varios pases en medio de cultivo el perfil de expresión cambió, especialmente no mostrando proteínas efectoras relacionadas a la virulencia bacteriana. Sin embargo, en este estudio se demostró que tras 2 pases en ratones fue capaz de reactivar su virulencia (92). Por otra parte, a través de PCR en tiempo real se identificó *in vitro* e *in vivo* la expresión de varios genes involucrados en la virulencia entre ellos *pld* y *cp40*. Este análisis permitió constatar que en las cepas aisladas de nódulos linfáticos la expresión de estos genes fue superior en comparación con la cepa obtenida de cultivos *in vitro* (93).

Otros factores de virulencia han sido estudiados en la PiCp1, donde se encuentra el operón (fag ABCD) cuyos genes codifican para proteínas relacionadas con la adquisición de hierro; proceso importante que permite la supervivencia de las bacterias en el hospedero (94, 95). Este operón está compuesto por cuatro genes *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD* que se encuentran ubicados corriente abajo del gen *pld* (96). Estos genes codifican respectivamente para una proteína integral de membrana, una enterobactina transportadora de hierro, una proteína de membrana citoplasmática de unión a ATP y una proteína siderófora de unión a hierro (77). La FagA fue identificada como proteína de asociación a membrana con potencialidades patogénicas, mediante el análisis por espectrometría de masas de las proteínas expresadas en una cepa de *C. pseudotuberculosis* cultivada con suero animal. Este estudio dio a conocer parte del repertorio de proteínas que se expresan durante una infección real, las cuales podrían ser utilizadas como antígenos para el desarrollo de vacunas (97). El cultivo de *C. pseudotuberculosis* en medios con quelantes de hierro (Dipiridilo), provocó la disminución

en un orden de logaritmo en el conteo de unidades formadoras de colonias en comparación con las bacterias crecidas en medios enriquecidos con hierro. Por otra parte en el mismo trabajo la evaluación de la respuesta transcripcional de *C. pseudotuberculosis*, con restricción de hierro, permitió identificar la regulación negativa de genes que participan en el metabolismo energético del ciclo de Krebs (*sdhC*, *sdhB*, *lpd*), producción de ATP (*atpF*, *atpH*), metabolismo del piruvato (*lpd*), fosforilación oxidativa (*qcrC*, *qcrA*, *qcrB*, *ctaC*, *ctaF*, *ctaE*, *ctaD*), procesos del ribosoma, transporte (*rplJ*, *rplL*, *rplM*, *rpmA*, *rpsC*, *rpsI*, *rpsL*, *rpsM*) y factores de alargamiento EF-G y EF-Ts asociados a la traducción del RNAm (*fusA*, *tsf*). Se identificó el gen análogo a *dtxR* de *C. diphtheriae*, con un 79% de similitud en la secuencia, que codifica para una proteína dependiente de unión a hierro, que actúa como factor de regulación de más de 40 genes, con 20 sitios de unión de regulación en el genoma. También aumento la expresión de proteínas de membrana, que presentan mayor cantidad de sitios de unión a grupo hemo, lo que favorece la adquisición y transporte de hierro cuando este se encuentra a bajas concentraciones (98).

En PiCp1 no solo se encontraron genes con funciones asociadas con la absorción de hierro (operón *fag*) sino también carbono (*malL*) y Mg^{2+} , lo que favorece la supervivencia en condiciones de estrés. En procariontes el Mg^{2+} ha sido identificado como una importante señal reguladora que es esencial para la virulencia, ya que está involucrado en la adaptación térmica. La traducción del gen *mgtE* está regulada por cambios en la concentración de Mg^{2+} citosólico y la disminución de la MgtE reduce la formación de biopelículas y motilidad en las bacterias patógenas (99). Por otra parte, la proteína MalL (*malL*), una α -glucosidasa, hidroliza varios disacáridos, como maltosa e isomaltosa, que pueden servir como fuentes de carbono y energía para el microorganismo (100).

En PiCp2 el gen *tetA* codifica una proteína transportadora de eflujo de tetraciclina que protege ante la acción de este antibiótico y confiere resistencia a las células. El gen *tetA* a menudo es transportado por elementos transmisibles como plásmidos, transposones e integrones (101). Además, esta isla de patogenicidad presenta genes que se han asociado con la infección de macrófagos como *potG* (102), *sigK* (103, 104) y *dipZ*, que responden a los mecanismos responsables del estilo de vida intramacrofágico de este microorganismo (31). En PiCp3 y 4 se han estudiado los genes pertenecientes al operón *ciuABCDE* involucrados en la absorción de hierro, transporte y biosíntesis de sideróforo (105). En PiCp4 se encuentra el gen que codifica para el factor sigma, del cual se ha estudiado su capacidad de proteger ante estrés oxidativo, específicamente ante la acción de los productos intermediarios del nitrógeno (106).

La cepa FCR41 de *C. pseudotuberculosis* fue empleada en el estudio de los genes relacionados con la síntesis del pili. La estructura del pili está compuesta por el pili mayor SpaA y SpaD; el pili menor SpaB y SpaE; y el pilli tipo, SpaC, SpaF. Una estructura completa de pili o incluso el pili menor pueden realizar un contacto inicial con receptores de las células hospederas, para facilitar la entrada del microorganismo. En esta cepa se identificó el gen *spaC*, que codifica para una proteína responsable del anclaje del pili a la pared celular, que puede permitir el contacto inicial con los receptores de la célula, para luego facilitar la invasión intracelular. También presentó el gen *namH*, que codifica para una neuroaminidasa extracelular (47), que catalizan la eliminación de los grupos de ácido siálico presentes en una gran variedad de glicoconjugados de la matriz extracelular de la célula del hospedero, lo que favorece la adherencia a las células (60). En FCR41 se detectó el gen *sodC*, que codifica para una superóxido dismutasa, enzima anclada a la membrana con dominio extracelular, que

elimina los radicales libres del oxígeno productos del estallido respiratorio en los macrófagos (47, 107).

Las proteínas chaperonas (HSP) son altamente conservadas y se expresan ante el estrés térmico, así como también ante la disminución de nutrientes, hipotaxia, ruptura del metabolismo, infecciones virales y otros procesos celulares (108, 109). En células procariotas las más caracterizadas son la Hsp10 (*groES*), Hsp60 (*groEL*) y Hsp70 (*dnaK*) (110, 111). Las proteínas Hsp fueron estudiadas en *C. pseudotuberculosis* biovar ovis cepa 1002, donde se demostró la resistencia a diversos tipos de estrés abióticos, tales como acidez, altas temperaturas y estrés osmótico. El gen *hspR*, codifica para el factor de regulación de la expresión (proteína represora) del operón con los genes *dnaK*, *grpE*, *dnaJ* y *hspR*, que codifican proteínas de choque térmico (112). En ausencia de estrés, la proteína HspR se une a una secuencia de repetición invertida que reprime a los promotores responsables de controlar la expresión del operón Hsp (113). En otro estudio la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional, permitió identificar 11 proteínas extracelulares nuevas, 3 con funciones desconocidas y 8 relacionadas con el factor de alargamiento Tu, GroEL (HSP60), enolasa, deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato y superóxido dismutasa (SodA), los cuales dependen de un método de secreción no clásico vía SecA. Ambos genes SecA (SecA1 y SecA2), se identificaron en las cepas estudiadas, posiblemente involucrados en el sistema de secreción de *C. pseudotuberculosis* (90, 114). Aun se continúa con el estudio de los factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* como moléculas candidatas para el desarrollo de vacunas más potentes y eficaces.

Patogénesis y mecanismos de evasión del sistema inmune

La manifestación cutánea de LAC se caracteriza por la formación de abscesos en nódulos linfáticos subcutáneos, los cuales son visibles y palpables a través de la piel y su localización depende del punto de entrada del microorganismo. Las lesiones pueden aparecer como abscesos organizados, con inflamación, encapsulación fibrosa, pérdida de pelo sobrepuesto y ruptura eventual, dando como resultado la descarga de contenido purulento. En la forma visceral, los abscesos tienen lugar en los nódulos linfáticos internos, así como en pulmones, hígado y riñones, causando deterioro en la condición orgánica del animal hacia el desarrollo de un curso crónico. Puede ocurrir que los nódulos necróticos internos bien encapsulados sean compatibles con un desarrollo vital aparentemente normal (5, 115, 116). En las formas atípicas de la enfermedad las lesiones macroscópicas no se corresponden con nódulos caseosos, describiéndose la toxemia neonatal o icterohemoglobinuria de recién nacidos, artrosinovitis, endometritis, mastitis y orquitis (117).

La infección se inicia con el ingreso de la bacteria a través de lesiones en la piel generadas durante el manejo de los ovinos, como cortes de cola, marcaje de orejas, castración, esquila o en algunos casos lesiones generadas durante la alimentación con forraje espinoso que daña la mucosa oral. Los baños sanitarios también contribuyen a la infección, favoreciendo la entrada del microorganismo a través de pequeñas heridas de la piel (1). La infección primaria ocurre en la lesión puerta de entrada, con diseminación hematógica y linfática formando abscesos en los nódulos linfáticos más cercanos al sitio de infección (parotídeos, submandibulares, prefemorales, preescapulares, poplíteos o mamarios). Luego ocurre una infección secundaria con la formación de abscesos en ganglios linfáticos (torácicos,

bronquiales y mediastínicos) y diversos órganos (115, 116). Los nódulos mandibulares y preescapulares son los más afectados de forma general (118, 119). En ovinos la apariencia morfológica de los nódulos abscedados es la característica de capa de cebolla al presentar una distribución en láminas concéntricas fibrosas separadas por material caseoso. Por el contrario, en cabras los nódulos exudados usualmente forman una pasta uniforme más bien seca. Esta diferencia podría deberse a la naturaleza de las enzimas fagocíticas, siendo en las cabras de mayor actividad lítica que en las ovejas (40). La prevalencia es superior en cabras y ovejas adultas mayores de 1 año, existiendo correlación directa entre esta y la edad de los animales (118).

Adhesión celular, multiplicación intracelular y diseminación

En el establecimiento de la infección se requiere de la adhesión a las células del hospedero, la multiplicación intracelular y diseminación a otros tejidos, lográndose la persistencia. Los mecanismos involucrados en la adherencia y supervivencia intracelular de *C. pseudotuberculosis* en células no fagocíticas aún siguen siendo objeto de estudio por diversos investigadores. En estudios *in vitro* *C. pseudotuberculosis* fue capaz de adherirse e invadir la línea fibroblástica de células embrionarias de riñón ovino FLK-BLV-044, con replicación celular durante 24 horas y viabilidad bacteriana de 120 horas, con una correlación positiva entre la tasa de adherencia e invasión (120). Estos resultados sugieren que la instauración de la infección, así como la persistencia pueden estar favorecidas por la infección intracelular en tejido de la puerta de entrada y no solo por la infección de células fagocíticas. También se evidenció que la invasión celular de *C. pseudotuberculosis* depende de la concentración bacteriana, sugiriéndose la saturación de los receptores celulares a partir de una multiplicidad de infección (MOI) superior a 100 (120, 121). En la puerta de entrada, la capacidad de

persistencia en células no fagocíticas, así como el factor piógeno (ácidos micólicos de la pared celular) y la exotoxina Fosfolipasa D (PLD), facultan al microorganismo para resistir las defensas antimicrobianas inespecíficas que se interponen a la infección, facilitando el acúmulo de fagocitos en el foco de multiplicación bacteriana.

La bacteria es fagocitada por los macrófagos que son reclutados al sitio de infección y se ha demostrado que tienen la capacidad de permanecer viable dentro de estos hasta 72 horas, evadiendo los mecanismos de eliminación de patógenos que presentan los macrófagos (122).

Los macrófagos proveen protección al organismo al poner en marcha mecanismos inmunes innatos e iniciar el desarrollo de respuestas inmunes específicas a través del procesamiento y presentación de antígenos, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de citocinas (123). Existen diferentes mecanismos para eliminar los patógenos una vez fagocitados, como la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI), los cuales provocan daños a nivel de ADN. La unión de partículas bacterianas a los receptores de la membrana del fagosoma del macrófago provoca el denominado estallido respiratorio que favorece la producción de NADH. Antes de que el lisosoma se fusione con el fagosoma, en éste último, tiene lugar una reducción de oxígeno molecular (O_2) catalizada por la NADPH-oxidasa presente en la membrana del fagosoma. El anión superóxido resultante (O_2^-) es tóxico por sí mismo, pero a su vez da lugar a otros radicales tóxicos de vida corta, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH) y el oxígeno singlete (O^1_2). Cuando el lisosoma se fusiona con el fagosoma, se libera la enzima mieloperoxidasa, que actúa sobre los peróxidos en presencia de haluros (I^- y Cl^-), para producir compuestos halogenados (hipohaluros) muy tóxicos y de vida larga: ácido hipocloroso (ClOH) e hipiodoso (IOH) (124). Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia para protegerse

ante los radicales libres del O_2 . Las superóxido dismutasas (SODs) constituyen una familia de tres metaloenzimas (FeSOD, MnSOD y CuZnSOD) con diferente localización intracelular y distribución, que catalizan la conversión de los radicales superóxido en H_2O y O_2 . En la mayoría de los casos, las SODs son producidas de forma constitutiva por los microorganismos. Se ha comprobado la presencia de Mn/FeSODs en *C. pseudotuberculosis* y el análisis filogenético permitió establecer las diferencias y similitudes evolutivas de las secuencias de esta enzima en hospederos como ovino, caprino, bovino, equino y el humano, así como con diferentes especies de Corynebacterias. También fue posible observar patrones de aminoácidos específicos para cada organismo y, por el contrario, algunos aminoácidos que se conservaron en todos, que se supone que participan en funciones cruciales de la actividad enzimática. Esto explicaría la capacidad que presenta una misma cepa de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis de permanecer en macrófagos de diferentes tipos de hospederos (125). Otro estudio permitió establecer que 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 (121).

Las catalasas son otro tipo de enzimas que intervienen en la defensa de las células frente al estrés oxidativo. *C. pseudotuberculosis* presenta la enzima catalasa (4) que brinda protección ante la acción del H_2O_2 ya que lo descomponen en H_2O y O_2 . También los productos intermediarios de la enzima durante la reacción de dismutación, pueden unirse a NADPH oxidasa, lo que funciona como regulador de la actividad enzimática y disminuye la formación de otros productos de estrés oxidativo como el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (O^1_2) (126). También actúan como otro mecanismo de eliminación de patógenos los productos

reactivos del nitrógeno (RNI). La enzima NOS (óxido nítrico-sintetasa) combina el oxígeno molecular con el nitrógeno guanidino de la L-arginina, para generar óxido nítrico (NO), que es tóxico para bacterias. Los macrófagos de ratón (pero no los humanos) necesitan para activar esta ruta a un nivel óptimo dos señales: interferón gamma (IFN- γ) para activar la enzima NOS, y factor de necrosis tumoral (TNF- α). Se ha demostrado que el LPS puede favorecer la producción de TNF- α y el óxido nítrico, los cuales inducen apoptosis en los macrófagos por dos vías independientes (127). En *C. pseudotuberculosis* la capa de LPS queda protegida por los ácidos micólicos, lo que hace más difícil que el sistema inmune se active por el reconocimiento de esta estructura (76). También el estudio *in vitro* de cepas de *C. pseudotuberculosis* mutantes del factor sigma, fueron más susceptibles a concentraciones de óxido nítrico, por lo que se propone que la presencia de este proteja ante este tipo de estrés oxidativo (107).

Existen mecanismos independientes de oxígeno para la eliminación de los patógenos dentro de los macrófagos: Los cambios de pH tras la fusión del lisosoma primario a la vesícula de endocitosis (formación del heterofagosoma). Las proteínas o péptidos antimicrobianos como las Defensinas, péptidos de 32-34 aminoácidos ricos en Cisteínas y Arginina que se han identificado en los macrófagos de conejo y en los PMN humanos, formando canales permeables a los iones en las bicapas lipídicas de los microorganismos. Las proteasas lisosómicas actúan a pH ácido y las lisozimas destruyen la capa de peptidoglicano. Las Lactoferrinas producidas por neutrófilos secuestran hierro, indispensable para las bacterias, incluso a pH ácido (124). En este sentido se continúan los estudios para identificar los posibles mecanismos por los cuales *C. pseudotuberculosis* es capaz de resistir y multiplicarse en el interior de los macrófagos. La presencia de ácidos micólicos le otorga protección

mecánica y posiblemente bioquímica, permitiéndole resistir la digestión por enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas y la acción de proteínas antimicrobianas. Existe una correlación positiva entre el contenido de estos lípidos, el grosor de la capa lipídica y la habilidad de producir lesiones en nódulos poplíteos de oveja (40, 76). La exotoxina PLD cataliza la disociación de la esfingomiélinea componente importante de las membranas celulares, cuya hidrólisis provoca la lisis celular incrementando la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edemas (128). La PLD actúa directamente sobre las células endoteliales en el entorno del punto de infección y en los macrófagos una vez que ha sido fagocitada la bacteria. La acción de esta toxina facilita la colonización, la diseminación regional y sistémica de la bacteria, con la generación de abscesos en los nódulos linfáticos (40, 129). Las bacterias no controladas por la pared del absceso entran en los capilares y forman colonias que ocluyen los vasos generando isquemia que, junto a las toxinas, destruyen las células del tejido sano, aumentando la masa necrótica. Las bacterias viables se diseminan a través de los vasos linfáticos y penetran otros linfonodos, y eventualmente, en los vasos sanguíneos, llegando a diferentes órganos donde se repite la formación de abscesos. Este comportamiento origina la otra forma de la enfermedad que afecta nódulos linfáticos internos y órganos especialmente pulmón e hígado (116,117,130).

Las bacterias se liberan como resultado de un proceso que conduce a la muerte de los fagocitos, aunque los mecanismos específicos de muerte celular aún no están claros, se sabe que no inducen la autofagia o la apoptosis de los macrófagos. La Caspasa 3 es una proteína esencial en las etapas finales de inducción de apoptosis, así como cataliza la incisión de proteínas celulares y reparadoras de ADN. La proteína I asociada a microtubulos de cadena ligera 3 (MAP LC3-I) es una proteína de membrana crucial en la formación de

autofagosomas, es un marcador del mecanismo de muerte por autofagia. Estudios realizados *in vitro* mediante la infección de la línea de macrófagos J774 con *C. pseudotuberculosis*, permitió determinar que los niveles de la MAP LC3-I y la actividad de la caspasa-3, se mantuvieron estables, sin variación en las células infectadas (131). En otros trabajos la necrosis se ha visto favorecida en vez de la apoptosis, en macrófagos infectados con *C. pseudotuberculosis*, provocando cambios degenerativos como: ruptura de la membrana plasmática, alteraciones en las mitocondrias, cambios en la envoltura nuclear, dilatación de la envoltura del núcleo y de la membrana del retículo endoplásmico rugoso y formación de vesículas en el citoplasma (132, 133). Otras bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella flexnerii* y Clamidias son patógenos intracelulares facultativos, capaces de inactivar la apoptosis (134).

Otra característica de la enfermedad es la formación de piogranulomas, como resultado del crecimiento bacteriano incontrolado dentro de los macrófagos, el hospedero intenta restringir y limitar la infección a través de la formación de estas estructuras (2, 91). Los estudios inmunohistoquímicos sobre la composición celular de las lesiones pulmonares en ovejas infectadas por *C. pseudotuberculosis* han puesto de manifiesto un predominio de macrófagos grandes en las paredes del absceso y rodeando el parénquima pulmonar, con expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC). Los linfocitos T fueron prominentes en las lesiones, mientras que los linfocitos B y granulocitos comprendían una porción menor en los infiltrados celulares. Dentro de las lesiones encapsuladas se encontraron linfocitos y células MHC clase II en el centro de la masa necrótica. Rodeando esta región se identificaron células CD5⁺, así como células CD4⁺ y CD8⁺ distribuidas a través del tejido linfático. Generalmente en las lesiones caseosa inmaduras se encuentran linfocitos

CD4⁺ y en las lesiones más desarrolladas la concentración de células CD8⁺ es predominante, lo que se relaciona con algún mecanismo del sistema inmune para evadir la diseminación de los macrófagos infectados (91, 135). Las características clínicas incluyen, anemia, leucocitosis con neutrofilia y altos valores de fibrinógeno, aumento de inmunoglobulinas (IgG) y de Interferón gamma (IFN- γ) (5, 91, 136). En cabras los cambios histopatológicos observados en el tracto reproductivo y nódulos linfáticos después de la inoculación experimental con *C. pseudotuberculosis*, reveló infiltración leucocítica, así como congestión generalizada, degeneración, infiltración de células del estroma y necrosis en los ovarios (56). El estudio de la respuesta del sistema inmune en un modelo experimental permitió establecer que la respuesta humoral comienza entre el día 6 y 11 post infección. En las etapas tempranas de la infección se produce la expresión IFN- γ siendo su duración de vida corta, seguido de una segunda producción de citoquinas más fuerte y duradera en el tiempo. La producción de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL6 tienen lugar en el sitio de inoculación, mientras que el IFN- γ se encuentra en los linfonódulo drenados. Se plantea que la patogénesis se relaciona con la producción de citoquinas y el desarrollo de piogranulomas (135, 137). El estudio de las proteínas producidas por el hospedero en respuesta a la secreción de citocinas inflamatorias, durante la fase aguda de la enfermedad, permitió establecer que la Haptoglobina, Amiloide A del suero y la α -1-acido glicoproteína aumentaban su concentración induciendo un cambio hacia la fase crónica de la enfermedad (138). Los mecanismos por los cuales la bacteria es capaz de infectar una amplia gama de hospederos, así como sobrevivir y evadir la respuesta del sistema inmune, continúan siendo objeto de estudio, para lograr un mayor entendimiento de esta enfermedad.

Vacunas comerciales

La mayoría de las vacunas comerciales actualmente disponibles para LAC son inactivadas, formuladas a partir de una combinación de antígenos de varios agentes patógenos incluyendo *C. pseudotuberculosis* (139). Algunas de estas vacunas son: Glanvac 3 (Zoetis, London) (140), Glanvac 6® (Zoetis, West Ryde, Australia) (141), Biodectin™ (Zoetis, España) (142), Case-Bac y Caseous D-T (Colorado Serum, EUA) (143). En México no se comercializan ninguna de las vacunas existentes para LAC, a pesar de contar con una amplia representación de empresas productoras de vacunas veterinarias. Las vacunas comerciales confieren una protección parcial, por lo que diferentes grupos de investigadores han trabajado en el desarrollo de nuevas formulaciones que permitan una protección completa y eficaz.

Vacunas experimentales: Inactivadas y toxoides

Las vacunas inactivadas están compuestas por cultivos totales de la bacteria o toxinas no viables, donde el microorganismo se encuentra muerto, por lo que no confieren peligro de desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la respuesta es menos intensa, requiere de varias dosis y pueden provocar efectos adversos. Dentro de las vacunas experimentales a base de toxoide, se evaluó un precipitado proteico, con elevada concentración de PLD inactivada, de una cepa de *C. pseudotuberculosis* aislada de alpaca en Perú. La inmunización de un grupo de 20 ratones BALB/c indujo protección ante el desafío con 10^4 UFC de una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. La vacuna redujo los efectos tóxicos provocados por la bacteria, lo cual se observó con la disminución del número y tamaño de abscesos en los animales del grupo vacunado (40% afectado) en comparación con los múltiples abscesos de mayor tamaño a nivel subcutáneo y en riñón e hígado, en los animales del grupo control (95% afectado).

Sin embargo, cuando se analizaron los intervalos de confianza, se observó que no existían diferencias significativas entre los grupos control y vacunados (144).

La eficacia de cuatro vacunas no comerciales en base a PLD como antígeno se evaluó en ovinos desafiados con una cepa virulenta. Los niveles de iones superóxido se determinaron como respuesta inmune inespecífica, siendo estos elevados en el grupo vacunado con PLD + bacteria inactivada, seguido del grupo vacunado con Toxoide PLD. La actividad de lisozimas fue superior en el grupo vacunado con PLD + bacteria inactivada, seguido de Toxoide PLD, PLD + vacuna comercial Covexin8 y una vacuna experimental local. La respuesta inmune celular se determinó mediante el Kit colorimétrico de medición de proliferación celular ELISA BrdU colorimetric kit (Roche, USA). El grupo vacunado solo con PLD mostró una marcada respuesta positiva 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 (145).

Vacunas atenuadas

Las vacunas atenuadas presentan agentes inmunizantes vivos que pueden replicarse en el organismo sin causar la enfermedad, ya que carecen de determinadas estructuras o moléculas que disminuyen su virulencia. En principio confieren una respuesta inmune muy intensa y de larga duración ya que dan lugar a una infección similar a la natural, pero constituyen un riesgo ya que en algunos casos puede revertirse la virulencia. Las primeras vacunas atenuadas experimentales para LAC empleaban una cepa denominada Toxminus, cuyo gen *pld* se modificó mediante mutación sitio específica. La necropsia de los animales vacunados con 10^5 a 10^7 UFC de la cepa atenuada Toxminus, permitió observar que no se formaron abscesos en los animales desafiados con 10^6 UFC de una cepa virulenta, en comparación con el grupo

control donde se desarrollaron abscesos de 2.5 cm en ganglios poplíteo. Sin embargo la vacuna produjo un absceso indeseable en el sitio de inoculación, el título de anticuerpos en los grupos vacunados con 10^5 a 10^7 UFC fue similar por lo que la respuesta no fue dosis dependiente y la cepa virulenta de desafío indujo una respuesta de anticuerpos superior en las semanas 5 y 9. También hubo una reducción en la capacidad de *Toxminus* de permanecer en el hospedero, debido a la ausencia de PLD, ya que es el antígeno que favorece la persistencia, así como activa de manera elevada la respuesta inmune humoral (146). En otro estudio se transformó la cepa *Toxminus* con un plásmido que contenía el gen de *pld* modificado para la obtención de la exotoxina con un cambio de histidina por un triptófano en la posición 20, lo que elimina la actividad enzimática. La respuesta de anticuerpos anti-PLD fue elevada después de 2 semanas post-vacunación, solo en los animales vacunados con *Toxminus* transformada con el gen *pld*. La respuesta humoral fue de tipo IgG1 por vía oral, mientras que el isotipo IgG2 se observó en ovejas vacunadas por vía subcutánea. La introducción de microorganismos vivos a la mucosa principalmente estimula las respuestas secretoras de IgA, mientras que por la vía subcutánea las respuestas predominantes son humoral IgG y celular (IFN- γ). Las células Th1 secretan IFN- γ y tienden a conducir a una producción de anticuerpos del isotipo IgG2, mientras que los clones Th2 secretan IL 4 y preferentemente inducen IgG1, IgA e IgE. La incidencia y el grado de formación de absceso fueron muy reducidos (abscesos de 0.2cm y 1cm) presentándose solo en dos animales en el sitio de inoculación de la cepa virulenta para el desafío. En el grupo de animales vacunados con *Toxminus* no modificada el 50% de las ovejas desarrollaron abscesos, así como también el 66% de animales del grupo control no vacunado. A pesar de la obtención de resultados muy alentadores el uso de cepas vivas atenuadas siempre implica el riesgo de reversión de la

virulencia, la cepa Toxminus no permitió una expresión elevada de PLD y se encontró evidencia, aunque en una proporción mínima, de la excreción a través de las heces de la bacteria viva atenuada (79). Este grupo de investigadores transformó la cepa Toxminus con un plásmido que contenía el gen *pld* modificado en la Histidina posición 20 por una Serina, logrando aumentar la expresión de la proteína modificada en un 40% en comparación con el trabajo anterior. Pero la modificación genética no favoreció el aumento en la respuesta protectora de la vacuna ya que Glanvac 6 fue capaz de proteger al 95% de los animales desafiados, mientras que la vacuna atenuada con PLD modificada solo protegió al 44% de los animales (147). Mediante mutación por intercambio alélico del gen *aroQ* se logró la obtención de una cepa atenuada que protegió parcialmente a ratones BALB/c desafiados con una cepa virulenta (148). El experimento se reprodujo en ovinos no obteniéndose buenos resultados, ya que los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2 fueron bajos, no aumentaron los niveles de TNF- α y no hubo protección en los animales vacunados (149).

La cepa CZ171053 mutada en el gen *ciuA*, mediante el sistema transposon-TnFuZ (150), presentó una capacidad reducida para sobrevivir *in vitro* dentro de los macrófagos de la línea celular J774, así como indujo una respuesta de producción de inmunoglobulinas y citocinas en ratones BALB/c. La inmunización de ratones BALB/c con esta cepa atenuada, permitió la sobrevivencia del 80% de los animales desafiados con 10^6 UFC de la cepa virulenta MIC-6 (151). Estos resultados sugieren que la cepa CZ171053 podría evaluarse como vacuna viva atenuada en los hospederos diana de la enfermedad.

El comportamiento de la respuesta inmune humoral y celular se evaluó en ratones BALB/c inoculados con 10^7 UFC de una cepa atenuada T1. Se observó que la inoculación experimental con T1 aumento el título de IgG, principalmente las subclases IgG1 e IgG2.

Los ratones vacunados no mostraron lesiones características de la enfermedad y el cultivo de las células del bazo de estos animales, una vez estimuladas *in vitro* con antígenos secretados por T1, presentaron una mayor proliferación que las células estimuladas con antígenos intracelulares de T1 (152, 153). En consecuencia, se encontró en el cultivo de las células del bazo una producción significativa de IFN- γ después de la estimulación con los antígenos secretados e intracelulares. En los animales vacunados no hubo producción elevada de IL-4, sin embargo en células estimuladas con antígenos intracelulares fue cuatro veces mayor en comparación con las estimuladas con antígenos secretados. Las citocinas IL-10 e IL-12 aumentaron su concentración en las células del bazo estimuladas con ambos antígenos, siendo superiores los niveles alcanzados por las células estimuladas con los antígenos intracelulares. La citocina IL-10 puede controlar la síntesis de IFN- γ durante la infección, evitando así la sobrereactividad Th1, mientras que IL-12 puede desencadenar mecanismos relacionados con la proliferación celular, producción de IFN- γ y el cambio a Th1 que se requiere para prevenir la diseminación de patógeno intracelulares (154). También se evaluó el comportamiento de los productos intermediarios reactivos del nitrógeno, los cuales aumentaron sus niveles a los 120 días post inoculación en los cultivos celulares, siendo mayor en las células estimuladas con los antígenos intracelulares de T1. Estos resultados son similares a los descritos por otros investigadores donde la producción IFN- γ fue elevada a partir de la tercera semana post-inoculación con la cepa ATCC 1940, en el cultivo de células del bazo de ratones ICR-JCL (155).

Vacunas de ADN

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo de vacunas de nueva generación, dentro de las que se encuentran las vacunas de ADN desnudo. Estas

vacunas son solo de ADN (plásmidos con los genes de interés), no cuentan con envolturas o estructuras proteicas, por lo que es muy importante la ruta de administración, la dosis, y la re- inmunización ya que son factores que influyen en la potencia y el tipo de respuesta inmune. La desventaja de este tipo de vacunas radica en la capacidad de expresar el antígeno de interés, ya que en la mayoría de los casos las partículas presentan una baja adsorción y la cantidad de plásmidos que se introduce en las células es limitada.

El diseño de un plásmido portador del gen que codifica para el dominio extracelular de CTLA-4 bovino fusionado al gen *pld* inactivado (boCTLA-4-Hlg- Δ PLD) se evaluó como vacuna de ADN desnudo en ovinos. El CTLA-4 se une con alta afinidad al antígeno de membrana B7 en células presentadoras de antígeno (APC), mejorando la respuesta inmune humoral. Aunque aumento el título de anticuerpos significativamente, la protección de los ovinos inmunizados fue parcial ante el desafío experimental con una cepa virulenta (156). Para determinar el sitio de inoculación más eficiente fueron evaluados diferentes vías de inmunización: 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 la vía subcutánea y con pistola génica no protegió a las ovejas contra el desafío (157).

También se probó una vacuna de ADN con el antígeno Hsp60 (plásmido pVAX1/hsp60), la cual fue administrada por vía intramuscular en ratones BALB/c. Esta fue capaz de inducir una respuesta elevada de anticuerpos anti-Hsp60 de tipo IgG1 e IgG2a, con una tendencia a respuesta Th1, pero todos los animales murieron luego del desafío con la cepa virulenta MIC-6 (158). En otros experimentos se determinó el potencial de una vacuna de ADN formulada en base al plásmido pTARGET transformado con la proteína esterasa cp09720 (159, 160).

Esta vacuna de ADN se comparó con una vacuna de subunidades a partir de la esterasa CP09720 obtenida por vía recombinante adyuvada con hidróxido de aluminio. Ambas se evaluaron en ratones BALB/c, siendo la vacuna de proteína recombinante la que indujo mayor título de anticuerpos IgG1 (asociado a respuesta Th2) e IgG2 (respuesta celular Th1). La respuesta inmune celular se analizó mediante la detección de la expresión de los genes que codifican para IL-4, IL-10, IL-12 y IFN- γ por PCR en tiempo real. Las dos vacunas fueron capaces de aumentar la expresión de IFN- γ , aunque la vacuna de subunidades con proteína esterasa cp09720 recombinante presentó los niveles más altos de ARNm de IFN- γ . La expresión de las citocinas IL-4, IL-10 e IL-12 no aumentó en comparación con el grupo control. Los niveles de protección ante el desafío fueron de un 58.3% en los animales vacunados con la esterada recombinante, mientras que la vacuna de ADN pTARGET/proteína esterasa cp09720 solo protegió al 16.6% (160).

Vacunas de Subunidades proteicas recombinantes

Las vacunas de subunidades contienen una combinación de antígenos de diferente naturaleza como lipopolisacáridos, proteínas recombinantes purificadas o péptidos sintéticos. Estas vacunas son muy seguras pero poco inmunogénicas, por lo que se utilizan sustancias adyuvantes que potencien la respuesta del sistema inmune. La proteína PLD obtenida por vía recombinante ha sido de las más empleadas para el desarrollo de vacunas de subunidades. Un grupo de investigadores del Reino Unido determinó las potencialidades de una vacuna a partir de 50ug de PLD obtenida por vía recombinante (PLDr) en *E. coli* y su combinación con 1.25×10^{10} cells/ml de cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* inactivados con formalina. En este trabajo el grupo control fue vacunado con Glanvac 3 (Commonwealth Serum Laboratories (CSL) Ltd., Victoria, Australia), vacuna comercial con licencia de uso

en el Reino Unido. Los niveles más altos de anticuerpos fueron detectados en los grupos inmunizados con la vacuna de PLDr y la vacuna PLDr + células totales inactivadas, en comparación con los grupos controles. No se encontró evidencia de infección en ninguno de los animales inmunizados con la vacuna PLDr y la vacuna PLDr + células totales inactivadas, incluyendo la resolución de abscesos en el sitio de inoculación, solo desarrollados por esta última (161). La combinación de la proteína PLD obtenida por vía recombinante junto a cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis y equi, inactivados con formalina, fueron empleados para la inmunización de ovinos. La detección de los niveles de anticuerpos anti-PLD mediante ELISA permitió detectar que los animales vacunados presentaron un aumento de IgG después de la segunda dosis de refuerzo, pero luego del desafío se produjo una disminución en la DO de 0.65 a 0.55, aunque los niveles se mantuvieron por encima del valor de corte durante 20 semanas. No se observaron lesiones en nódulos linfático externos e internos, en comparación con el grupo control no vacunado donde el 80% de los animales presentaron lesiones y manifestaciones de la enfermedad. Ambas vacunas fueron capaces de proteger a los animales ante el desafío con una cepa virulenta. En este trabajo por primera vez se inmunizan ovejas con una cepa biovar equi en combinación con PLD obtenida por vía recombinante (162). La combinación de diferentes proteínas obtenidas por vía recombinante rCP09720 (esterasa), rCP01850 (proteína L14 de unión a la subunidad ARNr 50S) y la PLD (rPLD) también se ha evaluado en la inmunización de ratones BALB/c. En este estudio las tasas de supervivencia después del desafío con una cepa virulenta fueron de 30% (rPLD), 40% (rPLD + rCP09720) y 50% (rPLD + rCP01850). La vacuna rPLD + rCP01850 fue capaz de inducir una respuesta inmune celular aumentando significativamente los niveles de IFN- γ y TNF- α , mientras que la producción de IL4 e IL12 no fue detectada (163).

Recientemente se empleó una cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus-Calmette- Gueri) para la expresión de PLD recombinante en el plásmido pUS2000. El sistema no fue eficiente para la expresión elevada de la proteína PLD, pero fue efectivo para la vacunación y protección en un modelo murino. La inmunización de ratones BALB/c con 10^6 UFC de *M. bovis* pUS2000/PLD para la expresión de PLD, así como con *M. bovis* pUS2000/PLD+ 50ug de PLDr purificada y la cepa *M. bovis* sin modificar, indujo una producción de anticuerpos elevada en comparación con el control negativo (100uL de Na Cl 0.9%), pero sin diferencias significativas entre los grupos vacunados. Esto se debe a que la cepa *M. bovis* por si sola es capaz de inducir una respuesta inmune humoral y celular elevada. Sin embargo ante el desafío con 2×10^4 UFC de la cepa virulenta MIC-6, el grupo vacunado con *M. bovis* pUS2000/PLD experimento un aumento significativo en los niveles de IgG en comparación con el resto de los grupos. La respuesta inmune celular se evaluó midiendo los niveles de producción de IFN- γ e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo de los animales vacunados, tras ser estimuladas con 8ug/ml de PLDr. Los niveles de IFN- γ e IL-10 fueron superiores en el cultivo celular del grupo que recibió una reactivación de la vacunación con 50ug de PLDr. El nivel de protección conferida por estas formulaciones fue del 88% en los animales vacunados con *M bovis* pUS2000/PLD+ 50ug de PLDr, de un 77% para el grupo *M. bovis* pUS2000/PLD y del 66% para el grupo *M. bovis* no modificado. La respuesta inmune protectora generada por esta vacuna de células enteras de *M. bovis* BCG modificada para expresar PLD, podría originar la activación de varias poblaciones de células T, debido a la variedad de antígenos (lípidos, proteínas y carbohidratos) de la formulación. Luego la re-inmunización con 50ug de la PLD obtenida vía recombinante estimula el aumento en la proliferación de células T específicas para este antígeno en particular (164).

Las vacunas de subunidades también se han desarrollado empleando la proteína CP40 obtenida por vía recombinante. En 1994 fue identificada esta proteína en el sobrenadante de cultivo de *C. pseudotuberculosis* y había sido co-purificada junto con la toxina durante la preparación de vacunas inactivadas. La preparación de las vacunas de PLD a partir de sobrenadantes de cultivo de *C. pseudotuberculosis* habitualmente contienen otros antígenos bacterianos indefinidos que podrían estar contribuyendo con la respuesta inmune protectora. La proteína CP40 fue identificada a través de ensayos de inmunoblot, donde se observó que los sueros de animales vacunados con Glanvac 6 podían reconocer de manera intermitente esta proteína, lo que sugiere que estaba presente en algunos lotes de vacuna. En un estudio experimental en ovejas, la inmunización con 100ug de CP40 recombinante protegió al 82% de los animales, con una disminución de las lesiones pulmonares en un 98%. No se encontró relación entre la disminución en el desarrollo de lesiones pulmonares y el título de anticuerpos, por lo que se asumió que la respuesta celular, como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, podría ser responsable de la protección(79, 83).

Posteriormente se realizó la evaluación comparativa de cuatro formulaciones vacúnales, que utilizaron como inmunógenos la proteína CP40 recombinante y la cepa CP09 atenuada mediante mutagénesis inducida. La cepa viva atenuada de *C. pseudotuberculosis* CP09 no fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en los ratones vacunados, ni desafiados con una cepa virulenta. Los animales vacunados con diferentes formulaciones que incluían CP40r presentaron un aumento significativo en el título de anticuerpos IgG1. Sin embargo, estos grupos luego del desafío experimentaron un aumento significativo en los niveles de IgG2, siendo el máximo alcanzado por los animales inmunizados con CP40r. El isotipo IgG2 se encuentra relacionado con una respuesta celular Th1, células involucradas principalmente

en la inmunidad contra patógenos intracelulares, activación de macrófagos y células T citotóxicas, producción de opsonización y activación del complemento. La formulación a base de CP40r protegió al 90% de los animales ante el desafío con la cepa virulenta, seguido del grupo vacunado con la cepa atenuada CP09 + CP40r con un 70%, mientras que la vacunación con CP40r seguido de la re-inmunización con CP09 solo protegió al 60% (165). Otro grupo de investigadores realizó la evaluación en ratones BALB/c de una vacuna de subunidades de CP40r con diferentes adyuvantes, saponina o adyuvante completo de Freud (ACF). Los animales inmunizados con CP40r/saponina mostraron valores elevados en los niveles completos de anticuerpos y de IgG2a, IgG2b e IgG3, con diferencias estadísticas significativas con respecto al grupo control. El grupo vacunado con CP40r/ACF mostró diferencias significativas en los niveles completos de IgG, IgG2a e IgG2b. Ambas formulaciones vacúnales protegieron al 100% de los animales desafiados, con una tendencia hacia una respuesta de Th1. La reactividad y la producción de isotipos específicos IgG2a, IgG2b e IgG3 se asocian con la acción de las citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ y las células T CD8+, que activan las células B modificando la cadena pesada de la inmunoglobulina. El uso de diferentes adyuvantes no influyó en la respuesta de anticuerpos, por lo que se propone el empleo de la saponina en sustitución del adyuvante de Freud que es tóxico en ovejas (166).

Conclusiones

La Linfadenitis caseosa continúa siendo un reto para los productores ovinos y caprinos. Las investigaciones más recientes se han enfocado en la identificación de nuevas moléculas implicadas en los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *C. pseudotuberculosis*, para su posterior evaluación como candidatos vacúnales. Hasta la fecha se han obtenido resultados

alentadores con formulaciones a base de la exotoxina PLD o la endoglicosidasa CP40, obtenidas por vía recombinante. Cabe destacar que la combinación de estas moléculas no se ha evaluado en una misma vacuna, lo cual sería una propuesta que favorecería la activación de la respuesta inmune humoral y celular. Por otra parte la aplicación del análisis computacional en estudios de vacunología reversa constituye una de las herramientas más empleadas actualmente en la búsqueda de moléculas candidatas vacúnales. Sin duda se debe continuar trabajando con el empleo de estas tecnologías que constituyen una alternativa eficiente para la identificación de nuevos factores de virulencia, así como la evaluación *in silico* de moléculas con potencial inmunogénico para el desarrollo de vacunas eficaces.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias Bibliográficas

1. Dorella FA, Pacheco LG, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary research* 2006; 37(2):201–218.
2. Bastos BL, Dias PRW, Dorella FA, Ribeiro D, Seyffert N. *Corynebacterium Pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunologic* 2012; S4 (005): 1-15.
3. Von-Graevenitz A., Bernard K. The Genus *Corynebacterium* Medical. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY.2006.
4. Bernard K. The Genus *Corynebacterium* and Other Coryneform-Like Bacteria. Medically Relevant. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50(10): 3152–3158.

5. 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.
6. 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.
7. Faeza NMN, Jesse FFA, Hambal IU, Odhah MN, Umer M, Wessam MMS, *et al.* Responses of testosterone hormone concentration, semen quality, and its related pro-inflammatory cytokines in bucks following *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its mycolic acid infection. *Trop Anim Health Prod* 2019; 51(7):1855-1866.
8. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Plan rector sistema producto ovinos (2015-2024). Actualización 2016. https://spo.uno.org.mx/wp-content/uploads/2016/05/plan_rector_ovinos2016.pdf.pdf. Acceso Marzo 2020.
9. Behrendt K, Weeks P. How are global and Australian sheepmeat producers performing?. *MLA Market Information Report* 2019. <https://www.researchgate.net/publication/331464399>. Acceso Marzo 2020.
10. Gao H, Ma Y, Shao Q, Hong Q, Zheng G, 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.
11. 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.

12. de Farias AEM, Alves J R A, Alves FSF, Pinheiro RR, Faccioli MPY, Lima A MC, *et al.* Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. Trop Anim Health Prod 2019; 51(4):745-752.
13. Tadich N, Alvarez C, Chacón T ,Godoy H. Caseous Lymphadenitis (CLA) in sheep at the XI Region of Chile. Arch med ve 2005; 37(2):161-167.
14. Szwako A, Ortíz N, López D. Prevalencia de Linfadenitis caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) en caprinos de establecimientos lecheros del departamento central - Paraguay, año 2012. Compend cienc vet 2014; 04 (01): 24 – 29.
15. Debien E, Hélie P, Buczinski S, Leboeuf A, Bélanger D, 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.
16. Ilhan Z. Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. Revue Méd Vét 2013; 164(2): 60-66.
17. Estevao S, Gallardo A, Ábalos A, Díaz Y, Álvarez L, Callejo R, *et al.* Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. Rev Argent Microbiol 2007; 39: 44-46.
18. Williamson LH. Caseous lymphadenitis in small ruminants. En Update on Small Ruminant Medicine. Vet Clin NA: Food Anim Pract 2001; 17(2): 359-371.
19. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera . Reporte de producción pecuaria. 2019. http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp. Acceso Abril 2020.
20. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Población ganadera, cabezas ovinos. 2009-2018. 2019.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/516348/Inventario_2018_Ovino.pdf.

Acceso Abril 2020

- 21.** SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Población ganadera, cabezas caprinos. 2009-2018. 2019.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/516350/Inventario_2018_Caprino.pdf

. Acceso Abril 2020.

- 22.** FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura.

Perspectivas alimentarias, Resúmenes de mercado.2018. <http://www.fao.org/home/es/>.

Acceso Enero 2020.

- 23.** Ochoa UG, Deuces IJ, Martínez LP, Jiménez BMR, Pérez RM. Aislamiento de agentes

bacterianos a partir de exudados nasales en rebaños ovinos trashumantes de Xalatlaco

México. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 1996. Brasil. PN9.

12909: 230.

- 24.** Barrientos PJS, García GDA, Cuellar OJA, Garcia VS. Distribución de lesiones de

linfadenitis caseosa en ovinos. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias

1996. Brasil. 495: 252

- 25.** Carrillo G, Ortega S, Hernandez S. Prevalencia de Linfadenitis caseosa en hatos

caprinos de la Comarca Lagunera de Durango. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas

2005; 4: 51-56.

- 26.** Varela GJA, Montes de Oca JR, Acosta JD, Hernández FL, Morales EV, Monroy SGH.

First report of isolation and molecular characterization of the pathogenic

Corynebacterium pseudotuberculosis from of sheep and goats in Mexico. Microb

Pathog 2018; 117:304-309.

27. 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).
28. Muñoz BAV, Cortés PYA, Arellano RB, Hernández GM, Hernández CR, 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.
29. Burkovski A. Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. *ISRN Microbiol* 2013; 935736:11.
30. Songer JG, Beckenbach K, Marshall MM, Olson GB, Kelly L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am J Vet Res* 1988; 49:223-226.
31. Ruiz JC, D'Afonseca V, Silva A, Ali A, Pinto AC. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One* 2011; 6(4): e18551.
32. Muller B, de Klerk LLM, Henton MM, Lane E, Parsons S, Kotze A, et al. Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Vet Microbiol* 2011; 147: 340–345.
33. Silva A, Schneider MPC, Cerdeira L, Barbosa MS, 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.
34. Sprake P, Gold JR. *Corynebacterium pseudotuberculosis* liver abscess in a mature alpaca (*Lama pacos*). *Can Vet J* 2012; 53:387–390.

35. 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.
36. Colom CA, Velarde R, Salinas J, Borge C, Garca BI, Serrano E, et al. Management of a Caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. *Acta Vet Scand* 2014; 56:83.
37. Oliveira M, Barroco C, Mottola C, Santos R, Lemsaddek A, Tavares L, Semedo LT. First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *Vet Res* 2014; 10: 218.
38. Borham M, Oreiby A, El GA., Al GM. Caseous Lymphadenitis in Sudanese and Somalian camels imported for meat consumption in Egypt. *AJVS* 2017; 55 (2): 52-59.
39. Perkins SL, Magdesian KG, Thomas WP, Spier SJ. Pericarditis and pleuritis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224 (7):1133–1138.
40. Aleman MR, Spier SJ. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: Smith PB, ed. *Large animal internal medicine*, 3rd ed. St. Louis: Mosby Co. 2002: 1076–1084.
41. Aleman M, Spier S J, Wilson W D. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982–1993). *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209:804–809.
42. Silva A, Ramos RTJ, Ribeiro Carneiro A, Cybelle Pinto A, de Castro Soares S. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Cp31, isolated from an Egyptian Buffalo. *J Bacteriol* 2012; 194: 6663–6664.

43. Viana MVC, Figueiredo H, Ramos R, Guimares LC, Dorella FA, Azevedo V. Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. *PLoS ONE* 2017; 12(4): e0176347.
44. Lester WA, Schousboe M, Chambers S, Patton WN. A second case of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in New Zealand. *NZ Med J* 1997; 110:469-470.
45. House RW, Schousboe M, Allen JP, Grant CC. *Corynebacterium ovis* (pseudotuberculosis) lymphadenitis in a sheep farmer: a new occupational disease in New Zealand. *NZ Med J* 1986; 99:659-62.
46. Hémond V, Rosensting S, Auriault ML, Galanti MJ, Gatfosse M. Lymphadénite axillaire à *Corynebacterium pseudotuberculosis* chez une patiente de 63 ans. *Med Maladies Infect* 2009; 39(2):136–139.
47. Trost E, Dorella FA, Soares S, D'Afonseca V, Silva A, Azevedo V, *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.
48. Romero PJC, Suner MM, Batista DN. Linfadenitis por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en una paciente joven. *Rev Clin Esp* 2004; 204:388-389.
49. Goldberger AC, Lipsky BA, Plorde JJ. Suppurative granulomatous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ovis* (pseudotuberculosis). *Am J Clin Pathol* 1981; 76:486-490.
50. Heggelund L., Gaustad P, Håvelsrud OE, Blom J, Borgen L, Sundset A, Sorum H, Froland SS. *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. *Open Forum Infect Dis* 2015; 2(2): ofv053.

51. Fernández AM, Reina G, Rubio M, Leiva J. Infecciones por *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. y *Listeria* spp. Med 2018; 12 (49): 2901-9.
52. 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.
53. Guimarães AS, Carmo FB, Heinemann MB, Portela RWD, Meyer R, Azevedo, V., *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.
54. Pinto AC, de Sá PHCG, Ramos RTJ. *et al.* Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. BMC Genomics 2014; 15: 14.
55. 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.
56. Jesse FFA, Odhah MN, Abbad Y, Garba B, Mahmood Z, Hambali IU, *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. Microb Pathog 2020; 139: 103852.
57. Faeza NMN, Jesse FFA, Hambali IU, Yusuf A, Odhah MN, Wessam MMS, *et al.* Clinico-pathological responses in reproductive system and its associated lymph nodes

of bucks challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its mycolic acid extract. *Comp Clin Pathol* 2019; 28: 1547–1558.

58. Cetinkaya B, Karahana M, Atila E, Kalina R, De Baereb T, Vaneechoutte M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microb* 2002; 88: 75–83.
59. Pascual C, Lawson PA, Farrow JA, Gimenez MN, Collins MD. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45: 724–728.
60. Ott L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS Microb* 2018; 4(1): 85–103.
61. Pacheco LGC, Pena RR, Castro TLP, Dorella FA, Bahia RC, Azevedo V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J Med Microbiol* 2007; 56(4):480-486.
62. Khamis A, Raoult D, La-Scola B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3925–3931.
63. Khamis A, Raoult D, La- Scola B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1934–1936.
64. D’Afonseca, Moraes PM, Dorella FA, Pacheco LGC, Meyer R, Azevedo V. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genet Mol Res* 2008; 7 (1): 252-260.

65. Almeida S, Dorneles E, Diniz C, Abreu V, Sousa C, Azevedo V. Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar ovis and equi. BMC Vet Res 2017; 13:290.
66. Sutherland SS, Hart RA, Buller NB. Ribotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. Aust Vet J 1993; 70:454–456.
67. Connor KM, Quirie MM, Baird G, Donachie W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel Electrophoresis. J Clin Microbiol 2000; 38: 2633–2637.
68. Connor KM, Fontaine M, Rudge K, Baird G, Donachie W. Molecular geno-typing of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. Vet Res 2007; 38 (4):613-623.
69. Stefańska I, Rzewuska M, Binek M. Evaluation of Three Methods for DNA Fingerprinting of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from goats in Poland. Polish J Microbiol; 57 (2):105-112.
70. Nowicki M, Kaba J, Mosiej E, Lutyńska A, Augustynowicz E, Stefańska I, *et al.* Fingerprinting of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains by Random amplified polymorphic DNA and Amplified fragment length polymorphism techniques. Bull Vet Inst Pulawy 2011; 55: 403-409.
71. Soares SC, Silva A, Trost E, Blom J, Ramos R, 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.

72. Dorneles EMS, Santana JA, Ribeiro D, Dorella FA, Guimaraes AS, *et al.* Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates. PLoS ONE 2014; 9(6): e98758.
73. Oliveira A, Teixeira P, Azevedo V, 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 2016; 16:100.
74. Oliveira A, Oliveira LC, Aburjaile F, Benevides L, Tiwari S, Azevedo V, *et al.* Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. Front Microbiol 2017; 8:1937.
75. Soares SC, Trost E, Ramos RTJ, Carneiro AR, Santos AR, Pinto AC, *et al.* Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. *J Biotech* 2013; 167(2): 135-141.
76. Burkovski A. The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie van Leeuwenhoek* 2018;111(5):717-725.
77. Aquino de Sá Mda C, Gouveia GV, Krewer Cda C, Veschi JL, de Mattos-Guaraldi AL, da Costa MM. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genet Mol Biol* 2013; 36(2):265-268.
78. Hodgson A L M, Bird P, Nisbett IT. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 1990; 172:1256–1261.

79. Hodgson AL M, Tachedjian M, Corner LA, Radford AJ. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infect Immun1994; 62 (12): 5275-5280.
80. Baird GJ, Fontaine MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. J Comp Pathol 2007. 137(4): 179-210.
81. Li SS, Li Y, Long N, Jiang F, Zhang R. Highly active and stable nanobiocatalyst based on in-situ cross-linking of phospholipase D for the synthesis of phosphatidylserine. Int J Biol Macromol 2018;117 :1188–1194.
82. Jost BH, Billington SJ . *Corynebacterium* and *Arcanobacterium* in: Gyles CL, Prescott JF, Songer G and Thoen CO (eds) Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3rd edition. John Wiley & Sons, Yowa,2004: 77-86.
83. Walker J, Jackson HJ, Wilson MJ, Eggleton DG, Meeusen ENT, Brandon M R. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against Caseous lymphadenitis. Infect Immun 1994;. 62:2562–2567.
84. Walker J, Wilson MJ, Brandon MR. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infect Immun 1995; 63:206–11.
85. Shadnezhad A, Naegeli A, Collin M. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a endo B-N- acetylglucosaminidase. BMC Microbiol 2016; 63(1): 206-211.
86. Garbe J, Collin M. Bacterial hydrolysis of host glycoproteins – powerful protein modification and efficient nutrient acquisition. J Innate Immun 2012; 4:121–31.

87. Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. (1997). *Curr Opin Struct Biol*.7:637–44.
88. Karlsson M, Stenlid J. Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008; 16:208–23.
89. Pacheco LGC, Slade SE, Seyffert N, Santos AR, Castro TLP. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiol* 2011; 11: 12.
90. Seyffert N, Silva RF, Jardim J, Silva WM, Castro TL, Tartaglia NR, et al. Serological proteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. *Vet Microbiol* 2014; 174:255–60.
91. Paule BJA, Azevedo V, Regis LF, Carminati R, 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.
92. Silva W M, Dorella FA, Soares SC, Souza GHM, Seyffert N, Azevedo V, et al. A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. *BMC Microbiology* 2017;17(1):55.
93. Corrêa JI, Stocker A, Castro ST, Vale V, Brito T, Bastos B, et al. In vivo and in vitro expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. *AMB Expr* 2018; 8:89.

94. Schultz IJ, Chen C, Paw BH, Hamza I. Iron and Porphyrin Trafficking in Heme Biogenesis. *J Biol Chem* 2010; 285(35):26753–9.
95. Sheldon JR, Heinrichs DE. Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2015; 39(4):592–630.
96. Billington SJ, Esmay PA, Songer J, Jost B, Hoppert M, Liebl W. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 208 (1):41–5.
97. Raynal JT, Bastos BL, Vilas-Boas PCB, Sousa TJ, Costa-Silva M, Azevedo V et al. Identification of membrane-associated proteins with pathogenic potential expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum. *BMC Res Notes* 2018; 11(1):73.
98. Ibraim IC, Parise MT, Tadra MZ, de Paula TL, Wattam AR, Azevedo V, et al. Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation. *BMC Genomics* 2019;20:663.
99. O'Connor K, Fletcher SA, Csonka LN. Increased expression of Mg(2+) transport proteins enhances the survival of *Salmonella enterica* at high temperature. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106: 17522–17527.
100. Schonert S, Buder T, Dahl MK. Identification and enzymatic characterization of the maltose-inducible alpha-glucosidase mall (sucraseisomaltase- maltase) of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1998; 180: 2574–2578.
101. May T, Ito A, Okabe S . Induction of multidrug resistance mechanism in *Escherichia coli* biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 4628–4639.

- 102.** Vassylyev DG, Tomitori H, Kashiwagi K, Morikawa K, Igarashi K. Crystal structure and mutational analysis of the Escherichia coli putrescine receptor: structural basis for substrate specificity. *J Biol Chem* 1998; 273: 17604–17609.
- 103.** Saïd-Salim B, Mostowy S, Kristof AS, Behr MA. Mutations in Mycobacterium tuberculosis RV0444c, the gene encoding anti-sigK, explain high level expression of mpb70 and mpb83 in Mycobacterium bovis. *Mol Microbiol* 2006; 62: 1251–1263.
- 104.** Veyrier F, Saïd-Salim B, Behr MA. Evolution of the mycobacterial sigK regulon. *J Bacteriol* 2008;190: 1891–1899.
- 105.** Kunkle CA, Schmitt MP. Analysis of a dtxR-regulated iron transport and siderophore biosynthesis gene cluster in Corynebacterium diphtheriae. *J Bacteriol* 2005;187: 422–433.
- 106.** Pacheco LGC, Castro TLP, Carvalho RD, Moraes PM, Dorella FA, Azevedo V , et al. A role for sigma factor σ in Corynebacterium pseudotuberculosis resistance to nitric oxide/peroxid stress. *Front Microbiol* 2012;3:126.
- 107.** Rogers EA, Das A, Ton-That H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. *Adv Exp Med Biol* 2011;715:91–103.
- 108.** Hasday JD, Thompson C, Singh IS. Fever, immunity, and molecular adaptations. *Compr. Physiol* 2014; 4: 109–148.
- 109.** Caruso IP, Panwalkar V, Coronado MA, Dingley AJ, Cornélio ML, Willbold D., et al. Structure and interaction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cold shock protein A with Y-box single-stranded DNA fragment. The FEBS Journal 2018; 285 (2): 372-390.

- 110.** Costa, P. M., McCulloch, J. A., Almeida, S.S, Dorella, F. A., Fonseca, A. Azevedo V, et al. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. BMC Res Notes 2011. 4:243.
- 111.** Pinto GAC, Gomes S P, Queiroz AL, Sousa T, Rodrigues L, Azevedo V, et al. Heat shock stress: Profile of differential expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi Gene 2018; 645:124–130.
- 112.** Bandyopadhyay B, Das GT, Roy D, Das GSK. DnaK dependence of the mycobacterial stress-responsive regulator HspR is mediated through its hydrophobic C-terminal tail. J Bacteriol 2012; 194, 4688–4697.
- 113.** Servant P, Mazodier P. Negative regulation of the heat shock response in *Streptomyces*. Arch Microbiol 2001; 176, 237–242.
- 114.** Silva WM, Seyffert SN, Santos AV, Castro TLP, Pacheco LGC, Azevedo V, et al. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteoma. Microb Pathog 2013;.1e6: 1-6.
- 115.** 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.
- 116.** Mahmood ZKH, Jesse FF, Saharee AA, Jasni S, Yusoff R, 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.

- 117.** 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.
- 118.** Al-Gaabary MH, Osman SA, Oreiby AF. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Rumin Res* 2009; 87 : 116–121.
- 119.** Delgado DA, Zárraga J, Chirino-Zárraga CI, Carrero Portillo LL. Caracterización epidemiológica de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Paraguaná, Venezuela. *Rev Med Vet* 2015;(31):35-45.
- 120.** Valdivia J. Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.(Tesis de Doctorado). España, Islas Canarias: Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Sanidad animal y Seguridad alimentaria;2015.
- 121.** López-Doriga MV, Barnes AC, Dos Santos NM. Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. piscicida: evidence for receptor specificity and effect of capsule and serum. *Microb* 2000; 146: 21-30.
- 122.** Mckean S, Davies J, Moore R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes Infect* 2005;7:1352-1363.
- 123.** Duque MA, Rojas M. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmun* 2007; 26 (2): 73-86.

124. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular e Molecular*. 8th ed. Sao Paulo, Brazil: Elsevier; Medicina Nacionais, 2015.
125. Oliveira A, Teixeira P, Barh D, Barh D, Ghosh P, 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* 2017; 1(1):1-11.
126. Díaz A. La estructura de las catalasas. *Rev Edu Bioq* 2003; 22 (2): 76-84.
127. Comalada M. Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir. (Tesis de Doctorado) España. Universidad de Barcelona Departamento de Fisiología. 2002.
128. Mao X, Liu Q, Qiu Y, Fan X, Han Q, Liu Y, Zhang L, Xue C. Identification of a novel phospholipase D with high transphosphatidyltransferase activity and its application in synthesis of phosphatidylserine and DHA-phosphatidylserine. *J Biotechnol* 2017; 10(249): 51-58.
129. McKean SC, Davies JK, Moore RJ. Expression of phospholipase D the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microb* 2007; 153: 2203-2211.
130. Estavao, B.S., Gallardo, A., Abalo, A., Jodor, N., Jensen, O. (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Rev Vet Arg*. 23:258-278.
131. Stefańska I, Gieryńska M, Rzewuska M, Binek M. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish J Vet Sci* 2010; 13(1):143-9.

132. Hard GC. Examination by electron microscopy of interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. *J Med Microbiol* 1972; 5:483-491.
133. Tashjian JJ, Campbell SG. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. *Am J Vet Res* 1983; 44: 690-693.
134. Faherty CS, Maurelli AT. Staying a live: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends Microbiol* 2008;6:173-180.
135. Dorella FA, Pacheco LGC, Seyffert N, Portela RW, Meyer R N, Azevedo V, *et al.* Antigenes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Exp Rev Vaccines* 2009; 8: 205–213.
136. Rebouças MF, Portela RW, Lima DD, Loureiro D, Bastos BL. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: Potential diagnostic marker for Caseous Lymphadenitis in sheep and goats. *J Vet Diag Invest* 2011; 23: 213-220.
137. El-Enbaawy MI, Saad MM, Selim SA. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Egypt J Immunol* 2005; 12(2):13-9.
138. Eckersall PD, Lawson FP, Bence L. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res* 2007; 3:35-40.
139. Fontaine M. Caseous lymphadenitis in sheep. *The Moredun Foundation News Sheet* 2015; 6(5).

140. Paton MW, Sutherland SS, Rose IR, Hart RA, Mercy AR, Ellis TM. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. Aust Vet J 1995;72: 266–9.
141. Windsor PA, Bush RD. Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination?. Small Rumin Res 2016; 142:6-10.
142. Zoetis, 2020. Zoetis Spain, S.L. Avda. de Europa 20 B, Parque Empresarial La Moral. https://www.zoetis.es/_locale-assets/spc/biodectin.pdf. Acceso Abril,2020.
143. ValleyVet 2020. Colorado serum company. 4950 YORK STREET, P.O. BOX 16428, DENVER, CO, 80216-0428.
144. Medrano G, Hung ACh, Alvarado AS, Li EO. Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. Rev Inv Vet 2003; 14 (1): 61-67.
145. Syame SM, Abuelnaga ASM, Ibrahim ES, 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.
146. Hodgson ALM, Krywult J, Corner LA, Rothel JS, Radford AJ. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential Cheesy Gland Vaccine and Live Delivery Vehicle. Infect Immun 1992; 60(7):2900-2905.
147. Hodgson AL, Moore RJ, Rothel L, Krywult J, Radford AJ, Lund K. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. Vaccine 1999; 18:487-497.
148. Simmons CP, Hogdson AL, Strugnell RA. Attenuation and vaccine potencial of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infect Immun 1997;65:3048-3056.

- 149.** Simmons CP, Dunstan SJ, Tachedjian M, Krywult J, Hogdson AL, Strugnell RA. Vaccine potencial of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun* 1998; 66: 474-479.
- 150.** Dorella FA, Estevam EM, Pacheco LG, Guimaraes CT, Lana UG, Oliveira SC, Azevedo V, et al. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:7368–7372.
- 151.** Ribeiro D, Rocha FS, Leite KM, Soares SC, Silva A, Azevedo V, et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Vet Res* 2014; 45:28.
- 152.** Vale CVL, da Costa S M, Pacheco de S A, Castro T S, Ferreira de MC L, Nobre dos S EK, 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.
- 153.** Paule BJ, Meyer R, Moura-Costa LF, Bahia RC, Carminati R, Regis LF. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction / concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr Purif* 2004; 34:311–316.
- 154.** Fortune SM, Solache A, Jaeger A, Hill PJ, Belisle JT, Bloom BR, et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN- γ through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2004; 172:6272–80.

- 155.** Lan DT, Makino SI, Shirahata T, Yamada M, Nakane A. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *J Vet Med Sci* 1999;11:1203–8.
- 156.** Chaplin PJ, De Rose R, Boyle JS, McWaters P, Kelly J, Tennent JM, et al. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun* 1999; 67: 6434–6438.
- 157.** De Rose R, Tennent J, McWaters 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.
- 158.** Costa PM, McCulloch J A, Almeida SS, Dorella FA, Fonseca CT, Oliveira DM, et al. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. *BMC Res Notes* 2011; 4:243.
- 159.** Santos A R, Carneiro A, Gala-García A, Pinto A, Barh D, Barbosa E, et al. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. *BMC Genomics* 2012;13(5):S6.
- 160.** Brum AA, Silva AFR, Silvestre FB, Collares T, Begnine K, Kommling F, et al. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. *J Med Microb* 2017; 66: 635–642.
- 161.** Fontaine MC, Baird G, Connor KM, Rudge K, Sales J, Donachie W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United

- Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine* 2006; 24: 5986–5996.
- 162.** Moussa IM, Mohamed SA, Ashgan M, Hessain SA, Kabli E, Hassan AH, et al. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. *Saudi J Biol Sci* 2016, 23: 718–723.
- 163.** Silva MTO, Bezerra FSB, de Pinho RB, Begnini 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.
- 164.** Leal K S, Silva TO, Silva AFR, Brilhante FSB, Begnini K, Seixas F, 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.
- 165.** Silva JW, Droppa-Almeida D, Borsuk S, Azevedo V, Portela RW I. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res* 2014;10:965.
- 166.** Droppa-Almeida D, Vivas WL, Silva KK, Rezende AF, Simionatto S. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine* 2016;34 (8):1091–1096.