



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

**“Evaluación de un inmunógeno para el control de
Corynebacterium pseudotuberculosis en ovinos”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

M.V.Z. Corache García Pulido

DICIEMBRE 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

**“Evaluación de un inmunógeno para el control de
Corynebacterium pseudotuberculosis en ovinos”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

M.V.Z. Corache García Pulido

Tutor académico

Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez

Tutores adjuntos:

Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat

M. en C. Pomposo Fernández Rosas

DICIEMBRE 2017

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo formo parte del proyecto de investigación “Identificación de genes de patogenicidad de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y desarrollo de una bacterina multicomponente” con clave UAEM 3806/2014/CIA.

INDICE

	PAGINA
I Introducción	1
II Antecedentes	3
1.- Situación de la Ovinocultura.....	3
1.1 Mundial.....	3
1.2 Nacional.....	4
1.3 Estatal.....	5
2.- Características del agente.....	6
3.- Epidemiología.....	9
4.- Manifestaciones clínicas y Patogenia.....	11
5.- Transmisión.....	18
6.- Respuesta inmune en el hospedero.....	19
7.- Diagnóstico.....	20
7.1 Clínico.....	20
7.2 Histológico.....	21
7.3 Bacteriológico.....	21
7.4 Serológico.....	22
7.5 Molecular.....	24
7.6 Diferencial.....	25
8.- Tratamiento.....	26
9.- Importancia Económica.....	26
10.- Zoonosis.....	27
11.- Control.....	28
12.- Biológicos usados para control de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	29
12.1 Vacunas experimentales.....	29
12.1.1 Vacunas muertas o inactivadas.....	29
12.1.2 Vacunas vivas atenuadas.....	30
12.1.3 Vacunas de subunidades antigénicas.....	31

12.1.4 Vacunas Recombinantes.....	31
12.1.5 Vacunas de ADN.....	32
12.2 Vacunas Comerciales.....	33
12.2.1 Vacuna de fracciones antigénicas.....	33
12.2.2 Vacuna de Toxoide.....	33
12.2.3 Vacuna viva atenuada.....	34
12.3 Comparativo entre vacunas comerciales y experimentales.....	34
III JUSTIFICACIÓN	38
IV HIPÓTESIS	40
V Objetivos	41
VI MATERIAL Y MÉTODOS	42
VII RESULTADOS	52
VII DISCUSIÓN.....	64
IX CONCLUSIONES	70
X SUGERENCIAS	71
XI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
XII ANEXOS.....	85

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Fig 1. Inventario ovino 2013 (1.000 cabezas).....	3
Fig 2. Flujo de carne de ovino 2014 (miles de ton).....	4
Fig 3. Población ovina nacional 2015.....	4
Fig 4. Importaciones de carne ovina 2012.....	5
Fig 5. Mapa con los países que informaron de su situación sanitaria con LCA en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 1996-2004.....	11
Fig 6. Patología de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	16
Fig 7. Localización predominante de linfonódulos afectados en Linfadenitis caseosa: submandibular, parotídeo, retro-faríngeo....	17
Fig 8. Localización de linfonodos afectados en Linfadenitis caseosa. a) parotideo b) retrofaringeo c) submandibular d) preescapular e) sub-iliaco f) poplíteo.....	17
Fig 9. Inoculación en el modelo murino.....	45
Fig 10. Diseño Experimental.....	47
Fig 11. Comportamiento de Temperatura corporal por grupo.....	53
Fig 12. Comportamiento de ganancia de peso por grupo.....	54
Fig 13. Imagen de absceso subcutáneo cordero 92.....	55
Fig 14. Imágenes de estudio macroscópico a la necropsia	55
Fig 15. Imagen de estudio bacteriológico.....	57
Fig 16. Microfotografías de pulmón.....	60
Fig 17. Microfotografías de Ganglio.....	61
Fig 18. Títulos de anticuerpos por grupo.....	61

INDICE DE CUADROS

	PAGINA
Cuadro 1. Tiempo de supervivencia de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en exudado.....	9
Cuadro 2. Desarrollo de biológicos contra <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	35
Cuadro 3. Características externas de los abscesos.....	42
Cuadro 4. Resultados de pruebas Bioquímicas.....	43
Cuadro 5. Genes de Virulencia encontrados.....	43
Cuadro 6. Bando proteico de las cepas H14X y 1-2 2LJ.....	43
Cuadro 7. Inmunización y Desafío.....	46
Cuadro 8. Iniciadores empleados en el PCR gen <i>16s</i> , <i>rpoB</i> y <i>pld</i> para <i>C. pseudotuberculosis</i>	48
Cuadro 9. Iniciadores empleados en PCR genes <i>Fag A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> y <i>D</i>	48
Cuadro 10. Iniciadores empleados en PCR gen <i>hp60</i>	49
Cuadro 11. Tabla formula sensibilidad y especificidad.....	51
Cuadro 12. Resultados de la prueba con el Kit API <i>Coryne</i>	58
Cuadro 13. Tabla de cálculo especificidad y sensibilidad.....	62
Cuadro 14. Resultados del ANOVA por muestras repetidas.....	62

RESUMEN

Linfadenitis caseosa (LCA) es una enfermedad contagiosa, infecciosa y crónica, de importancia económica en ovinos causada por *C. pseudotuberculosis*. El objetivo de este trabajo fue evaluar un inmunógeno creado a partir de cepas nativas que confieran protección a los rebaños ovinos en México. Se evaluó en un modelo ovino con 16 animales de rebaños clínicamente libres de la enfermedad, de 4 meses de edad. Se formaron cuatro grupos, grupo vacunado, grupo desafiado con vacunación, grupo desafiado sin vacunación, grupo control negativo. Se inmunizó vía subcutánea sobre la escápula izquierda con la bacterina hecha con las cepas de campo H14X y 1-2 2LJ identificadas por pruebas bioquímica y molecularmente mediante la identificación de genes de patogenicidad por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se desafió vía subcutánea sobre el nódulo preescapular derecho, con cepa de referencia 43926 ATCC biovariedad *ovis*. En la necropsia sólo se encontraron lesiones en pulmón y nódulo linfoide en 3 de los 4 animales del grupo desafiado; de estas lesiones se reaisló la bacteria *C. pseudotuberculosis*, la cual amplifico los genes de patogenicidad y virulencia. Con relación a la prueba de ELISA se presentaron incremento de absorbancias el día de la revacunación; sin embargo, al realizar el análisis estadístico no mostro diferencias significativas entre los grupos. Por lo cual podemos observar que los animales vacunados con desafío no presentaron lesiones aunque no incrementaron de manera significativa los anticuerpos en comparación con los animales del grupo desafiado por lo cual se recomienda seguir con los estudios de dicha bacterina para poder determinar la respuesta inmune que está generando.

Palabras clave: Bacterina, Linfadenitis Caseosa, ELISA.

ABSTRACT

The caseous lymphadenitis (CLA) is a contagious disease and chronic disease. It is of economic importance in sheep caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The objective of this work was to evaluate an immunogen created from native strains that confer protection to sheep in Mexico. It was evaluated in a model with 16 animals of herds clinically free of the disease, 4 months of age. Four groups were formed, vaccinated group, group with vaccination, control group without vaccination, negative control group. It was immunized subcutaneously on the scapula with the bacterin made with the field strains H14X and 1-2 2LJ identified by biochemical and molecular tests by means of the identification of pathogenicity genes by reaction in the polymerase chain (PCR). The prescapular right is challenged, with reference strain 43926 ATCC biovariedad ovis. At necropsy only lesions in the lung and ganglion were found in 3 of the 4 animals of the challenged group, of these lesions the *C. pseudotuberculosis* bacterium was reabsorbed, which amplifies the pathogenicity and virulence genes. In relation to the ELISA test, the increase in absorbances occurred on the day of the revaccination; however, when performing the statistical analysis there were no differences between the groups. Why can you observe that animals vaccinated with challenge do not get hurt even though they do not have the significant way that the antibodies compared with the animals in the group are affected by what can be followed with the studies of that bacteria to be able to determine that the immune response that is generating

Key words: Bacterin, Caseous lymphadenitis, ELISA.

I. INTRODUCCIÓN

La población de ovinos en México en la actualidad asciende a 8.8 millones de cabezas. siendo una de las actividades agropecuarias de mayor crecimiento y rentabilidad. Sin embargo la Ovinocultura se enfrenta a diversos problemas que han frenado la producción, entre ellos: la atomización de la tierra destinada a la producción agropecuaria, la atomización de los rebaños ovinos, la migración de la población rural hacia las ciudades lo que implica el abandono de las actividades agropecuarias, y la falta de atención sanitaria que también afecta en gran medida la productividad de los ovinos. (SIAP-SAGARPA, 2015)

La Linfadenitis Caseosa (LCA) es una enfermedad infectocontagiosa de presencia mundial, que afecta a ovinos y caprinos, caracterizada por la formación de abscesos en nódulos linfoides superficiales, pudiendo atacar órganos y nódulos linfáticos. Es una enfermedad crónica y debilitante, causada por *C.pseudotuberculosis*, responsable de grandes pérdidas económicas en la ovinocultura y caprinocultura (Dorella *et al.*, 2006, Baird y Fontaine., 2007). Esta ampliamente extendida y se ha reportado en muchos países incluyendo Australia, Brasil, Canadá, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Estados Unidos de América, entre otros (Araújo *et al.*, 2016; Muge *et al.*, 2016).

La LCA afecta tanto a pequeños rumiantes como a bovinos, equinos, llamas y camellos, y se han comunicado casos de infecciones en humanos que tienen contacto con animales infectados (Peel *et al.*, 1997).

Debido a su curso crónico y poca respuesta al tratamiento la infección es difícil erradicar una vez que se establece en una unidad de producción. Por ello, las estrategias para establecer los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad deben ser integrales. LCA es una enfermedad zoonótica que puede presentarse de manera inaparente o con características subclínicas, cuya transmisión es mayormente a través de lesiones cutáneas o piel intacta sobretodo en personal involucrado en la actividad de producción y transformación de carne ovina (Esteveao *et al.*, 2009).

C. pseudotuberculosis es una bacteria Gram positiva, pleomórfica, no capsulada, sin motilidad, que se multiplica dentro de los macrófagos (Santana-Jorge *et al.*, 2016). Se le ha llamado el “parasito perfecto” debido a su habilidad de evadir el sistema inmune con aparente facilidad una vez establecido dentro del hospedador, posee un repertorio de genes para sobrevivir por largos periodos de tiempo fuera del mismo y permanecer en el medio ambiente (Baird y Fontaine, 2007; Muge *et al.*, 2016).

La patogenia está asociada a la acción de una fosfolipasa D con afinidad por células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos, y a la presencia de lípidos de la pared celular que causan necrosis hemorrágica al inyectarlos intradérmicamente en animales de experimentación (Esteveo *et al.*, 2009).

Algunos de los aspectos limitantes para el control de LCA es que no existen pruebas de diagnóstico suficientemente sensibles y específicas para establecer el diagnóstico en la fase precoz y fase clínica visceral; además, las vacunas y bacterinas no han arrojado resultados satisfactorios en modelos animales ya que sus resultados son muy variables. La protección ofrecida por las vacunas comerciales Glanvac 6 (la más utilizada actualmente en el mundo) varía entre 25 y 90 % (Windsor, 2011).

Para que el sector ovino se expanda es necesario que los rebaños presenten una salud óptima y que sean controladas o erradicadas las enfermedades que limitan el comercio nacional e internacional (Solonet *et al.*, 2011).

Por tal motivo; el objetivo del presente estudio fue evaluar la inmunización producida por una bacterina elaborada a partir de asilados de campo, con la que se realizó un desafío controlado en modelo ovino, a través de estudios bacteriológicos, histopatológicos, serológicos y a la revisión clínica externa de los animales expuestos. Con la finalidad de tener una alternativa para la prevención y control de la LCA.

II. ANTECEDENTES

1.- Situación de la Ovinocultura

1.1 Mundial

La actividad está distribuida por todo el mundo, los principales productores de carne ovina son: China (dos millones de ton., 25% de la producción mundial), Australia y Nueva Zelanda (Fig 1.) con 500.000 ton. cada uno, siguen siendo los exportadores de carne de ovino más grandes del mundo. Se prevé que la producción de carne de ovino, con una participación actual del 5% en el mercado mundial, crezca 1.3% anual, llegando a 16 Mt en 2022. (OCDE/FAO, 2013)

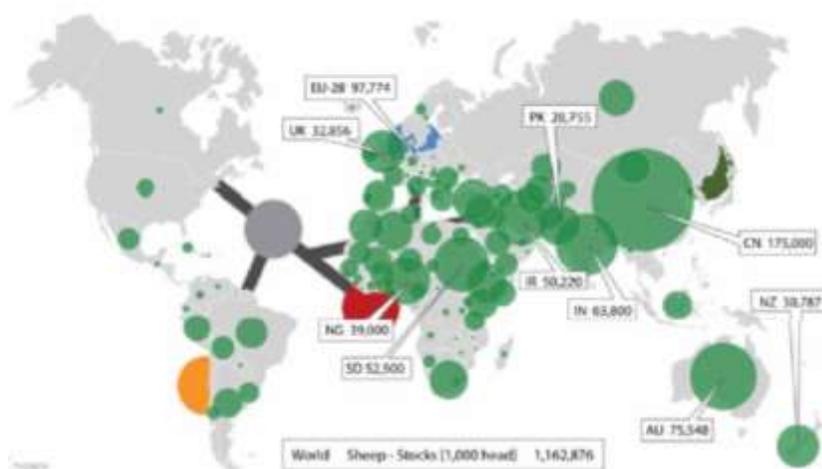


Fig 1. Inventario ovino 2013 (1.000 cabezas)

(FAO.2015)

El flujo de ovinos (carne o animales vivos) se mueve de Oceanía hacia los mercados de Europa, Norteamérica, Medio oriente y China (Fig 2.), lo que provoca también el incremento de riesgos sanitarios hacia los países importadores.

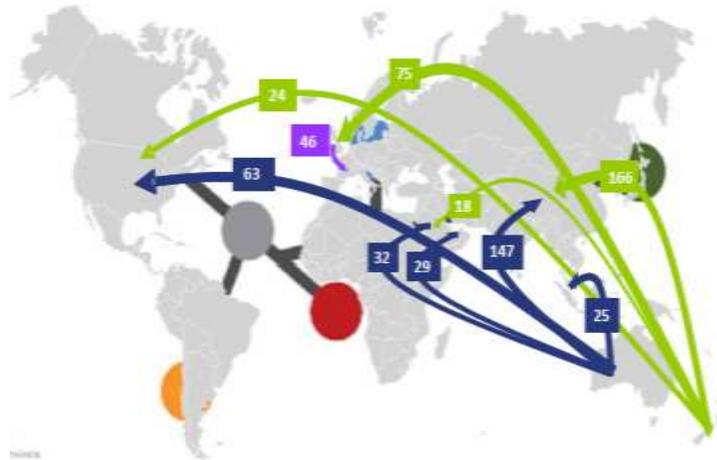


Fig 2. Flujo de carne de ovino 2014 (miles de ton)

(FAO. 2015)

1.2 Nacional

La población nacional en 2015 fue estimada en 8.8 millones de cabezas de los que el 35% se encuentre en cuatro estados (Fig.3). Sin embargo la producción de ovinos se encuentra distribuida a lo largo de todo el país, bajo diversos tipos de explotación y estratos sociales (SIAP-SAGARPA, 2015).

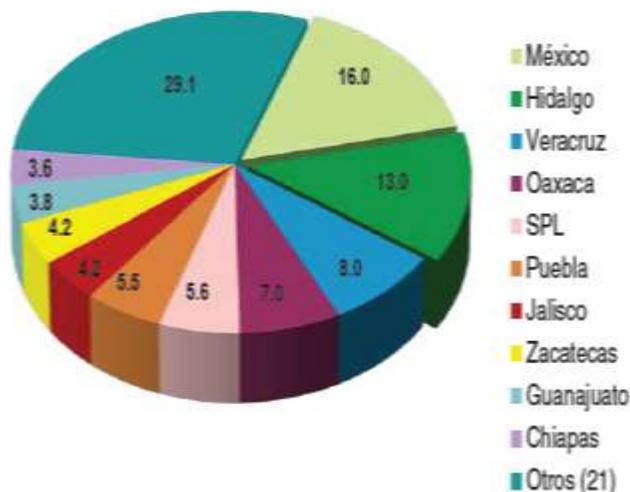


Fig 3. Población ovina nacional 2015

(SIAP-SAGARPA, 2015)

El origen de las importaciones de carne ovina en 2012 fue de cuatro países: Nueva Zelanda 67.5 %, USA 15.4 %, Australia 13.2%, Chile 4.0 %; (Fig 4) cabe resaltar que dichos países, debido a su inventario y tipo de explotación ovina, tienen problemas sanitarios con sus rebaños, incluyendo la alta prevalencia de LCA (SAGARPA 2012). Entre 2002 a 2012 se importaron 700,000 ovejas provenientes de Australia, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Canadá, empleadas principalmente para repoblación ovina en los estados del centro del país; el último embarque fue de 45,000 ovejas procedentes de Nueva Zelanda en 2015 (UNO,2015).

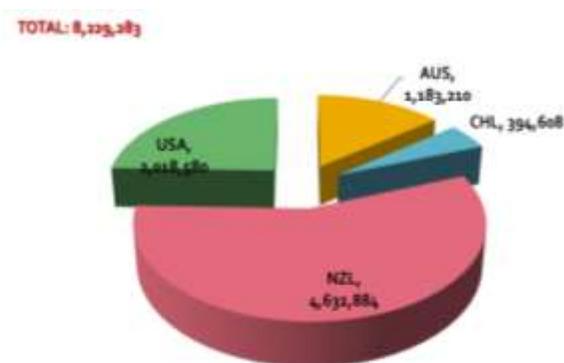


Fig 4. Importaciones de carne ovina 2012

(SIAP-SAGARPA, 2013)

1.3 Estatal

El Estado de México es la entidad con el mayor número de población ovina con un total de 1, 300, 000 cabezas registradas lo que representa el 14.7% del total nacional y es la entidad con mayor producción de carne ovina en el país con 8,527 toneladas en 2012 (SIAP-SAGARPA, 2013).

La Ovinocultura es una actividad en aumento constante a nivel mundial, nacional y estatal, dado las características productivas de las ovejas (que las hacen aptas y eficientes en su producción en el territorio nacional), a la demanda y al precio de la carne ovina. Existen factores que determinaran la producción ovina tales como el cambio climático (actualmente la producción bovina tiene problemas con la

emisión de CO₂), la demanda de carne por parte de los países de economía emergente (principalmente China) y los retos sanitarios que a nivel global restringen la movilidad de la producción hacia unas u otras regiones en el mundo y limitan la eficiencia productiva de los rebaños (FAO, 2013).

2.- CARACTERISTICAS DEL AGENTE

Corynebacterium pseudotuberculosis:

La palabra "Corynebacterium" es de origen griego y hace referencia a la morfología y agrupación de la bacteria (Korine: garrote o mazo y Bacterion: bastoncillo), y "pseudotuberculosis" es derivado de "pseudo", que literalmente significa falso, y de "tuberculosis", por la semejanza de la lesión con el nódulo que se forma en la tuberculosis (Estevao *et al.*, 2006).

En 1888, el bacteriólogo French Edward Nocard aisló un organismo inusual de un caso de linfangitis en una vaca, 3 años después el bacteriólogo Hugo Von Preisz identificó una bacteria similar en un cultivo de abscesos renales en una oveja. Como consecuencia de estos descubrimientos relacionados, el organismo en cuestión se nombró como bacilo "Preisz-Nocard", un nombre vulgar con el que ha estado vinculado desde entonces (Baird y Fontaine., 2007).

En 1918 Ebersson sugirió clasificarlo renombrándolo como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Con la edición del *Manual Bergey* muchas de las discrepancias fueron solucionadas denominándose en 1923 como *Corynebacterium ovis*. Con la salida de la 6ta edición del *Manual Bergey* en 1948, el nombre oficial cambió a *Corynebacterium pseudotuberculosis* que en la actualidad resulta el término correcto para su denominación (Brown y Olander., 1987; Baird y Fontaine., 2007).

La clasificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* se estableció inicialmente mediante morfología y características bioquímicas (Jones y Collins., 1986). La producción de nitrato reductasa fue utilizado para distinguir la *biovar equi* (aislado de caballos y bovinos; con reducción de nitrato positiva) de la *biovar*

ovis (aislado de ovejas y cabras; con reducción de nitrato negativa). Más tarde, se llegó a la misma conclusión con endonucleasa de restricción (EcoRV y PstI) analizando el ADN cromosómico, y basados en los datos de reducción de nitrato (Songer, *et al.*, 1988).

CLASIFICACIÓN TAXÓNOMICA:

Dominio *Bacteria*

Filum *Actinobacteria*,

Clase *Actinobacteria*,

Orden *Actinomycetales*

Suborden *Corynebacterineae*,

Familia *Corynebacteriaceae*,

Genero *Corynebacterium*,

Especie *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Biovar “*Ovis*”

C. pseudotuberculosis es el agente causal de la LCA del ovino, enfermedad crónica insidiosa, cosmopolita que causa pérdidas económicas productivas cuantiosas. La bacteria produce abscesos pectorales en equinos y granulomas cutáneos ulcerativos en bovinos (Dorella *et al.*, 2006, Baird y Fontaine., 2007).

Los microorganismos del genero *C. pseudotuberculosis* tienen paredes celulares quimio tipo IV con ácido meso-diapominopimédico (meso-DAP), arabinos y galactosa, ácidos micólicos de aproximadamente 22 a 26 átomos de carbono de longitud (ácidos corynomicólicos), ácidos grasos de cadena recta saturados y no saturados, menaquinomas dihidrogenadas, con 8 o 9 unidades de isopropeno y un contenido G+C de aproximadamente 51 a 68 mol %. Estudios filogenéticos indican que el género se halla íntimamente relacionado con los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, conformando el grupo CNMR (Estevao., 2006).

Los antibióticos en general son efectivos *in vitro*, a excepción de la estreptomina, sin embargo *in vivo* sus efectos son relativos, debido a la capacidad de estos de poder llegar a los focos de infección (nódulos linfoides o abscesos) generalmente protegidos por capas fibrosas entrelazados con tejido necrótico y purulento). Este microorganismo afecta además a los équidos provocándoles una linfangitis y abscesos, a los cérvidos, a camélidos y ocasionalmente al hombre (Pinochet., 1992).

Las colonias de *C. pseudotuberculosis* son pequeñas, blancas, secas y rodeadas una reducida zona de hemólisis. Pocas colonias llegan a ser de tamaño mediano a grande y mucosas. La tinción de Gram realizada a colonias puras muestra bacilos pleomórficos Gram positivos ordenados en forma de “letras chinas”. El microorganismo no tiene motilidad, es catalasa positivo, al test de oxidación fermentación demuestra ser anaerobio facultativo (Zeru y Kahsay., 2014).

Fundado en la capacidad de reducción de nitratos, *C. pseudotuberculosis* ha sido clasificada en dos biovars, *ovis* y *equi*. Cepas aisladas de ovinos y caprinos, que usualmente son nitrato reductasa negativo han sido clasificadas como biovar *ovis*; mientras que cepas aisladas de equinos y bovinos que usualmente son nitrato reductasa positivas han sido clasificadas como biovar *equi* (Oliveira *et al.*, 2016). La evidencia fenotípica (test de nitratos) así como la genotípica (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based ERIC PCR and Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis*) muestran la diferencia entre los dos biovars (Dorneles *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016).

El agente es destruido rápidamente por los rayos del sol y a temperaturas de 58°C por 10 minutos así también con los desinfectantes de uso habitual. *C. pseudotuberculosis* puede sobrevivir hasta 8 meses en el suelo y en fómites de corrales como superficies de madera, paja y heno por 1, 3 y 8 semanas respectivamente en condiciones húmedas y frías (Tadich *et al.*, 2005). La pared de la célula bacteriana tiene un alto contenido en lípidos, lo que impide la digestión por parte de enzimas celulares y tiene un efecto necrotizante (factor piógeno), su

alto contenido en lípidos le permite una prolongada supervivencia en el ambiente, como se muestra en el cuadro 1

Cuadro 1: Tiempo de supervivencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en exudado (Wenger, 2002).

OBJETO	A 25°C	A 10°C
AGUA	30 HRS	48 HRS
MADERA	7 DIAS	7 DIAS
PAJA	23 DIAS	24 DIAS
CERCAS	28 DIAS	55 DIAS
SUELO	4-8 MESES	6-8 MESES

3.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA LINFADENITIS CASEOSA (LCA)

Es una enfermedad de distribución mundial, acelerando el proceso de distribución a la par del movimiento de animales de repoblación y/o consumo a nivel mundial desde países contaminados hacia lugares libres de la enfermedad.

En Brasil, (Langenegger *et al.*, 1991) plantearon que esta enfermedad está ampliamente diseminada en rebaños del noreste del país. Ellos citan además a seis autores que registran una prevalencia de hasta el 30% de animales con nódulos linfáticos abscedados, también se refieren rebaños con 10 y 28% de reactores asintomáticos. Estos autores en un trabajo efectuado en la región de Río de Janeiro encontraron que el 77 % de los rebaños caprinos estaban infectados por *C. pseudotuberculosis*, con porcentajes de afectación que varían desde el 3.5 % al 100 % del total del rebaño (Ruiz *et al.*, 2007).

En Argentina, González *et al.* (1991) encontraron en la región del Tandil una prevalencia de 7.48 % de lesiones de la enfermedad aislando *C. pseudotuberculosis* de 10 animales tomados al azar.

En Chile la enfermedad se ha reportado por varios investigadores, encontraron una prevalencia de LCA en animales adultos de un 11.6% al examinar lesiones en canales de 1397 ovinos en Planta Faenadora de Carnes (Tadich *et al.*, 2005).

En Paraguay de un total de 147 caprinos mayores de edad se registró una prevalencia de 4.1 % (Szwako *et al.*, 2012).

En Venezuela se reporta un 63.3 % de animales infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis* de un total de 71 animales con lesiones, en la península de Paraguaná (Delgado *et al.*, 2015).

En Europa en Francia la enfermedad se incluye como síndrome de la enfermedad de los abscesos, asociada a infecciones por *Staphylococcus aureus*, reportando una prevalencia de un 54 % (Pepin *et al.*, 1988). En el Reino Unido se ha realizado la caracterización de la bacteria con técnicas de electroforesis (Ruiz., 2007).

En Asia Yeruham *et al.* demostraron la presencia de *C.pseudotuberculosis* en los rebaños ovinos como causa de la mastitis así como el importante papel que juega en esta especie, y han descrito la enfermedad con 3 formas clínicas; la mastitis, la forma visceral y la forma cutánea (Ruiz., 2007).

En Australia se reportó una prevalencia del 54 %; y en Tasmania encontraron lesiones de la enfermedad en el 26 % de los animales que investigaron (Middleton *et al.*, 1991). En Australia Occidental, la prevalencia promedio de LCA en la población de ovejas adultas ha ido disminuyendo y se encontró que fue de 58% en 1973 a 53% en 1984, después de la introducción de una vacuna contra LCA en 1983 (Windsor., 2011).

En América del Norte se reportan aislamientos de varias zonas dentro de los Estados Unidos como Arizona, Texas, Washington, Wyoming, Iowa, con una prevalencia del 42.4% en regiones del Oeste y en Canadá se reporta de regiones como Ontario y Alberta (Pépin *et al.*, 1988).

En México en un estudio en el municipio de Xalatlaco, Ochoa *et al* hallaron que el 5.4 % de los exudados nasales que analizaron en ovejas trashumantes presentaron *Corynebacterium spp.* y en otro, Barrientos *et al.* aislaron *Corynebacterium spp* en el 65% de los casos que estudiaron con lesiones en los nódulos linfáticos (Ruiz., 2008). También se ha reportado una prevalencia del 1.75

% en el municipio de Mapimí y 4.69 % en el municipio de Tlahualillo de cabras con LCA en el estado de Durango (Carrillo *et al.*, 2005). En 2015 se encontró una frecuencia de 33% en aislados de campo (69 en 209 muestras) de rebaños provenientes del estado de Jalisco, identificados por bacteriología y pruebas bioquímicas (Hernández., 2015)

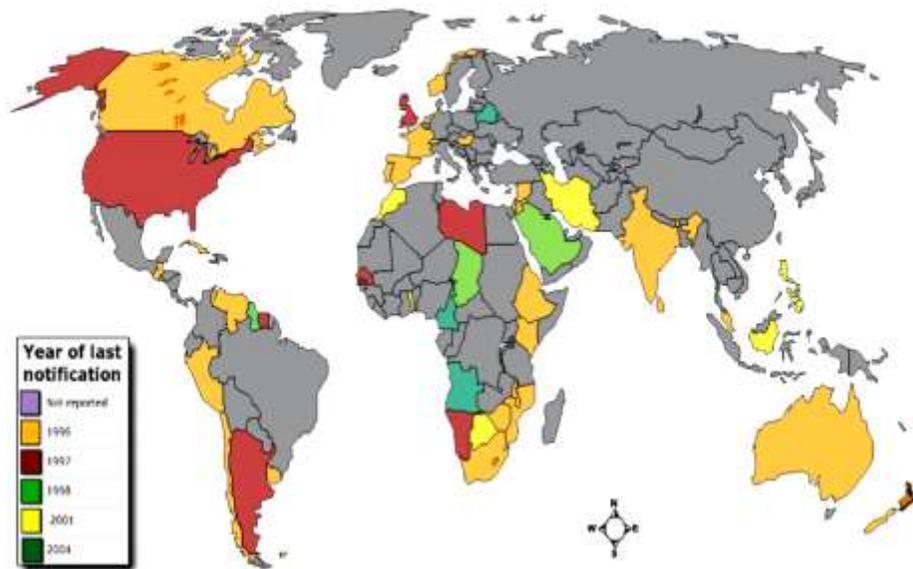


Fig 5. Mapa con los países que informaron de su situación sanitaria con LCA en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 1996-2004 (Tomado de Guimaraes., 2011).

4.- MANIFESTACIONES CLINICAS Y PATOGENIA

En pequeños rumiantes se describen cuadros clínicos bien diferenciados (Fig 6.); el más frecuente es la LCA, caracterizado por la supuración y necrosis progresiva de linfonodos subcutáneos, con la formación de abscesos que posteriormente se caseifican. Existe también una forma visceral con desarrollo de abscesos en órganos vitales como pulmones, hígado y riñones (Ríos 2010); y formas de baja frecuencia de presentación como poliartritis en corderos, toxemia neonatal,

endometritis, y mastitis (más frecuente en las cabras), epididimitis y orquitis (Ruiz *et al.*, 2007).

No se han descrito cepas avirulentas de *C. pseudotuberculosis* (Dorella *et al.*, 2006).

Las lesiones externas aparecen inicialmente como abscesos y más tarde pueden evolucionar a piogranulomas variando en tamaño desde unos milímetros hasta centímetros. Estas lesiones externas son frecuentemente localizadas en nódulos linfáticos superficiales, aunque infrecuentemente se pueden hallar en tejido subcutáneo. Las lesiones viscerales no son detectadas clínicamente pero se expresarán dependiendo su número, sitio y efecto sobre órgano involucrado. La pérdida de peso progresivo, desordenes respiratorios y timpanismo ruminal recurrente son los signos más relevantes que acompañan las lesiones viscerales por LCA (Santana-Jorge *et al.*, 2016).

El agente productor de LCA, ejerce su poder patogénico esencialmente por medio de dos factores: la pared celular y la exotoxina que produce (Pinochet., 1992).

La proteína PLD (fosfolipasa D), una exoproteína que es considerada también leucotóxica, que contribuye a la formación de lesiones y de la destrucción de macrófagos caprinos durante la infección, el operon *fagABC* y el gen *fagD*, ambos juegan un rol en la virulencia de la bacteria, así como la alta concentración de lípidos en la pared celular, los cuales hacen que el microorganismo resistan la digestión por enzimas celulares y persistan como parásitos intracelulares facultativos y la proteína CP40, identificada como una proteína inmunógena que exhibe actividad proteolítica (Pinto *et al.*, 2014).

La Fosfolipasa D actúa sobre la esfingomielina y la lisofosfatidilcolina; afecta la permeabilidad vascular lo que facilitaría la diseminación de la bacteria de los vasos sanguíneos a la vía linfática, activa la vía complementaria del sistema inmune, agotando el complemento de la zona que rodea las bacterias protegiéndolas de la opsonización a su vez inhibe la quimiotaxis de neutrófilos y provoca la degranulación de células fagocíticas ocasionando necrosis y trombosis

en vasos linfáticos favoreciendo la supervivencia del microorganismo (Valdivia., 2015).

Lo ácidos micólicos constituyen una cubierta lipídica, con características de cera, en la superficie de la pared celular. Está cubierta tiene propiedades citotóxicas bien descritas, que juegan un rol de importancia en la patogenia (Belchior *et al.*, 2006).

Además, el ácido micólico induce cambios degenerativos y muerte de leucocitos (Carne *et al.*, 1956). Sin embargo, y a diferencia del efecto letal de la inoculación de moléculas similares extraídas de las micobacterias, el efecto citotóxico del ácido micólico de *C. pseudotuberculosis* se limita al lugar de la inoculación (Valdivia., 2015).

En infecciones naturales, la capa de ácidos micólicos proporciona al organismo una protección mecánica y posiblemente bioquímica, contra las enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas. A su vez, esto permite a la bacteria resistir la fagocitosis y permanecer en el hospedador como un parásito intracelular facultativo (Williamson., 2001).

Esta capacidad es probable que sea esencial para la diseminación del organismo desde la entrada inicial. Además, la naturaleza tóxica del ácido micólico parece contribuir a la formación de abscesos. En infecciones experimentales en ratones, se demostró la relación directa entre la cantidad de lípidos de la pared celular de diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* con la capacidad para producir abscedación crónica (Valdivia., 2015).

Los pasos de la infección se han clasificado en las siguientes fases:

Fase inicial (1-4 días), caracterizado por el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de inoculación y el drenaje de los nódulos linfáticos;

Fase de amplificación (5-10 días), caracterizado por el desarrollo de piogranuloma,

Fase de estabilización, que se caracteriza por la maduración y la persistencia del piogranuloma (Lopes *et al.*, 2012).

C. pseudotuberculosis ingresa por abrasiones o heridas superficiales en la piel, donde son fagocitados por macrófagos que migran al sitio de infección; en la mayoría de los casos la infección es controlada en esta etapa. Si esto no ocurre, las bacterias se diseminan a los nódulos linfáticos subcutáneos o submucosos locales (Ruiz *et al.*, 2007).

C. pseudotuberculosis también ha sido aislado a partir de tráquea de ovejas con abscesos pulmonares, confirmando que, efectivamente, se produce la descarga de las lesiones pulmonares hacia las vías respiratorias altas pudiéndose crear aerosoles con material infeccioso. En condiciones de estrecho contacto y flujo de aire reducido, como en un cobertizo cubierto, el aerosol producido podría ser capaz de infectar a un gran número de animales en un corto período de tiempo (Valdivia., 2015).

La habilidad de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir dentro de este nicho intracelular está relacionada con la composición lipídica de su pared celular, esencialmente ácidos corynomicólicos, existiendo una correlación positiva entre el contenido de estos lípidos y la habilidad de producir lesiones en nódulos linfoides poplíteos de oveja. Los lípidos de la pared celular constituyen un factor piogénico, relacionado con la infiltración masiva con leucocitos polimorfonucleares, que transportan las bacterias a los nódulos linfáticos, y con el efecto citotóxico que destruye a los fagocitos (Alemán y Spier., 2001).

Cuando la bacteria está dentro de la célula la exotoxina fosfolipasa D produce la degeneración y destrucción de esta. Al mismo tiempo la bacteria invade otras células, principalmente macrófagos que es el medio por el cual se disemina en el organismo. Sus lípidos de pared celular le confieren resistencia a las enzimas hidrolíticas de las células fagocíticas, permitiendo su supervivencia y proliferación en el ambiente intracelular (Dorella *et al.*, 2006).

Las exotoxinas fosfolipasa D y esfingomielinasa hidrolizan, respectivamente, lisofosfatidilcolina y esfingomielina de las membranas de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos. La desestabilización de las membranas provoca la lisis celular, incrementando la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edemas y facilitando la colonización y diseminación regional y sistémica en el hospedero (Peel, *et al.*, 1997; Alemán y Spier., 2001).

Los anticuerpos frente a la toxina comienzan a detectarse a partir de la cuarta semana postinfección alcanzando un pico máximo en la decimoséptima semana y perdurando por lo menos veintisiete semanas (Estevao., 2006).

Como resultado del crecimiento bacteriano incontrolado dentro de los macrófagos, el hospedero intenta restringir y limitar la infección a través de la formación de piogranulomas, que se caracterizan por la encapsulación de las células infectadas con *C. pseudotuberculosis*. La formación de piogranulomas depende de la inmunidad adaptativa, que es un proceso complejo en el caso de la infección por *C. pseudotuberculosis*, que implica tanto la respuesta inmune humoral y celular (Paule, *et al.*, 2003).

Una vez desarrollado el absceso, parte de las bacterias de su interior entran a los capilares y forman colonias que ocluyen y trombosan los vasos produciendo isquemia localizada, que junto a las toxinas producidas por *C. pseudotuberculosis*, destruyen células de la parte sana del absceso, adicionándose una nueva capa a la masa necrótica. Si se produce la salida de bacterias del absceso, se produce la diseminación de *C. pseudotuberculosis* a través de los vasos linfáticos, penetrando en otros ganglios y eventualmente en vasos sanguíneos, pudiendo llegar a diferentes órganos donde se reproduce la formación de abscesos. A su vez, el tejido conectivo de los abscesos puede romperse liberándose líquido purulento (Valdivia., 2015).

Se ha observado mayor prevalencia en animales del grupo de edad de 1 a 2 años (47,36%), seguidos por los animales del grupo de edad de más de 2 años (18,69%) y por último de la edad Grupo menor de 1 año (3,07%) (Magdy *et al.*, 2009)

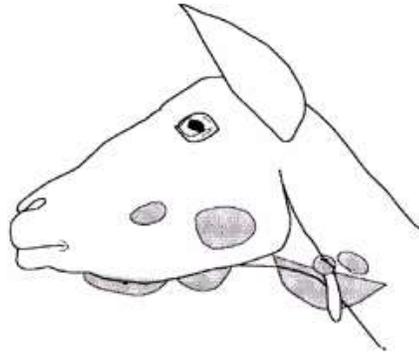


Fig. 7 Localización predominante de linfonodos afectados en Linfadenitis caseosa: submandibular, parotideo, retrofaringeo (Aguilera., 2007).

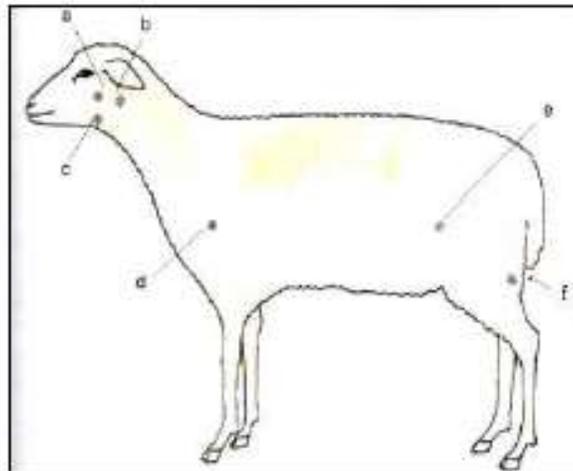


Fig. 8 Localización de linfonodos afectados en Linfadenitis caseosa. a) parotideo b) retrofaringeo c) submandibular d) preescapular e) sub-iliaco f) poplíteo (Dorella *et al.*, 2012)

5.- TRANSMISIÓN

La infección se inicia con el ingreso de la bacteria a través de lesiones generadas en el manejo de los ovinos, como la esquila y en menor medida cortes de cola, marcaje y castraciones (Cheuquepán., 2008). El potencial de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir durante varias semanas en el medio ambiente contribuye a su capacidad de propagarse dentro de un rebaño (Augustine *et al.*, 1986). Transmisión entre las ovejas o cabras se produce principalmente a través de la contaminación de heridas superficiales o abrasiones (Aleman y Spier., 2001) La tos de las ovejas y cabras infectadas por esta bacteria puede estar en contacto con cortes en la piel de otras ovejas, lo que constituye otro medio de transmisión (Williamson., 2001).

La presencia de la enfermedad está íntimamente ligada a las prácticas de manejo realizadas sin prevención higiénica. No hay factores de raza ni sexo que aumenten o limiten su presentación. La edad está ligada a la frecuencia mayor de situaciones de riesgo a que son sometidos los adultos (mayor número de esquila, marcas etc.). Es raro encontrar corderos afectados incluso en áreas altamente infectadas (Pinochet., 1992).

El agente se difunde al medio por descargas purulentas provenientes de abscesos abiertos sean cutáneos o pulmonares o de lesiones varias. Este persistirá en el terreno generalmente por tiempos prolongados, dependiendo ello de la carga de gérmenes eliminados, de la humedad ambiental, del terreno y de la temperatura. La infección de nuevos animales, estará también relacionada con el grado de infección del medio y con la concentración de animales en esa área (Pinochet, 1992). La pared de la célula bacteriana tiene un alto contenido en lípidos, lo que impide la digestión por parte de enzimas celulares, tiene un efecto necrotizante (factor piógeno) y su alto contenido en lípidos le permite sobrevivir hasta 20 semanas en el derrame de pus que se produce durante la esquila. Una vez en el medio también la supervivencia es alta tanto en superficies de madera, en la paja como en el heno: una, tres y ocho semanas, respectivamente (Villalonga, 2013).

6.- RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EL HOSPEDERO

La fosfolipasa D inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la degranulación de células fagocíticas, y activa el complemento por la vía alternativa, ocasionando necrosis y trombosis de vasos linfáticos y favorece la supervivencia y multiplicación del microorganismo (Aleman y Spier., 2001).

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 que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC) en su superficie, en las paredes del absceso y rodeando el parénquima pulmonar. Los linfocitos T fueron prominentes en las mismas áreas dentro de las lesiones de origen natural, con una proporción de 3.5:1 de células T CD4 y T CD8. Los linfocitos B y granulocitos comprendían una porción menor en los infiltrados celulares (Ellis., 1988).

Mediante métodos histoquímicos se ha descrito la unión entre fagosomas y lisosomas, pero el patógeno resiste el ataque enzimático permitiendo la permanencia en el interior celular como parásito intracelular facultativo (Valdivia, 2015). La resistencia a la infección por *C. pseudotuberculosis* es un proceso complejo que implica componentes tanto de la respuesta del hospedero no específica y específica, en el que tanto la respuesta inmune humoral y celular son activas (Batey., 1986; El-Enbaawy, *et al.*, 2005).

La importancia de los mecanismos humorales se ha demostrado mediante la evaluación de numerosos ensayos de vacunas comerciales y experimentales, que incluyen preparaciones a base de sobrenadante inactivado de cultivo celular o toxoides (Stanford., *et al.*, 1998; Eggleton., *et al.*, 1991), fracciones bacterianas de pared celular (Braga, *et al.*, 2007; Brogden, *et al.*, 1984), bacterias atenuados y muertas (Simmons, *et al.*, 1998), exotoxinas y sus subunidades (Hodgson, *et al.*, 1999) o patógenos modificados genéticamente (De Rose, *et al.*, 2002).

Se han hecho avances respecto a la inmunoprofilaxis, y el uso de estas preparaciones reduce el número y tamaño de los granulomas en los animales

expuestos. Sin embargo, para controlar adecuadamente la infección, debe mejorarse la activación de los macrófagos; de hecho, muchos investigadores se centran actualmente en respuesta por IFN- γ . Los estudios sugieren que la inmunidad mediada por células podría desempeñar un papel más importante que la inmunidad humoral en la resistencia a la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Irwin y Knight., 1975).

7.- DIAGNÓSTICO

7.1 CLÍNICO

El diagnóstico clínico epidemiológico y patológico proporciona una concepción presuntiva de la LCA pero no constituyen por si mismas un método asertivo que permita establecer la causa específica de esta enfermedad ni logra diferenciarla de otras que con ella se confunden. Se hace preciso en todos los casos el diagnóstico específico, microbiológico e inmunológico. Su diagnóstico generalmente se basa en la exploración por palpación minuciosa de los linfonodos superficiales, pero esto tiene poco valor en la detección de las lesiones tempranas y en los casos en los que la enfermedad presenta su forma visceral, detectándose casi siempre la enfermedad a nivel de rastro con la presencia de linfonodos voluminosos con exudado purulento y caseoso (Urquiza., 2006).

Para la realización de un diagnóstico de la enfermedad es importante realizar el examen externo general del animal afectado, en este caso también es importante considerar la anamnesis. La forma más sencilla de diagnosticar la presencia de LCA en un rebaño, es el examen postmortem, donde las lesiones típicas hacen innecesario recurrir a otros exámenes (Pinochet., 1992).

El diagnóstico presuntivo de la infección por *C. pseudotuberculosis* en vivo, se basa en la palpación de ganglios superficiales aumentados de tamaño, las características macroscópicas de los exudados, signos clínicos como fiebre o pérdida de peso, y datos epidemiológicos como la prevalencia local, la edad del ovino (Estevao *et al.*, 2006). El uso de radiografías y ultrasonido ayudan en la identificación de abscesos en órganos y nódulos linfáticos internos. La mayoría de

las veces los abscesos internos son identificados en el estudio post mortem o al sacrificio del animal (Zeru y Kahsay., 2014).

El diagnóstico de la infección se realiza principalmente con un examen clínico de las lesiones y la identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas (Cheuquepan *et al.*, 2008).

7.2 Histológico

El análisis histopatológico de las muestras, se observa en general un centro amorfo y eosinófilo de necrosis rodeado por una delgada capa de linfocitos, células plasmáticas, algunas células epiteloides y neutrófilos, bordeado por una red de fibroblastos (León, *et al.*,2002).

En nódulos linfáticos microscópicamente se ha registrado la presencia de granuloma caseosos con necrosis y centro eosinofílico, edema e hiperplasia de folículos linfoides rodeados de tejido fibroso formando un laminado concéntrico (Leoncio *et al.*, 2016)

7.3 Bacteriológico

El diagnóstico se establece a través del cultivo del microorganismo a partir de abscesos obtenidos por necropsia o procedimientos quirúrgicos (Aleman y Spier 2001; León *et al.*, 2002). El análisis bacteriológico incluye microscopía y cultivo de las muestras. Las coloraciones microscópicas incluyen Gram y Ziehl Neelsen para realizar el diagnóstico diferencial con infecciones producidas por bacilos ácido alcohol resistentes. En el Gram, se pueden reconocer formas cocobacilares positivas en masa. La cepa desarrolla en agar sangre en 48 horas predominando el desarrollo de colonias pequeñas, blancas, secas y rodeadas de una β hemólisis tenue, correspondientes a bacilos cortos positivos, algunos agrupados en empalizada (Chirino *et al.*, 2005). El ensayo de hemólisis sinérgica frente a *Rhodococcus equi* e inhibición de la β hemolisina del *Staphylococcus aureus*,

ambas pruebas positivas, ponen en evidencia la producción de exotoxinas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Songer *et al.*, 1988).

Se han evaluado sistemas comerciales para la identificación de corynebacterias como el sistema API CORYNE identification system (Biomerieux, France); estos sistemas incluyen test enzimáticos y de fermentación de azúcares. Los métodos rápidos ayudan en la identificación pero no superan la precisión de los métodos microbiológicos convencionales, debido a que requieren de pruebas adicionales para arribar a la identificación final (Hommez, *et al.*, 1999;). El sistema API CORYNE posibilita la prueba de reducción de nitratos a nitritos para diferenciar los biotipos de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* y *equi* (Leardini *et al.*, 2002; Vay y Almuzara., 2002).

7.4 Serológico

En la mayoría de los casos clínicos el diagnóstico directo es inviable, salvo que se proceda a la necropsia del animal. Por lo que el diagnóstico serológico es de alta importancia en animales infectados subclínicamente, ya que presentan una fuente potencial de infección para cabras u ovejas sanas (Urquiza., 2006).

Se han descrito diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de la LCA pero estas tienen el inconveniente de una baja eficiencia diagnóstica y de ser incapaces de discriminar entre animales previamente expuestos de aquellos que mantienen el estado de portador (Pacheco *et al.*, 2007).

7.4.1 Prueba de ELISA

En los procedimientos de ELISA se emplean diferentes soportes antigénicos como antígenos bacterianos de pared celular, exotoxina y exotoxina recombinante, utilizándose para detectar infecciones en ovinos (Kaba *et al.*, 2001).

Un ELISA sándwich usada para detectar anticuerpos frente a los antígenos de la pared celular o de la toxina de *C. pseudotuberculosis*, con una especificidad de 98

$\pm 1\%$ en cabras y $99 \pm 1\%$ en ovejas y una sensibilidad del $94 \pm 3\%$ en cabras y $79 \pm 5\%$ en ovejas, a resultado de enorme utilidad en los programas de control y erradicación de la LCA (Cubero *et al.*, 2002).

En una prueba para detectar una respuesta hacia interferón gamma (IFN- γ) en animales infectados experimentalmente con *Corynebacterium pseudotuberculosis* utilizando sangre completa, usando una prueba comercial de ELISA para IFN- γ bovino, se encontró una confiabilidad del 95.7% la cual parece ser una prueba prometedora para el diagnóstico de linfadenitis caseosa (Urquiza., 2006).

En un estudio experimental para desarrollar una prueba de ELISA indirecto para detección de anticuerpos en modelo ovino, la prueba fue confirmada con un 98 % de sensibilidad y un 100% de especificidad (Solonet *et al.*, 2011).

La prueba de ELISA tiene un campo muy amplio en la investigación, el diagnóstico y en la terapéutica médica. Por lo que en la actualidad esta técnica es la más utilizada y la más confiable de todas las pruebas inmunológicas anteriormente referidas para el diagnóstico de LCA. Comercialmente hay disponibles métodos de ELISA, que pueden determinar infecciones subclínicas entre 30 a 60 días postinfección. Los mismos mostraron una especificidad y sensibilidad del 85%. En general, como desventaja, los métodos serológicos pueden presentar resultados falsos positivos debido a similitudes antigénicas entre diferentes especies de corinebacterias y en animales vacunados contra la enfermedad (Aleman and Spier., 2001; Çetinkaya *et al.*, 2002).

7.4.2 Otras técnicas serológicas

Se ha usado la prueba de microaglutinación para la detección de anticuerpos en animales infectados naturalmente (Menzies y Muckle., 1989). La sensibilidad de esta prueba mostró ser relativamente satisfactoria; sin embargo, la especificidad tuvo una baja respuesta (Cubero, *et al.*, 2002).

La técnica de inmunodifusión doble, probó ser un método económico y práctico para utilizarlo en sueros de animales infectados y cuyos resultados se obtienen dentro de las 24 hrs. posteriores a la realización de la prueba (Burrel., 1980).

La prueba de IHS (Inhibición de la Hemólisis Sinérgica) mide la respuesta de IgG a la exotoxina en el suero del paciente; la prueba detecta la dilución mayor que puede prevenir la hemólisis de *Rodococcus equi* cuando se utilizan glóbulos rojos sensibilizados con exotoxina de *R equi* (Aleman y Spier., 2001; Ruiz, *et al.*, 1995). La reacción es interpretada a las 24 horas. Títulos de anticuerpos en suero equivalentes a 1:128 indican exposición y títulos 1:512 o mayores indican presencia de infección. El test IHS, ha sido utilizado en ovinos y caprinos para monitorear la prevalencia y exposición de animales y detectar infecciones subclínicas. El test tiene una sensibilidad del 98% para cabras y 96% para ovinos (Aleman y Spier., 2001; Brown y Olander., 1987). Esta prueba es detectable hasta los 15 a 17 días de la infección (Cubero *et al.*, 2002).

7.5 DIAGNOSTICO MOLECULAR

Las técnicas de biología molecular como la secuenciación del 16S rDNA y la técnica de la PCR han perfeccionado el diagnóstico de la enfermedad, al ser técnicas muy sensibles y específicas, pero más caras que las anteriormente descritas, si bien la diferenciación entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* puede ofrecer reacciones cruzadas, al ser dos especies genéticamente muy relacionadas, por lo que hay que recurrir a PCR múltiple en la correcta diferenciación entre estas dos especies del Género *Corynebacterium* (Valdivia., 2015).

Existen estudios que han reportado la utilidad del PCR para el diagnóstico rápido de *C. pseudotuberculosis* en estudios obtenidos directamente desde muestras de abscesos. Entre las secuencias utilizadas se encuentra la subunidad 16S del RNA ribosomal para el diagnóstico de la bacteria en caprinos y ovinos (Cetinkaya *et al.*, 2002) pero tiene el inconveniente de ser incapaz de discriminar entre *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Corynebacterium ulcerans* ya que el 16S

DNA es un gen altamente conservado entre especies de un género (Khamis *et al.*, 2005).

Pacheco *et al* (2007) reportaron el uso de un ensayo de PCR múltiple para la detección de *C. pseudotuberculosis* desde cultivos puros y desde muestras clínicas. Como blancos de amplificación incluyeron las secuencias *16S rDNA*, *pld* y *rpoB* que codifica la exotoxina PLD, una esfingomielinasa implicada en la virulencia de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* obteniendo un método de alta sensibilidad, reproductibilidad y eficacia en el diagnóstico de la bacteria.

Se reporta una técnica de PCR denominada PCR en tiempo real, aplicando sondas TaqMan, la cual logra una mejor estandarización, cuantificación, automatización y miniaturización, logrando una reducción de tiempo y costo en el diagnóstico, tiene las ventajas de requerir cantidades muy pequeñas de ADN, no requiere soporte (como los genes de agarosa) minimizando los riesgos de manipular sustancias cancerígenas, se obtiene el resultado de forma directa desde el tubo con lo que se evitan riesgos de contaminación de laboratorio y/o de las muestras con productos postamplificación que era uno de los problemas de falsos positivos que podían obtenerse en el PCR convencional (Llambí *et al.*, 2006).

7.6 Diagnóstico Diferencial

La LCA por *C. pseudotuberculosis* debe diferenciarse de otras patologías que se manifiestan con absceso de características similares como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Actinomyces*, *Mycobacterium tuberculosis* y paratuberculosis, traumatismo, cuerpos extraños, reacciones de sensibilidad a inyectables y tumores (Aleman y Spier., 2001; León, *et al.*, 2002).

Se han encontrado una serie de agentes infecciosos asociados con *C. pseudotuberculosis* destacando la presencia de *Staphylococcus* y bacterias Gram negativas no identificadas (Abreu *et al.*, 2008)

8.- TRATAMIENTO

El *C. Pseudotuberculosis* es sensible a diversos antibióticos *in Vitro*. Sin embargo, el tratamiento en campo tiene un valor limitado debido a que el microorganismo está protegido por su localización intracelular y por la cápsula de los abscesos. Se debe realizar el tratamiento de los abscesos maduros para evitar que se disemine la bacteria. El procedimiento de tratamiento de los abscesos es el siguiente:

- Aislar al animal infectado.
- Drenar los abscesos (usar guantes) asegurándose de coleccionar todo el material infeccioso y quemarlo.
- Aplicar yodo al 7% en los abscesos.
- Mantener a los animales aislados, drenar y desinfectar con yodo cada dos o tres días hasta que el absceso cicatrice.
- No se debe dejar que un absceso madure y drene por sí solo.

(Wenger., 2002)

9.- IMPORTANCIA ECONOMICA

La LAC visceral ha sido considerada una de las mayores causas de daño económico en el “síndrome de la oveja delgada” en USA (Brown y Olander., 1987). No causa pérdidas por mortandad pero sí pérdidas económicas por disminución en la productividad de carne y lana. Es también una causa importante de confiscación de canales para consumo humano y depreciación de pieles (Martin., 2002).

El tipo visceral de la enfermedad, causa enflaquecimiento y pérdida del estado general, que es progresivo y se traduce en la disminución de la producción de lana, carne y leche. En las hembras provoca desórdenes reproductivos con un menor porcentaje de preñez en el rebaño y en los machos rechazo de carneros en la revisión previa al servicio (Williamson, 2001). Aumenta la posibilidad de padecer otro tipo de enfermedades debido a la inmunodepresión local principalmente a

nivel pulmonar y de nódulos linfoides mediastínicos lesionados (Brown y Olander 1987). El daño a la ganadería ovina es importante al producir pérdidas de rendimiento en el rebaño con menor peso de vellón, menor ganancia de peso y decomiso de las vísceras afectadas (Villalonga., 2013).

En Chile el Servicio Agrícola y Ganadero en su Boletín de Vigilancia Epidemiológica en 1996 indico que los decomisos por linfadenitis caseosa fueron del 1% registrándose decomisos solo en la región de Magallanes, y en 1997 la LCA fue el 14.3% del total de decomisos (Tadich *et al.*, 2005).

Es considerada una de las enfermedades más importantes, desde el punto de vista económico, que afecta ovejas y cabras en países como USA, Canadá y Australia (Burrell, 1980; Patón *et al.*, 1994; Stanford *et al.*, 1998), habiéndose comunicado para Australia una pérdida en la producción de lana de 17 millones de dólares (Patón *et al.*, 1994).

En 1977 se plantea que la LCA produjo pérdidas de 2 millones de dólares en la industria ovina de Australia del Oeste. Las pérdidas económicas son variadas pero mal evaluadas por el hecho que no provoca alta mortalidad ni síntomas clínicos aparatosos (Ruiz *et al.*, 2008).

En España en ovejas de desvieje con ausencia de signos clínicos, observando tan sólo adelgazamiento en alguna ocasión, es un hallazgo de matadero bastante frecuente. Algunos estudios cifran en 11,02% el número de ovinos afectados en la inspección *post mortem* en matadero, siendo el pulmón el órgano más afectado (Villalonga., 2013).

10.- ZOONOSIS

El primer informe de Linfadenitis humana a causa de *C. pseudotuberculosis* data del año 1966 en un hombre de origen panameño de 37 años, cazador y jardinero (Esteveao., 2009).

Los casos clínicos se atribuyen principalmente a personas inmunodeprimidas expuestas al agente, que se considera patógeno oportunista. La infección en

humano tiende a ser crónica, observándose generalmente una linfadenitis granulomatosa supurativa, que afecta linfonodos axilares, inguinales o cervicales. También se describen cuadros atípicos con reportes de neumonía eosinofílica e infección ocular (Ríos., 2010). Actualmente la infección por *C. pseudotuberculosis* ha sido reconocida como una enfermedad zoonótica emergente. En general, las infecciones en humanos son raras y usualmente se presentan como LAC adquirida por exposición ocupacional (Estevao *et al.*, 2006).

La prevalencia de la enfermedad humana causada por *C. pseudotuberculosis* es probablemente subestimada, ya que sólo 33 casos han sido reportados durante un período desde 1966 a 2003 (Romanenko *et al.*, 2003). Los casos de Linfadenitis Humana ocurren en forma esporádica en zonas rurales, la transmisión es mayormente a través de lesiones cutáneas o piel intacta ya sea por contacto directo con ovejas y cabras y/o con carne contaminada. El tratamiento basado exclusivamente en antibióticos se mostró insuficiente, en todos los casos el desbridamiento y/o drenaje quirúrgico fue esencial para el control de la infección (Estevao *et al.*, 2009).

11.- CONTROL

No existe un método adecuado para controlar y manejar adecuadamente la enfermedad en los rebaños de cabras u ovejas. Si una oveja o cabra contrae LCA se debe eliminar ese animal del rebaño. Una vez que se ha instaurado LCA en un rebaño, el control es laborioso y difícil. Las medidas necesarias para la prevención y control de la enfermedad son:

- Identificación precoz y aislamiento de los animales afectados.
- Cambiar el manejo y mejorar la higiene de instalaciones.
- Controlar los insectos.
- Rotación periódica de las zonas de pastoreo.

- Separar a las crías de sus madres después del parto y alimentarlas con calostro y leche de vaca.
- Manejar a las crías en un rebaño independiente con la finalidad de disponer de animales de reposición seronegativos.

También se debe de desinfectar las instalaciones y todos los instrumentos para corte de cola, marcar orejas, esquilar, etc. (Cubero, 2002).

12.- BIOLÓGICOS USADOS PARA EL CONTROL DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Existen diversos tipos de vacunas utilizadas para la inmunización contra Linfadenitis Caseosa, reportándose diferentes resultados (Cuadro 1) en cada uno de los biológicos elaborados. Las campañas de vacunación implementadas en países, como Australia, incluyen en ovinos una primera vacunación del animal a los 8 y a las 12 semanas de vida y la administración anual de una dosis. En cabras se recomienda para mantener una inmunidad efectiva repetir la administración cada 6 meses (Estevao *et al.*, 2006).

12.1 VACUNAS EXPERIMENTALES.

12.1.1 Vacunas muertas o inactivadas

Un estudio de investigación de la inmunización de ovejas con un aislado virulento de *C. pseudotuberculosis* inactivado por formaldehído y con adyuvante de hidróxido de aluminio dio lugar a una protección estadísticamente significativa contra el desafío de cepa homologa, con la prevención de la propagación de la infección más allá del sitio de inoculación (Windsor., 2011).

C. pseudotuberculosis inactivada puede imitar la infección primaria, la promoción de inmunoprotección sin causar enfermedad. Algunos estudios han utilizado una combinación de bacterinas y toxoides. Un producto compuesto de bacterina inactivada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y una bacterina inactivada más PLD inactivado por formaldehído fue probado en ensayos de campo, y los

resultados serológicos demostró la presencia de anticuerpos contra PLD, así como contra antígenos celulares de *C. pseudotuberculosis*. Se observó un aumento significativo progresivo en respuesta humoral en la octava semana, pero los títulos de anticuerpos disminuyó en la trigésimo segunda semana. Después del desafío, el número de granulomas fue significativamente menor en los animales vacunados en comparación con los controles, lo que apoya el uso de una vacuna que combina exotoxina con antígenos somáticos. Sin embargo, la protección inmune todavía no era adecuada (Piontkowski MD, Shivers DW., 1998).

12.1.2 Vacunas viva atenuada

Para mejorar los resultados de los modelos de vacunas basadas en cepas vivas, los investigadores modificaron genéticamente una cepa mutante de *C. pseudotuberculosis* en el que el gen de la PLD se eliminó por mutagénesis, llamada «Toxminus». Cuando se inocula en ovejas, esta mutación era menos virulenta, sin causar granulomas locales (108 CFU / dosis). Con una dosis de 1.010 UFC de mutante Toxminus, se observaron pequeños granulomas en nódulos linfáticos de drenaje, y la bacteria mutante fue aislada en sólo uno de estos granulomas. Estos resultados confirmaron que PLD es esencial para la supervivencia de *C. pseudotuberculosis in vivo*. Las respuestas humorales y celulares a este mutante se evaluaron y se encontró que eran menos severas que las inducidas por cepas de tipo salvaje. Cuando los animales vacunados con Toxminus fueron desafiados con una cepa de tipo salvaje (107 CFU), el número de granulomas y su extensión eran mucho más pequeños en comparación con los animales control. Por lo tanto, la cepa Toxminus que codifica un PLD modificado genéticamente no es tóxico y confiere inmunoprotección (Hodgson, *et al.*, 1992).

En los ensayos de vacunación, todas las ovejas inmunizadas mostraron evidencia de bajos títulos de anticuerpos para PLD; Sin embargo, después del desafío, los títulos aumentaron significativamente, lo que indica que los animales habían sido sensibilizados por la vacuna. El inconveniente fue la tasa de protección de los animales inmunizados era sólo el 44% (Hodgson ALM, *et al.*, 1999).

En otros estudios, el grupo Toxminus desarrolló un nuevo mutante, Toxminus con un gen adicional que codifica una forma inactiva del PLD. Esta forma inactiva se obtuvo mediante la sustitución de una histidina para una tirosina en el sitio activo de la enzima. Animales oralmente vacunados con este mutante fueron protegidos al 100% contra una cepa de tipo salvaje. Estos resultados confirman la importancia de la PLD como un antígeno protector y demostraron tanto el potencial para el desarrollo de una vacuna oral contra *C. pseudotuberculosis* (Hongson, *et al.*, 1990).

12.1.3 Vacunas con subunidades antigénicas

Modelos de vacuna de subunidad también se han desarrollado en un intento de mejorar la respuesta inmunológica específica y promover mayores tasas de protección. La proteína CP40 antígeno de *C. pseudotuberculosis* fue identificado por una estrategia que emplea células secretoras de anticuerpos derivados localmente (ASC). Ovejas vacunadas dos veces con 100 g por dosis de CP40 en adyuvante de hidróxido de aluminio fueron protegidas contra la infección con *C. pseudotuberculosis*, con una reducción del 82% en el número de ovejas infectadas y una reducción de 98% en las lesiones pulmonares, lo que sugiere que el antígeno de 40 kDa desempeña un papel importante en la inmunidad a Linfadenitis Caseosa (Walker J. *et al.*, 1994).

12.1.4 Vacunas recombinantes

C. pseudotuberculosis Toxminus (mutante PLD) se ha utilizado como un vector vivo para la bacteria para entregar proteínas antigénicas heterólogas (Rebouças *et al.*, 2011). Cinco genes heterólogos (el gen que codifica para el antígeno de *Mycobacterium leprae* 18-kDa, gen 45W *Taenia ovis*, *Babesia bovis* 11C5 antígeno, gen que codifica la *Dichelobacter nodosus* madura basicaproteasa (bprV) y *Anaplasma marginale* ApH antígeno), además de un análogo genéticamente inactivado de PLD, se utilizaron para la construcción de plásmidos que expresan genes foráneos en la cepa Toxminus. Tres proteínas suscitaron respuestas de anticuerpos específicos en ovinos experimentalmente vacunados.

Aunque los animales no estaban totalmente protegidos, esta vacuna recombinante fue capaz de provocar una respuesta inmune humoral, y puede ser capaz de entregar con éxito un antígeno extraño; los inmunógenos no impidieron completamente la enfermedad, pero la evolución clínica fue más suave, con números significativamente más bajos de granulomas en los animales inmunizados en comparación con animales de control no vacunados (Windsor., 2011).

Otro estudio utilizó un antígeno de la pared celular de *C. pseudotuberculosis* con dipéptido muramilo como un adyuvante y se observó una reducción en piogranulomas (Braga, 2007). En otro estudio se ha sido probado la proteína de choque térmico Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* como un candidato a vacuna contra la LAC. La inmunización se realizó en ratones con Hsp60 recombinante (rHsp60) que se expresó en *E. coli* purificado e indujo una respuesta de IgG anti-Hsp60 significativa, con una mayor producción de IgG1 en lugar de IgG2a. Además de una respuesta inmune que se caracterizó por una producción elevada de IFN- γ e IL-10, mientras que la IL-4 las concentraciones no aumentaron significativamente. Sin embargo, la administración subcutánea de rHsp60 no indujo una protección eficaz contra la infección intraperitoneal con *C. pseudotuberculosis* (Pinho JMR *et al.*, 2009).

12.1.5 Vacunas de ADN

Éstas consisten en unos pequeños anillos de ADN llamados plásmidos en los que se introduce tan sólo la pequeña fracción del material genético del patógeno contra el que se pretende inmunizar (los genes que codifican la producción de uno o varios de sus antígenos). Las vacunas de ADN han tenido menos éxito en la inmunización del ganado que las convencionales vacunas contra el LCA, con respuestas inmunes débiles y de corta duración después desafío y concentraciones de anticuerpos no significativamente más altos que los de los animales vacunado (Windsor, 2011).

12.2 Vacunas Comerciales

La mayoría de las vacunas comerciales actualmente disponibles para LCA se combinan con vacunas contra otros agentes patógenos y están disponibles en diversas regiones del mundo.

12.2.1 Vacuna de fracciones antigénicas referencia

En España existe la vacuna Biodectin producida por los laboratorios Zoetis, según información de la Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios, contiene 0.05 U ELISA/ml y utiliza hidróxido de aluminio como adyuvante (2 mg/ml), Biodectin es un producto para ganado ovino que consiste en una combinación fija de seis fracciones antigénicas (4 toxoides y dos anacultivos) y un endectocida (moxidectina) como desparasitante, se recomienda la revacunación anual y en el caso de ovejas gestantes se recomienda realizar la revacunación de 4 a 6 semanas antes de la fecha supuesta del parto, con el fin de lograr tanto una transferencia óptima de los anticuerpos calostrales como para evitar la infestación parasitaria de los corderos (AEMPS, 2013).

12.2.2 Vacuna de toxoide

En Estados Unidos se producen vacunas comerciales contra Linfadenitis caseosa. La vacuna GlanvaCTM6 (CSL Limited, New Zealand) producida por el Colorado Serum Company, es una vacuna multicomponente que incluye antígenos ultrafiltrados de *C. pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novytipo B*, *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei*. Estas vacunas se basan en fosfolipasa D inactivada (PLD) y se denominan vacunas de toxoide. (Paton *et al.*, 1994), en un análisis de la eficacia de una vacuna combinada contra el toxoide LAC, informaron de una reducción en el número y tamaño de los abscesos pulmonares LAC y una disminución en la propagación de esta enfermedad en el rebaño. Dosis y administración se inyecta 1 ml por vía subcutánea en el lado del cuello justo detrás y por debajo de la base de la oreja. En los animales no vacunados previamente de todas las edades, se da una dosis de 1 ml y se repite 4 semanas más tarde. Dar a todos los animales dosis de

refuerzo anual para controlar linfadenitis caseosa. La protección ofrecida por las vacunas comerciales Glanvac 3 y 6 es de aproximadamente 65% (Dorella *et al.*, 2009)

12.2.3 Vacuna viva atenuada

Vacuna producida por USDA (Nacional Animal Disease Center, Ames, IA USA) que contiene pared celular de *C. pseudotuberculosis* no viable con o sin muramil dipéptido. Una bacterina *C. pseudotuberculosis* con muramildipéptido induce títulos de anticuerpos, aumenta el tiempo de aparición, y disminuye natural que se abscesos externos en el ganado ovino y caprino. La vacuna está hecha de una cepa viva atenuada de *C. pseudotuberculosis* la cepa 1002, es disponible en una forma líquida que debe ser administrada anualmente a los animales, por vía subcutánea (Windsor., 2011).

En Australia esta vacuna (comercializada como "6 en 1" con 5 antígenos clostridiales), en las pruebas de campo ha demostrado que la protección varía de 25% a 90%. Los programas de vacunación que siguieron las recomendaciones del fabricante de 2 administraciones a corderos, seguido de vacunaciones anuales de refuerzo llevaron a una prevalencia promedio de LCA del 3% en comparación con el 29% en los rebaños no se da ninguna vacunación (Windsor, 2011).

En Brasil existen algunas vacunas como una versión liofilizada también está siendo desarrollado por la Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola en colaboración con la Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Federal de Bahía, Brasil. Esta vacuna viva informó conferir alrededor del 80% de protección contra el Linfadenitis Caseosa en cabras y otra vacuna viva atenuada, LinfoVac (Laboratorios Vencofarma do Brasil Ltda), que tiene licencia para su uso en ovejas y cabras (Dorella *et al.*, 2009)

12.3 Comparativo entre vacunas comerciales y experimentales

En Alberta Canada, la incidencia de Linfadenitis Caseosa, estimulo la evaluación de la eficacia y el impacto de la vacunación con 2 comercial (Glanvac-6 y Case-

Vac) y 1 experimental (WC + MDP-PIB), una serie de 3 ensayos de campo en 3249 y ovejas corderos se realizó en rebaños afectados de 1992-1996. Dos de las 3 vacunas utilizadas en este estudio indujeron alta aglutinación de títulos de anticuerpos. La mayoría de los corderos vacunados con WC + MDP-PIB y Caso-Vac desarrolló títulos > 1: 320 a 1 mes después del refuerzo. Se mantuvieron negativos durante 12 meses posteriores, la protección de la vacuna experimental y la Case-Vac no difirió significativamente (Stanford *et al.*, 1998).

Un estudio hecho en Turquía, se comparó la protección de una vacuna combinada (PLD+bacterina) y una vacuna comercial, los niveles más altos de anticuerpos en las ovejas y a la inspección manual de ganglios linfáticos en ovejas desafiadas, se encontró que el 2.38 % de los animales con vacuna combinada presento lesiones y con vacuna comercial en rebaños vacunados y no vacunados se encontró el 14.57 y 16% respectivamente, se obtuvo un 57% de protección con la bacterina experimental (Erganis, 2013).

Cuadro 2. Desarrollo de biológicos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Tabla Desarrollo de bacterinas contra <i>C. pseudotuberculosis</i> en los últimos 40 años.					
Año	País de origen	Modelo animal	Composición del inmunogeno	Tipo de adyuvante	Vía de administración
1972	Australia	Ovino	Bacteri ns	AP	----
1984	USA	Ovino	Bacterin or CW	WOE	IM
1985	USA	Ratón	Bacterin or CW	MDP, TDM, BCG and Cpar	IP
1986	USA	Cabra	Toxoid	FIA	SC
1987	USA	Ovino	Bacterin	-----	SC
1988	Brasil	Cabra	Bacterin	AP	-----
1989	Norway	Cabra	Bacterin or toxoid	Levamisole	-----
1989	Norway	Cabra	Bacterin + toxoid	-----	-----
1990	USA	ovino/ ratón	Bacterin	MDP	IM / IP
1991	USA	Ovino/ Cabra	Dried whike Cp cells	MO + AA	IM

1991	USA	Ovino	CST	BPA	-----
1991	Australia	Ovino	Toxoid or Bacterin + toxoid	AH	SC
1991	Australia	Ovino	Toxoid or toxoid Cp+5 clostridial toxoids	AH/ Sodium selenate	SC
1991	Australia	Ovino	Bacterin or Live attenuated Cp	AH	SC
1991	Brasil	Cabra	Bacterin or Live attenuated Cp	AP (bacterin)	ID
1991	Australia	Ovino	Toxminus Cp	-----	SC
1992	Australia	Ovino	Toxminus Cp or recombinant Toxminus Cp	-----	OR
1994	Australia	Ovino	40-kDa antigen	AH	SC
1996	USA	Ovino / Cabra	Bacterin	MDO + MO	IM
1997	Australia	Ratón	Live Cp aroQ mutant or live Cp pld mutant	-----	IP
1998	Australia	Ovino	Live Cp aroQ mutant or live Cp pld mutant	-----	SC
1998	Canadá	Ovino	Glanvac® 6, Case-Vac® or bacterin	MDP + MO (bacterin)	SC / IM
1998	USA	Ovino	Bacterin + toxoid	AH	SC
1999	Australia	Ovino	Glanvac 6 or recombinant Glanvac® 6	MA	SC
2000	Alemania	Cabra	Cw	-----	-----
2000	Australia	Ovino	Toxoid Cp + 5 Clostridial toxoids	AH / Moxidectin	SC
2002	Brasil	Cabra	Liophilized live attenuated Cp	No	ID
2003	Perú	Ratón	CST	AH	SC
2005	Egipto	Ratón	Bacterin, toxoid or bacterin + toxoid	MO	SC
2006	Reino Unido	Ovino	Bacterin, rPLD, bacterin + rPLD, or Glanvac® 3	AH	SC
2007	Perú	Alpacas	Live Cp	-----	SC
2007	Perú	Alpacas	CW or CST	MDP	SC
2007	Egipto	Ratón	Bacterin, rPLD, or bacterin + rPLD	MO	SC
2008	Brasil	Cabra	Crude CST, concentrated CST + oligodeoxynucleotide CpG, or live attenuated Cp	FIA	SC
2009	Brasil	Ratón	Recombinant Heat-shock protein 60 (rHsp60)	FCA / FIA	SC
2010	Egipto	Ovino	Bacterin, bacterin + rPLD, Gamma-irradiated Cp + rPLD or BCG + rPLD	MO (except BCG)	SC
2010	USA	Ratón	Bacterin + toxoid	-----	-----

2010	Turquía	Ovino	Bacterin + toxoid	FCA	SC
2011	Arabia Saudita	Ovino	Glanvac® 6	Olive oil	SC

Abreviación : Immunógenos - Cp = *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Bacterina = Cp células completas muertas; CW = sonificado pared celular Cp.; CST = exotoxinas de sobrenadante del cultivo filtrado; Toxoide; = exotoxina fosfolipasa D inactivada (PLD); rPLD = recombinante PLD; Glanvac® and Case-Vac® = vacunas comerciales; Toxminus = Gen PLD Cp mutado; Adyuvantes - WOE = agua en aceite en emulsión; MO = aceite mineral; AA = Arlcel A o mono oleato de manitol; AH = hidróxido de aluminio; AP = Fosfato de aluminio; MDP = muramyl di péptido; TDM = trehalosa dimicolato; BCG = células muertas Mycobacterium bovis BCG; Cpar = células muertas Corynebacterium parvum; FCA = adyuvante completo Freund's; FIA = adyuvante incompleto Freund's ; BPA = adyuvante polímero bloque; MA= adyuvante multicomponente; Vía de administración- SC = subcutáneos; IM = intramuscular; IP = intraperitoneal; ID = intradérmico; OR = oral. (Lopes B., et al 2012)

III. JUSTIFICACIÓN

La producción ovina en México es una agroindustria rentable, en expansión debido a la gran demanda de productos ovinos (especialmente carne) y al precio favorable de los mismos. La especie ovina es susceptible a contraer Linfadenitis caseosa provocada por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que es una enfermedad cuya importancia en la producción de ovinos y caprinos se da por el impacto provocado con la pérdida en la producción de carne, leche, lana y en fallas reproductivas originadas por la infección, así como por el decomiso de las canales afectadas, lo que se traduce en pérdidas económicas no siempre cuantificables; al considerarse una zoonosis, esta enfermedad tiene impacto en la Salud Pública, sobre todo en el personal dedicado al manejo de ovinos y sus productos, lo que significa un problema social y económico, es una enfermedad a la que no se le ha prestado la atención que exige su morbilidad.

La Linfadenitis caseosa es una enfermedad de distribución mundial, existen estudios en Brasil que reportan la prevalencia de esta bacteria en el 77% de los rebaños caprinos de la región de Rio de Janeiro afectados, en Tandil en Argentina, se reporta un 7.48%, en Australia occidental un 54%, en España se encontró un 11% en casos de decomiso de canales en rastro; en México se reportó un 33% de prevalencia en aislados de lesiones de ovinos en del estado de Jalisco, dato que requiere más estudios epidemiológicos para el establecimiento de programas de control.

En el mercado existen vacunas elaboradas tanto con bacterias vivas atenuadas o muertas, multicomponentes y con fracciones de exoproteínas contra *C. pseudotuberculosis* que son usadas principalmente en países desarrollados, pero no se ha logrado una respuesta inmune satisfactoria en todos los lugares donde se han probado. La protección parcial proporcionada por la inmunización de cabras y ovejas con vacunas comerciales puede relacionarse al hecho de que no se utilizan cepas virulentas originarias de las zonas geográficas afectadas. En México no existe la comercialización de vacunas contra Linfadenitis Caseosa y faltan estudios que evalúen la protección conferida por un inmunógeno a partir de

cepas locales, por lo que la elaboración y evaluación de una vacuna realizada a partir de aislados mexicanos de *C. pseudotuberculosis* en un modelo en ovino puede ser una alternativa para el control de esta enfermedad en unidades de producción ovina.

IV. HIPÓTESIS

El inmunógeno desarrollado a partir de aislados de campo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, logrará una protección igual o mayor al 65%, en desafío controlado en un modelo ovino.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la protección conferida por un inmunógeno obtenido de aislados de campo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovariedad ovis para la prevención y control de la Linfadenitis caseosa en ovinos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la respuesta inmune de una bacterina de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante una prueba de ELISA indirecta
2. Describir los hallazgos bacteriológicos de los animales desafiados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
3. Describir los hallazgos clínico patológicos de los animales desafiados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*

VI. MATERIAL Y MÉTODO

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, en el periodo entre agosto de 2015 y junio de 2017.

I. Aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* utilizados en la elaboración de la bacterina.

Se realizó una bacterina de *Corynebacterium pseudotuberculosis* utilizando los aislamientos H14X y 1-2 2LJ obtenidos de casos clínicos en ovinos del Estado de Jalisco. Estos aislamientos fueron seleccionados por el tipo de exudado, tamaño del absceso que presentaron las lesiones (Cuadro 3), por los resultados en las pruebas bioquímicas (Cuadro 4) y la presencia de los genes de patogenicidad y virulencia *FagA*, *FagB*, *FagC*, *FagD*, *hsp60* y *pld*, además de los genes *rpoB* y el gen *16s RNA* para la identificación de la especie (Cuadro 5), otros criterios que se tomaron en cuenta en la selección fue el bandeo obtenido por corrimiento electroforético de las proteínas totales en donde ambos aislamientos mostraron la presencia de 8 bandas proteicas dentro de las cuales se identificó una banda bien definida de 37 Kd la cual podría corresponder a la exotoxina PLD (Cuadro 6)(Ortiz *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Características externas de los abscesos asociados a *C. pseudotuberculosis* en ovinos

IDENTIF	MUNICIPIO	SEXO	REGION ANATOMICA	TAMAÑO	TIPO DE EXUDADO
H14X	Tepatitlan	H	Cabeza	5.1 - 10 cm	Purulento
1-2-2LJ	Zapotlanejo	H	Subiliaco	5 cm	Seropurulento

**Cuadro 4. Resultados de pruebas Bioquímicas de aislados d C.
pseudotuberculosis en ovinos**

IDENT	OXI	CAT	TSI	MIO	SIM	UREA	CALDO NITRITO	GLUCOSA	SACAROSA	TRIALOSA	MALTOSA
H14X	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
1-2-2LJ	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+

**Cuadro 5. Genes de Virulencia encontrados en aislados de C.
pseudotuberculosis en ovinos**

IDENT	Gen <i>pld</i>	Gen <i>rpoB</i>	Gen <i>16s</i> RNA	Gen <i>hsp60</i>	Fag A	Fag B	Fag C	Fag D
H14 X	+	+	+	+	+	+	+	+
1-2-2LJ	+	+	+	+	+	+	+	+

**Cuadro 6. Bando proteico de las cepas H14X y 1-2 2JL de C.
pseudotuberculosis en ovinos**

Bando proteico de bacterinas <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .									
Bacteria	Aislamiento	Extracto somático			31	Extracto sobrenadante			
		125	108	75		28	20	17	14
2	H14X	X	X		X	X	X	X	X
3	1-2-2-L-J	X	X	X	X		X	X	X

II. Protocolo para la elaboración de la Bacteria

El protocolo de elaboración de la bacteria es una modificación del descrito por Mújgan *et al.*, 2010. Se sembraron los aislamientos seleccionados (H14X y 1-2 2LJ) tomando una sola colonia bien definida en 250 mL de BHI 0.1 % Tween 80 y se incubaron durante 72 hrs a 37°C en movimiento en una atmosfera de velobiosis y se dejó sedimentar a 4°C por 12 hrs. Se realizaron diluciones en base 10 del cultivo original a partir de las cuales se sembró en placas Petri por duplicado en agar BHI y se incubaron a 37°C por 48 horas, para estimar la cantidad de

unidades formadoras de colonia en placa (UFC/ ml) conforme a la norma oficiales mexicanas (NOM-110-SSA1-1994 Y NOM-092-SSA1-1994). Para estimar la cantidad formadora de colonia en placa se utiliza la siguiente formula:

$$\text{UFC/ml en placa} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias significativas en la últimas placas considerada}^*}{\text{FDD/ Volumen inicial sembrado.}}$$

Dónde: Factor Decimal de dilución (FDD) 1/FD; Factor de titulación (FD) Titulo de la dilución inicial * títulos diluciones sucesivas.

Se consideran representativas las cajas que tienen un número de colonias dentro del rango de sensibilidad del método, en este caso, entre 25 y 250 UFC. Una vez seleccionadas las cajas y hechos los promedios correspondientes, se aplicó el factor de dilución, que es el inverso y se redondea el número a 2 cifras significativas (o dígitos) y potencias de 10. En este caso, la bacterina quedo conformada con una concentración de 8×10^6 UFC por dosis aplicada.

Posteriormente se agregó formaldehido 2.75 mL (275 μ L) por cada L de medio cultivado y se realizó una prueba de esterilidad tomando una asada del fondo del recipiente que contenía la bacterina y se sembró placas agar sangre, sal y manitol, BHI y Mc Conkey, luego de confirmada la esterilidad por ausencia de crecimiento en los diferentes medios se agregó Timerosal 1 gr / 10L de la bacterina y se dejó sedimentar por 7 días a 4°C.

Finalmente se agregó adyuvante incompleto de Freund (50% del volumen total de la bacterina).

Esta Bacterina se aplicó vía subcutánea sobre el ganglio preescapular derecho, un total de 2 mL por cordero tratado

III. Inmunización y Desafío

3.1. Reactivación de la cepa para el desafío

El desafío fue con la cepa de referencia 43926 ATCC biovariedad *ovis*. La reactivación de la cepa se realizó en ratones BALB/c libres de patógenos, criados

en el bioterio del CIESA aplicando 0.1 mL con una concentración de 8×10^6 UFC (Fig 9), la bacteria se reaisló de las lesiones provocadas. (Solonet *et al.*, 2011).



Fig. 9 Inoculación en el modelo murino (A) Inoculación con cepa ATCC (B) desarrollo de absceso subcutáneo en dorso tras inoculación.

3.2. Grupos experimentales (animales)

Se trabajó con 16 ovinos, 12 machos y 4 hembras (una por grupo) de 4 meses de edad, provenientes de establecimientos clínicamente libres de Linfadenitis Caseosa. Se formaron cuatro grupos experimentales (1) vacunado (2) desafiado con vacunación (3) desafiado sin vacunación y (4) control negativo. Durante todo el experimento se tomó en cuenta el bienestar de los animales todo esto avalado por el comité de Bioética y Bienestar animal de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (Anexo 2)

En la Figura 1 y el Cuadro 8 se presentan el diseño experimental con la calendarización de las inmunizaciones, desafíos y toma de muestras de sueros en los diferentes grupos de animales experimentales.

IV. Evaluación de los animales experimentales

4.1. Examen clínico y extracción de muestra sanguínea:

En el examen clínico se incluyó la toma de temperatura, evaluación de mucosas, condición corporal y peso; realizado los días -8, 0, 7, 14, 21, 29, 36, 43, 50, 57 y 60. Los animales fueron eutanasiados siguiendo el protocolo recomendado por la norma NOM-033-ZOO-1995 en el día 60 del experimento obteniendo muestras para el estudio histopatológico y bacteriológico.

V. Estudio bacteriológico

Las muestras se tomaron de diversos tejidos del organismo de los animales: músculo, hígado, pulmón, bazo, cerebro, cerebelo, riñón, intestino, y los linfonódulos submandibular, preescapular, mediastínico, mesentérico y poplíteo. Las muestras fueron sembradas en agar sangre a 37°C en velobiosis lo que crea un ambiente microaerófilico durante 48-72 h. Se observó la morfología de las colonias desarrolladas; en aquellas que se presentaron blanquecinas y puntiformes (0,5 mm), rodeadas de un halo tenue de β -hemólisis, se realizó la tinción de Gram y las pruebas del tren de bioquímicas básicas: TSI, LIA, CIT, MIO, SIM, OF, ONPG, RM-VP, UREA, así como la aplicación del kit API Coryne (versión 2.0 Biomerieux, France) y

VI. Estudio molecular de los reaislamientos

6.1. Amplificación de los genes *16s*, *rpoB* y *pld*.

La ampliación de los genes *16s*, *rpoB* y *pld* se realizó en un termociclador (Teche TC-512) donde se ajustó la temperatura de alineación con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial de 94 °C por 30 segundos seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 40 segundos, alineación de 60.5 °C por 40 segundos y una extensión de 72 °C por 40 segundos terminando con un paso final de 72 °C por 10 min. Los iniciadores empleados se describen en el cuadro 6.

Cuadro 8. Iniciadores empleados en el PCR gen *16s*, *rpoB* y *pld*.

Gen	Primers	Secuencia	Pares Bases	Referencia
16s	16S-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	816	Centrikaya <i>et al.</i> , 2012
RNA	16S-R	TCTCTACGCCGATCTTGAT		
Rpob	C27OOF	CGTATGAACATCGGCCAGGT	446	Khamis <i>et al.</i> ,2004
	C313OR	TCCATTTCCGAAGCGCTG		
PLD	pld-F	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	203	Pacheco <i>et al.</i> , 2007
	pld-R2	ATCAGCGGTGATTGTCTCCAGG		

6.2. Amplificación del gen *Fag A, B, C y D*.

La reacción se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones: un ciclo de 95 °C durante 5 min; 29 ciclos de 95 °C durante un min, 58 °C durante 40 segundos alineación *Fag A*, 55 ° C durante 40 segundos alineación *Fag B*, 60.5 °C durante 40 segundos alineación para los genes *Fag C* y *Fag D* y 68 °C durante 2 min 30 segundos; y un paso de extensión final a 68 °C durante 7 min, (Costa *et al.*, 2011).

Cuadro 9. Iniciadores empleados en el PCR genes *Fag A, B, C y D*

GEN	Primers	Secuencia	Pares Bases
<i>Fag A</i>	<i>Fag A F</i>	5'AGCAAGACCAAGAGACATGC3'	245
	<i>Fag A R</i>	5'AG TCTCAGCCCAACGTACAG3'	
<i>Fag B</i>	<i>Fag B F</i>	5'GTGAGAAGAACCCTGGTATAAG3'	291
	<i>Fag B R</i>	5'TACCGCACTTATTCTGACACTG3'	
<i>Fag C</i>	<i>Fag C F</i>	5'GTTTGGCTATCTCCTTGGTATG3'	173
	<i>Fag C R</i>	5'CGACCTTAGTGTGACATACCC3'	
<i>Fag D</i>	<i>Fag D F</i>	5'GAGACTATCGACCAGGCAGA3'	226
	<i>Fag D R</i>	5'ACTTCTGGGGAGCAGTTCT3'	

6.3. Amplificación del gen *hp60*

Los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 25 µl, conteniendo 12.5 µl de master mix, 1 µl de cada primer, 6.5 µl de agua libre de nucleasas, 2.5 µl de Q solution y 1.5 µl de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Prime G #cat. 732-1595 Techne®. Utilizando las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 5 min; 29 ciclos de 95°C durante 1 min, 51°C durante 40 s, y 68°C durante 2 min 30 s; y un paso de extensión final a 68°C durante 7 min (modificado de Costa *et al.*, 2011).

La amplificación de los productos de PCR se realizó mediante la técnica de electroforesis en un gel de Agarosa al 1.5 % y visualizados con tinción de bromuro de etidio en un transiluminador (DNR Mini Bis Pro).

Cuadro 10. Iniciadores empleados en el PCR gen *hp60*

Gen	Primers	Secuencia	Referencia
<i>hsp60</i>	Forward	GATGGCAAAGCTGATTGCA	Costa <i>et al</i> , 2011
	Reverse	TTAGTGGTGGTGATGGTG	Costa <i>et al</i> , 2011

VII. Estudio Histopatológico

Se tomó muestra histopatológica de: músculo, hígado, pulmón, bazo, cerebro, cerebelo, riñón, intestino, y los linfonódulos submandibular, preescapular, mediastínico, mesentérico y poplíteo.

Las muestras obtenidas se fijaron en formol tamponado al 10%, incluidas en parafina, y seccionadas (5 µm), para montarse en portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina y eosina, según las técnicas histológicas de rutina.

VIII. Estudio Serológico (Determinación de niveles de anticuerpos en animales desafiados por la técnica de ELISA indirecta).

8.1. Preparación del antígeno

El antígeno empleado para sensibilizar las placas de ELISA fue elaborado con la cepa de referencia que se utilizó en el desafío (ATCC 43926). Esta fue cultivada en caldo BHI durante 72 h a 37 °C en agitador orbital a 50 rpm. El cultivo se centrifugó a 10 000 g durante 30 min y el *pellet* obtenido se resuspendió en 10 mL de PBS pH 7.2; este paso se repitió 2 veces. Finalmente se resuspendió el *pellet* en PBS formolado al 0,5% y se disgregó mediante un sonicador semiautomático (Branson Sonifer 250) utilizando el siguiente protocolo: tiempo, 30 seg; pulsos, 15/05; 1 min 30 seg. (Solán et al., 2011).

Para determinar la concentración de antígeno, se utilizó el método del tablero de ajedrez. Se sensibilizó una microplaca de poliestiréno con el antígeno PLDS

colocando la solución concentrada en la fila A y realizando diluciones dobles por filas utilizando buffer de carbonatos (5.3% Na₂CO₃, pH 9.6) como diluyente. Posteriormente se corrió la prueba de ELISA utilizando un suero control positivo y un suero control negativo a distintas diluciones, utilizando buffer de carbonatos como diluyente, comenzando por la dilución 1:10 y continuando con diluciones dobles distribuidas por columnas en la microplaca (Crowther, 2001).

8.2. Sensibilización de las placas

Se utilizaron microplaca de poliestiréno (96F without LID SH microwell plate Nunc BATCH 049004) las cuales fueron sensibilizadas con el antígeno diluido en buffer de carbonatos (5.3% Na₂CO₃, pH 9.6) las cuales se incubaron durante 24 hrs. A 4 °C para posteriormente realizar cuatro lavados con PBS Tween 20 para luego realizar el bloqueo con leche descremada al 2% por una 1 hr a 37 °C, posteriormente se realizaron cuatro lavados dejando secar, por ultimo las placas se almacenarlo a 4 °C cubiertos con aluminio hasta su utilización.

8.3. Prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos de *C. pseudotuberculosis*

En las placas previamente sensibilizadas se agregó 50 µL de una dilución 1:100 en PBS de los sueros problemas (anticuerpo primero) realizando una incubación de 1 hr a 37 °C para posteriormente realizar cuatro lavados con 100 µL PSB Tween 20. Posteriormente, se colocó el anticuerpo secundario (anti-IgG ovina) en una dilución 1:100 incubándose por 1 hr a 37 °C; realizándose cuatro lavados. Finalmente se agregó 50 µL ABTS (Sigma, USA) se dejó reposar por 15 min., posteriormente se realizó la lectura con una longitud de onda de 405 (lector marca Biotek, modelo Epoch), (Corona *et al.*, 2011).

8.4. Análisis estadístico de la prueba de ELISA

Para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba se empleó el programa Stata 14.1. en el cual se realizó una tabla de 2 X 2 y se aplicaron las siguientes formulas:

Cuadro 11. Tabla formula sensibilidad y especificidad

	Verdaderos positivos	Falsos negativos	
Falsos positivos	A	B	A+B
Verdaderos negativos	C	D	C+D
	A+C	B+D	

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A+B}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{C+D}$$

Para observar si existe diferencia entre los grupos se realizó una prueba ANOVA de muestras repetidas con una $P < 0.05$ utilizando el programa Stata 14.1.

IX. RESULTADOS

1 Artículo enviado a la revista



La revista publica artículos científicos originales relacionados con el campo de las ciencias veterinarias, especialmente en las áreas de producción y salud animal, salud pública y educación veterinaria, así como en áreas básicas de anatomía, histología, farmacología, fisiología, nutrición, forrajes y genética. Los trabajos pueden tratar sobre animales de compañía, de producción, de fauna silvestre y de laboratorio.

2 Temperatura corporal

La temperatura corporal (Fig.12), tomada directamente de recto con termómetro electrónico, siempre a la misma hr del día (entre las 10 y las 12 del día) arrojó los siguientes resultados por grupo experimental:

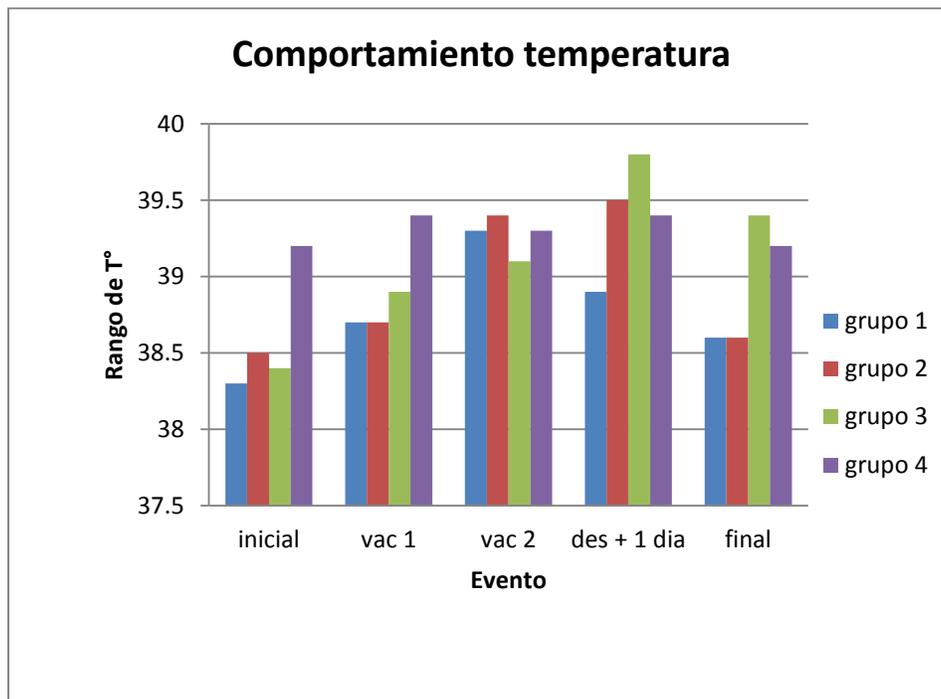


Fig 11. Comportamiento de Temperatura corporal por grupo.

La comparación de temperaturas durante los eventos realizados en el experimento (primera inmunización, segunda inmunización y desafío), así como la temperatura inicial y final, nos indicó un aumento de temperatura en cada evento con la posterior disminución de la misma, sin llegar a alcanzar otra vez la temperatura inicial, esto se atribuye a la acción invasiva de cada inmunización y desafío; en el grupo 3 (desafiado sin vacuna) se mantuvo la temperatura elevada respecto a los otros grupos hasta el final del experimento.

3 Ganancia de peso

Con relación a la ganancia de peso durante el experimento (dieta de mantenimiento a libre acceso) se comportó de manera similar en los cuatro grupos (Fig. 13), siendo el grupo 3 el que tuvo menos ganancia de peso.

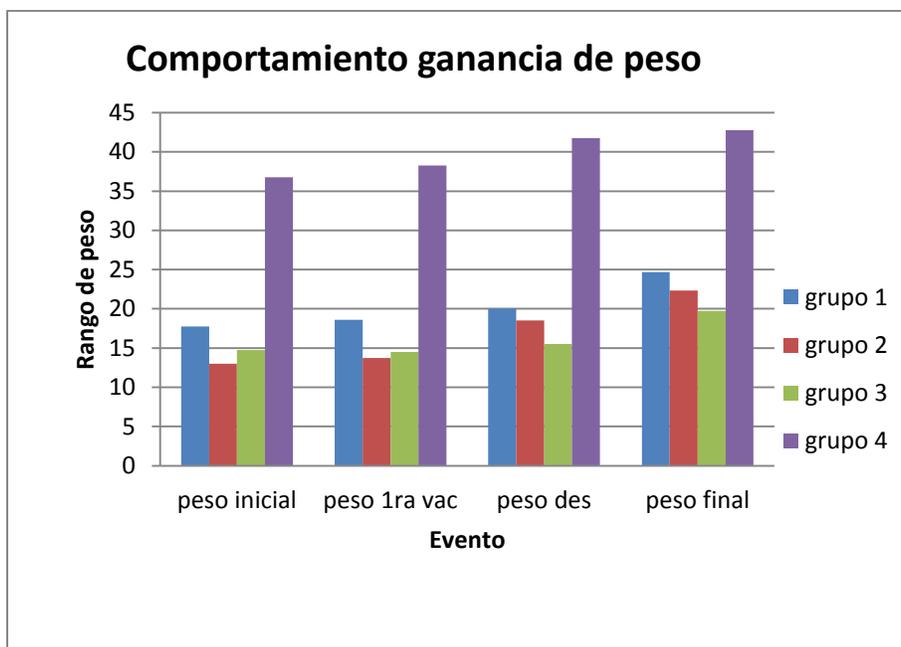


Fig. 12. Comportamiento de ganancia de peso por grupo

4 Lesiones Macroscópicas.

En relación a las lesiones encontradas en la necropsia en el grupo 1(vacunado) no se encontraron lesiones, en el grupo 2 (vacunado y desafiado) no se encontró lesiones correspondientes a los provocados por la bacteria en ninguno de los cuatro animales. Para el caso del grupo 3 (desafiado sin vacunación) se encontró lesiones en tres de los cuatro animales se la siguiente manera:

Animal Num 89 sin lesiones

Animal Num 96 absceso subcutáneo sobre ganglio preescapular derecho y absceso en el lóbulo craneal del pulmón derecho (Fig. 14 y 15)

Animal Num 94 abscesos en lóbulos craneales de ambos pulmones (Fig. 16 y 17)

Animal Num 92 absceso subcutáneo sobre ganglio preescapular derecho (Fig. 18)



Fig. 13 Absceso subcutáneo sobre escapula derecha cordero num. 92

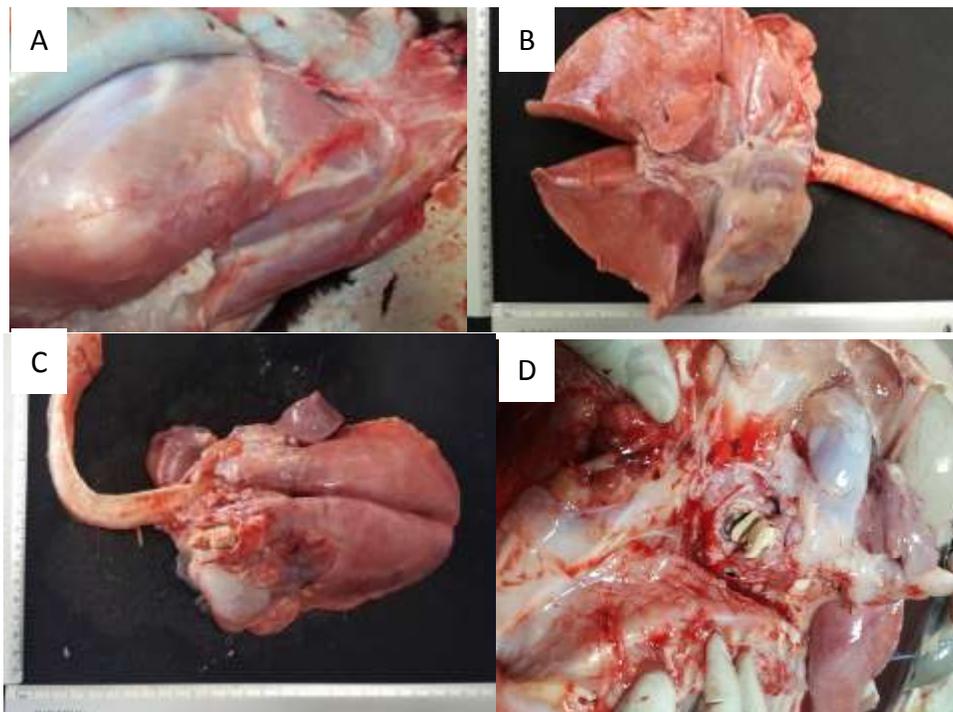


Fig. 14 Imágenes del estudio macroscópico a la necropsia. (A) Muestra la presencia de un absceso en la superficie de la escapula en el punto de inoculación, cordero num. 96 (B) Aspectos macroscópicos del pulmón mostrando

acumulación fibrina en la pleura visceral en los lóbulos apicales el pulmón cordero num. 94. (C) Presencia de absceso en el lóbulo apical del pulmón del cordero num. 94 (D) Corte de lesión abscedativa donde se observa capsula fibrosa y contenido purulento verde amarillento cordero num 94.

5 Bacteriología

Se realizó reaislamiento de *C. pseudotuberculosis* a partir de las lesiones encontradas en los animales del grupo tres (desafío sin vacunación) números 96, 94 y 92, ya que el num 89 no presento lesiones correspondientes a la bacteria, fueron sembradas en cajas de agar sangre e incubadas por 48 hrs en velobiosis a 37 °C, lográndose aislar colonias con las características típicas de la bacteria (Fig 19, 20, 21) a las cuales se les realizó Tinción de Gram (Fig 22, 23, 24) mostrando bacilos Gram positivos los cuales se agruparon en forma de le letras chinas lo cual es característico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y la prueba del kit API *coryne* (versión 2.0 Biomerieux, France) (Fig. 29) para confirmar que cumplían con las características bioquímicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cuadro 10).

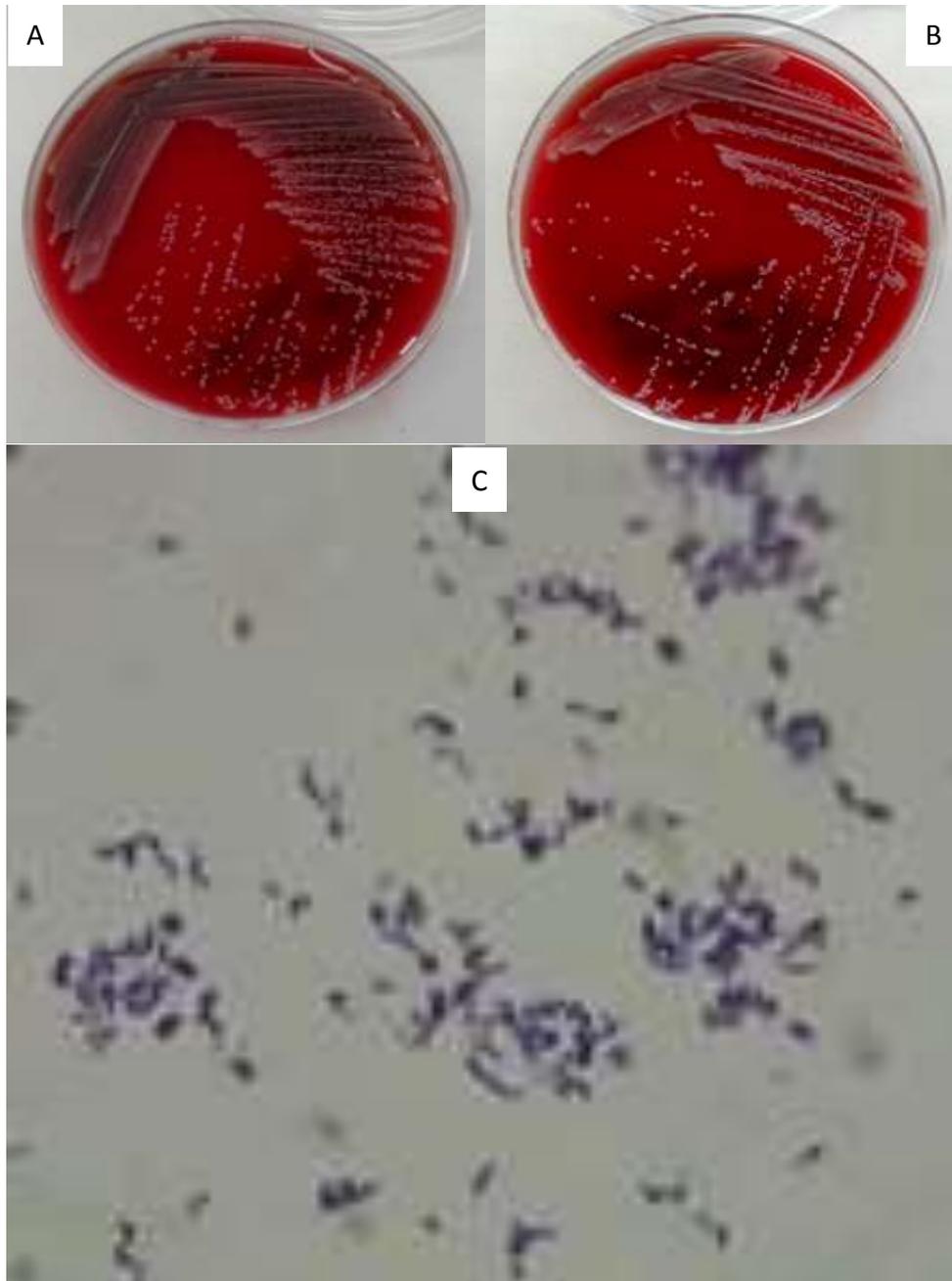


Fig. 15 Imágenes del Estudio Bacteriológico. (A). Primocultivo en Agar sangre de absceso de pulmón cordero num. 94. (B) Primocultivo en Agar sangre de absceso subcutáneo cordero num. 96. (C) Tinción de Gram donde se observa bacilos corvos Gram + formando letras chinas.

Cuadro 12 Resultados de la prueba con el Kit API Coryne

Prueba	Cepa de referencia (reactivada en ratón) 43926	H14X	12-2 LJ	Pulmón (Lóbulo craneal derecho) #94	Absceso subcutáneo (escapula derecha) #92	Absceso subcutáneo (escapula derecha) #96	Pulmón (Lóbulo craneal derecho) #96
NIT	-	-	-	-	-	-	-
PYZ	-	-	-	-	-	-	-
PYrA	-	-	-	-	-	-	-
PAL	-	-	-	-	-	-	-
βGUR	-	-	-	-	-	-	-
βGAL	-	-	-	-	-	-	-
αGLU	-	-	-	-	-	-	-
βNAG	-	-	-	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-	-	-	-
URE	+	+	+	+	+	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-
O	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+
RIB	+	+	+	+	+	+	+
XYL	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	-	-
CAT	+	+	+	+	+	+	+

Los resultados bacteriológicos nos indican que las bacterias reaislada de las lesiones en los animales desafiados sin vacuna, corresponden a *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

6 Identificación de genes 16s RNA, rpoB, pld, hsp60 y Fag A-D

Con relación a identificación de los genes *16s RNA*, *rpoB*, *pld*, *hsp60* y *Fag A-D* en donde todos los reaislamientos amplificaron dichos genes.

7 Lesiones Histológicas

Las lesiones identificadas en el estudio histológico fueron principalmente en pulmones (Figura 10) y en nódulos linfáticos (Figura 11). Las cuales son correspondientes a la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis*; las lesiones en pulmón fueron: engrosamiento del septo alveolar, presencia de células mononucleares y polimorfonucleares, hiperplasia del BALT, hemorragia y presencia de exudado en bronquios, así como la presencia de macrófagos y la observación de infiltración linfoide (Fig. 26 A, B, C), esto nos indica la presencia de invasión bacteriana y la capacidad patógena de la cepa utilizada en el desafío. Con relación al ganglio linfático se encontró centros germinales activos con presencia de células plasmáticas y presencia de hiperplasia difusa de tejido linfoide (Fig. 27 A y B),

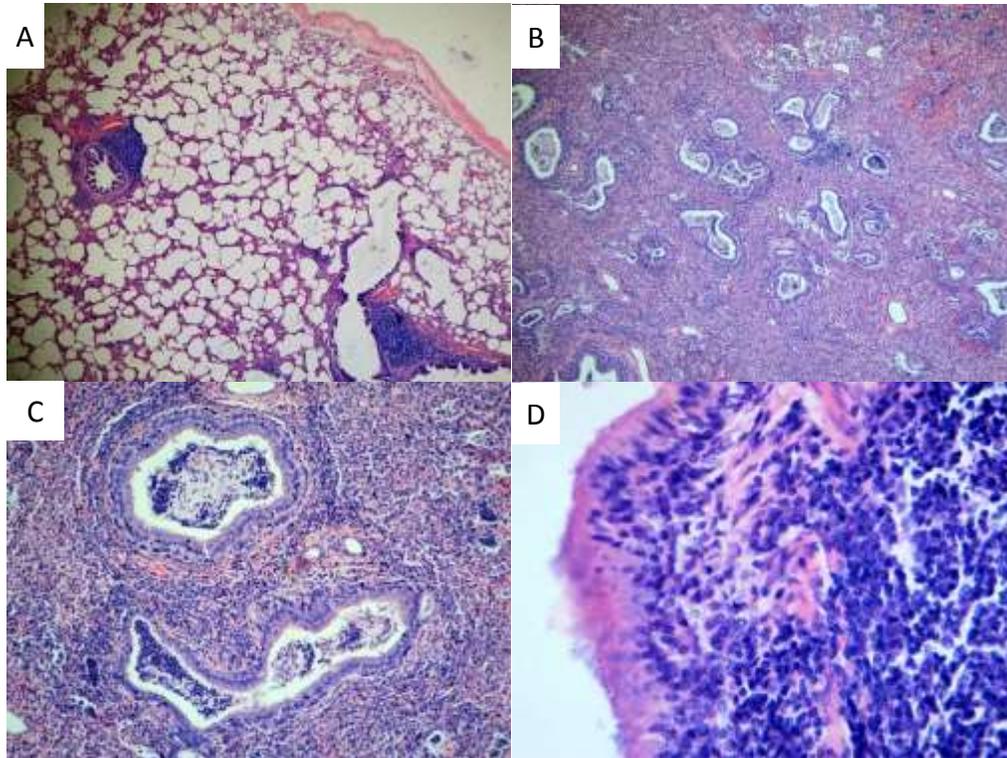


Fig. 16 Microfotografías de pulmón. (A) Grupo control, cordero 1, pulmón, sin cambios aparentes (B) Grupo desafiado sin vacuna, cordero 94 Pulmón, vista panorámica del área de consolidación nótese la ausencia de luz alveolar HE 100X, (C) Grupo desafiado sin vacuna, cordero 94 Pulmón, presencia de exudado inflamatorio en el interior de los bronquios HE 100X, (D) Grupo desafiado sin vacuna, cordero 92 Pulmón, Detalle de la mucosa bronquiolar adyacente al BALT donde se observa la infiltración linfoide y presencia de macrófagos intraepiteliales HE 400X

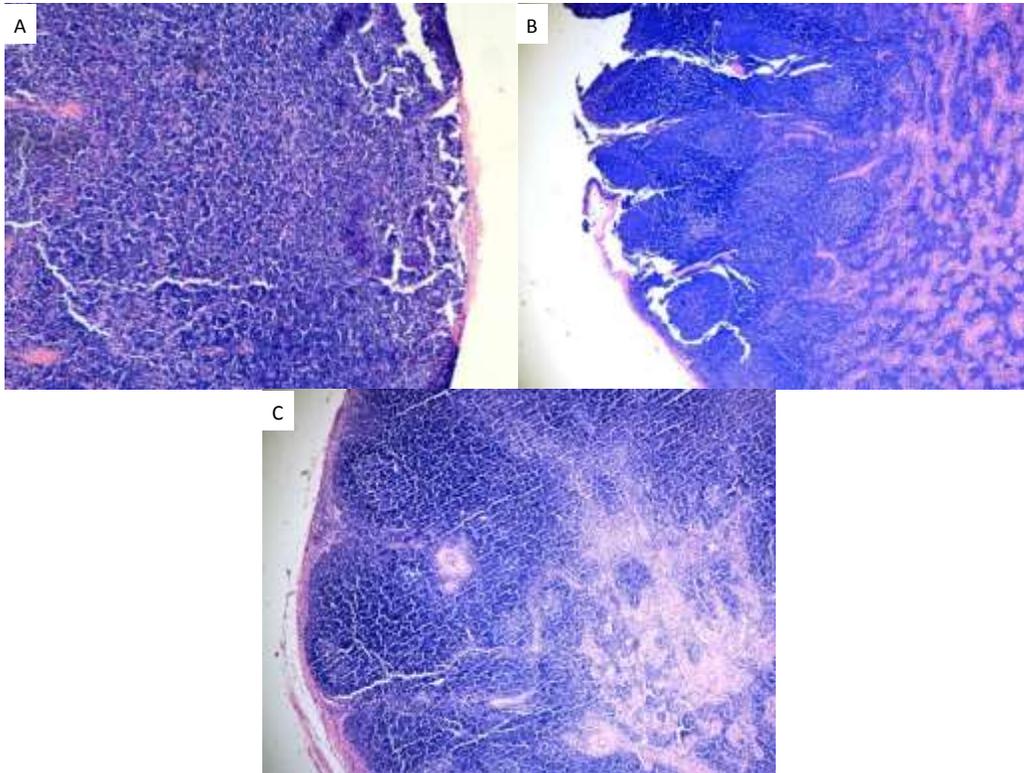


Fig. 17 Microfotografías de ganglio. (A) Grupo control, cordero 1, Ganglio preescapular derecho, sin cambios aparentes, (B) Cordero 92 Ganglio preescapular derecho con la presencia de centros germinales activos HE 40X, (C) Cordero 94 Ganglio mediastínico con hiperplasia severa HE 40X.

8 Prueba ELISA

La prueba de ELISA indirecta efectuada en los sueros obtenidos durante el experimento arrojó los siguientes resultados:

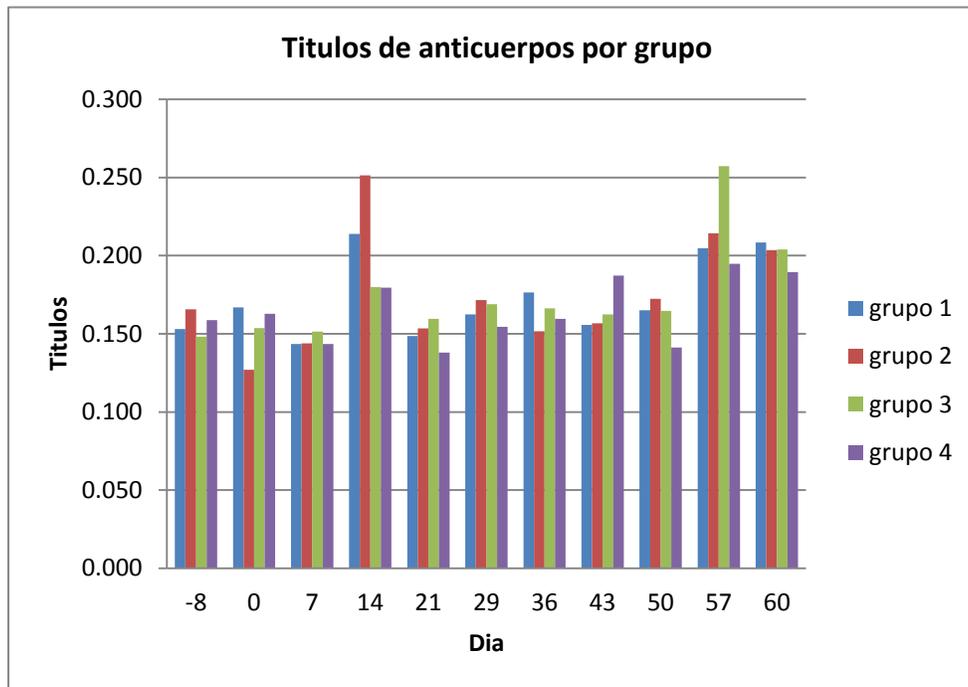


Fig 18. Titulos de anticuerpos

Con relación a la prueba de ELISA se obtuvo una especificidad de 92.38% y una sensibilidad de 38.46%.

Cuadro 13. Tabla de 2x 2 cálculo especificidad y sensibilidad

	Verdaderos positivos	Falsos negativos	
Falsos positivos	10	16	26
Verdaderos negativos	16	194	210
	26	210	236

Especificidad= 92.38 %

I.C. = 87.92% a 95.58%

Sensibilidad= 38.46%

I.C. = 20.23% a 59.43%

Al análisis estadístico ANOVA no se encontraron diferencias entre los grupos (Cuadro12)

Cuadro 14. Resultados del ANOVA por muestras repetidas.

Treatments Pair	Bonferroni and Holm TT-statistic	Bonferroni p-value	Bonferroni inference	Holm p-value	Holm Inference
A vs B	0.3793	4.2387021	insignificant	2.8258014	insignificant
A vs C	0.3645	4.3046376	insignificant	1.4348792	insignificant
A vs D	0.7512	2.7415078	insignificant	2.7415078	insignificant
B vs C	0.0149	5.9292321	insignificant	0.9882054	insignificant
B vs D	0.3719	4.2716232	insignificant	2.1358116	insignificant
C vs D	0.3868	4.2058756	insignificant	3.5048964	insignificant

A: Grupo control

B: Grupo vacunado

C: Grupo Vacunado-desafío

D: Grupo desafío

VII. DISCUSIÓN

La LCA es una enfermedad de pequeños rumiantes, de la cual existen dos reportes en México, Carrillo (2005) reportó su prevalencia en un 4.69 % en cabras en el municipio de Tlahualillo en el estado de Durango y Hernández *et al.* (2015) reportó en ovinos de Jalisco en un 33%. Se ha reportado que ocasiona pérdidas económicas de 17 millones de dólares en Australia y el 11% de decomisos de canales en rastro, en España, por lo que podría estar afectando de manera similar la producción nacional. El presente estudio buscó desarrollar una bacterina inactivada elaborada a partir de dos cepas nativas, provenientes del Estado de Jalisco, México, las cuales fueron seleccionadas de entre 60 aislados identificados como *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

El experimento tuvo una duración de 60 días, tiempo en él que se tomó periódicamente la temperatura corporal de los animales, la cual tuvo diferentes comportamientos según el grupo experimental, en el grupo 4 (control) no se observaron reacciones anormales en el comportamiento de la temperatura en ninguna de las ocasiones posterior a la inoculación y desafío, en el grupo 3 (desafiado sin vacunación) se observó la presencia de fiebre constante, lo cual de acuerdo a lo escrito por Tizard (2009) es atribuible a la presencia de la bacteria y al desarrollo de la infección en él organismo, ya que la fiebre es resultado de la inmunidad innata y la liberación de IL-1 por los macrófagos, en el grupo 2 (desafiado con vacuna) se observó un aumento de la temperatura a las pocas horas de la vacunación e inoculación del microorganismo, sin embargo, a los 4 días la temperatura corporal regreso a la normalidad, lo cual sugiere la respuesta de anticuerpos vacunales de acuerdo a lo descrito por Tizard, (2009) , en el grupo 1 (solo vacunado) la temperatura se comportó de manera similar al anterior teniendo picos de fiebre unas horas posteriores a la inoculación de la vacuna retomando la temperatura normal posteriormente.

Con relación a la condición corporal y el peso de los animales no hubo diferencias entre los grupo 1, 2 y 4, sin embargo el grupo 3 desafiado sin vacunación se observó una disminución en la ganancia de peso, lo cual es un signo clínico que

ha sido reportado previamente, (Rios, 2012). La menor ganancia de peso puede ser imputado a la presencia de la bacteria en el organismo de esos animales dado que la enfermedad se caracteriza por la baja ganancia o incluso la pérdida de peso. Ríos en 2012 manifiesta que las formas viscerales con nódulos necróticos internos bien encapsulados son compatibles con un desarrollo vital aparentemente normal, pero en formas más agudas, hay un deterioro en la condición orgánica del animal, observándose signos clínicos diversos como retardo en el tiempo de maduración sexual e incluso abortos, estos signos no han sido reportados en investigaciones previas realizadas en México.

En cuanto a las lesiones halladas en la necropsia, se encontraron, abscesos purulentos característicos de la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, en pulmones y sobre el ganglio preescapular derecho en tres de los cuatro animales integrantes del grupo 3 (desafiado sin vacunación) lo cual coincide con lo observado por Magdy *et al.*, (2009) en cuyo trabajo comenta que la mitad anterior del cuerpo era el sitio comúnmente más afectado, ya que se encontraron en 218 de 977 ovejas con lesiones, de las cuales *Corynebacterium pseudotuberculosis* se aisló de 206 casos, las lesiones halladas en la necropsia en este trabajo no presentaban capas concéntricas esto se relaciona por el corto tiempo de la infección, esto es congruente con lo descrito por Leoncio *et al.*, (2016) donde la formación de capas concéntricas fueron visibles solo a nivel estereoscópico, es decir, la patognomónica formación de capas de células muertas en forma de cebolla descritas en ovinos no fueron observadas durante el examen macroscópico, por lo que se corrobora nuevamente el corto tiempo de evolución de la enfermedad, por su parte Figueiredo en 2012 estableció que a la observación, la frecuencia de lesiones externas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, fue de 88% para hembras y 12% para machos siendo los nódulos más afectados el parotídeo 24% y el cervical superficial 50%.

Estevao *et al.*, (2007) reportó en muestras de ovinos con lesiones (abscesos) identificadas macroscópicamente mediante inspección ocular y palpación de canales y víceras en un frigorífico, (determinándose posteriormente con estudios

bacteriológicos que fueron infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*), que en el interior de los abscesos se observó tejido necrótico de consistencia caseosa en el 47% de estos, mientras que el 21% presentó núcleos de calcificación, el 19% con disposición en capas concéntricas en forma de cebolla, y con contenido de pus verdoso y espeso en el 13% restante. En el presente estudio las lesiones encontradas son indicadores de la patogenicidad de la bacteria utilizada en el desafío encontrándose lesiones similares a las descritas por Esteveo (abscesos con contenido purulento verdoso) en tres de los cuatro animales que formaron el grupo 3 desafiado sin vacuna, en pulmones y sobre el ganglio linfático preescapular derecho, las características de las lesiones son atribuibles a la capacidad de virulencia de la cepa utilizada, a pesar del corto tiempo de evaluación post infección. En el grupo 2 vacunado y desafiado y el grupo 1 solo vacunado no se encontraron lesiones macroscópicas correspondientes a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sin embargo, sí se encontraron algunas lesiones de necrosis e inflamación en el lugar de inoculación, esto podría relacionarse con el adyuvante empleado en la aplicación de la bacterina, Siel, (2014) ha reportado este tipo de lesiones con el uso del adyuvante incompleto de Freund que una emulsión de agua en aceite el cual se recomienda para su uso en pequeños rumiantes cuando se necesita una inmunidad de larga acción y es más eficiente que la lograda por otro tipo de formulaciones lo que justifica algunas reacciones colaterales, como las reacciones locales.

En el estudio bacteriológico realizado en los grupos de este trabajo se pudo reaislar *Corynebacterium pseudotuberculosis* del 75 % (3/4) de los animales del grupo desafiado, pero en ninguno de los animales del grupo vacunado con desafío, lo que demuestra un adecuado manejo del inmunógeno y del agente patógeno así una correcta elección de la vía de inoculación. Al respecto Baird y Fontaine, (2007) reportan en un grupo de animales inmunizados con una bacterina un 10.4% con lesiones de LCA, hubo una protección del 90.6 %, en este trabajo no se encontraron lesiones en el 100 % (4/4) animales inmunizados.

Del contenido de los abscesos de los tres animales con lesiones del grupo desafiado, se realizaron aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* caracterizados por presentar colonias blancas de aproximadamente 1 mm, secas y separadas, rodeadas de un halo β hemolisis lo cual coincide con Estevao *et al.* (2007). La confirmación bioquímica de los reaislamientos se realizó con en el kit APY *coryne* (Hernández *et al.*, 2015).

El estudio bacteriológico que incluye la tinción de Gram (Zeru y Kahsay., 2014). es considerado la primera opción de identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pero pueden haber identificación errónea con otras especies del género por lo cual las pruebas de PCR múltiple para el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa el *pld* y el gen 16S RNA (Costa, 2011, Hernández, 2015).

Çetinkaya *et al.* (2002) reporta que la PCR es útil en la identificación de las colonias cultivadas por su rapidez y especificidad, a diferencia de las pruebas bioquímicas que requieren un periodo más largo de análisis y subjetividad de los resultados. Pacheco *et al.* (2007) menciona que la desventaja de la PCR es que requiere de un monocultivo microbiológico reciente. En esta investigación se consideró la PCR como prueba confirmatoria para determinar que las bacterias reaisladas de las lesiones encontradas a la necropsia eran efectivamente *C. pseudotuberculosis*.

Por otro lado existen escasos trabajos que describan las lesiones histológicas provocadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en los diversos órganos, sin embargo, anteriormente León *et al.* (2002) ha reportado que en el análisis histopatológico de muestras de tejido con abscesos característicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se observa un centro amorfo y eosinófilo de necrosis rodeado por una delgada capa de linfocitos, células plasmáticas, algunas células epitelioides y neutrófilos, bordeado por una red de fibroblastos, así mismo, Estevao *et al.* (2007) determinó un centro eosinófilo de necrosis de tipo caseosa rodeado por células epitelioides, linfocitos y polinucleares, y más externamente tejido conectivo fibroso, algunas muestras con focos de calcificación rodeados de

envoltura fibrosa, con linfoplasmocitos y corona de linfocitos. Leoncio *et al.* (2016) reporta linfonodos con exudado caseoso, incremento de tamaño hallándose centros eosinofílicos con necrosis, abundantes neutrófilos, células epitelioides, bordeadas con tejido conectivo fibroso con o sin corona linfocitaria, en este trabajo, en el análisis histopatológico de las muestras tomadas en la necropsia, se encontraron diferentes lesiones según el tejido afectado, siendo el grupo 3 (desafiado sin vacuna) el que más lesiones mostro, tanto en pulmones como en ganglios linfáticos, en pulmón se encontró bronconeumonía zonal supurativa crónica activa, engrosamiento de los septos alveolares, áreas enfisematosas, hemorragia en región interseptal, moco dentro de bronquios y bronquiolos, edema alveolar e intersticial, hiperplasia células caliciformes, hiperplasia linfoide peribronquial y perivascular, se observa en el BALT una infiltración linfoide y presencia de macrófagos intraepiteliales, en tanto en ganglios linfáticos se encontró centros germinales activos e hiperplasia severa difusa en tejido linfoide; estas lesiones sugieren la existencia de una respuesta inmunitaria a la inoculación del antígeno, así como la penetración de la bacteria en el organismo a través del sistema linfático a partir del área de inoculación hacia órganos internos provocando lesiones en los mismos.

El diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por medio de serología esta reportada en diferentes trabajos, Chirino *et al.* (2009) utilizó la exotoxina de la bacteria como antígeno y se encontró una respuesta de anticuerpos desde la segunda semana post infección y se reportó un 55.98% de positivos y un 72.73% en los animales identificados con abscesos, en este trabajo la sensibilidad de la prueba se calculó en 72.3% y la especificidad en 67.4%, por otro lado, Solanet *et al.*, (2011) desarrollo una prueba de Elisa indirecta utilizando antígeno crudo, y mediante el uso de la curva Roc obtuvo una especificidad del 98% y una sensibilidad del 100%. En el presente estudio se encontró una especificidad de 92.38% y una sensibilidad de 38.46%, esto podría relacionarse a que el antígeno empleado no pudo ser el adecuado.

El control de la linfadenitis caseosa en el mundo, está basado generalmente en el manejo general del rebaño (evaluación y desinfección de lesiones, eliminación de animales problema) y en el uso de biológicos dentro del calendario zoonosanitario, O'Really (2010) reporta que una combinación de vacunación y examen clínico redujo la prevalencia de la infección a un ritmo más rápido que el uso de la exploración clínica o la vacunación sola.

Lopes *et al* (2012) dice que un programa de vacunación debe implementarse el uso correcto de inmunógenos y buenas prácticas de manejo. Estas medidas deben permitir que los animales más jóvenes que ya están vacunados reemplacen a los infectados, contribuyendo a la baja de la prevalencia y a la posible erradicación de la enfermedad en el rebaño. Existen inmunógenos de diferentes tipos con diferentes resultados en la protección conferida, Hodgson *et al* (1999) reporta una eficacia de protección del 44% con el uso de una vacuna recombinante hecha con una forma de la fosfolipasa genéticamente inactiva así como una protección del 95% con una vacuna comercial (Glanvac 6) inactivada con formalina, en el mismo experimento; por su parte, Chaplin *et al* (1999) reporta una eficacia del 56 % de protección con el uso de una vacuna de ADN.

En nuestro trabajo se utilizó un biológico hecho a partir de bacterias completas, inactivadas por adición de formol y uso del adyuvante incompleto de Freund, logrando una protección del 100% (4/4) en los animales desafiados con vacuna, lo cual se encuentra encima del margen de lo reportado en estudios previos hechos bajo condiciones similares; Erganis *et al* (2014) reportó una protección del 57 % con una bacterina hecha de bacterias completas inactivadas utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante, Mújgan *et al.*, 2010 reporta una protección de 39% con una vacuna hecha con cepas nativas y adyuvante incompleto de Freund y Guimarães *et al* (2011) que reporta una protección del 83% por una vacuna de células completas, inactivadas.

VIII. CONCLUSIONES

- 1 El grupo desafiado fue el único que presentó lesiones en la necropsia características de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- 2 En los ganglios preescapulares de los animales bacterinizados con desafío y no bacterinizados desafiados se identificaron centros germinales lo que indica la actividad inmunológica del ganglio debido a la presencia de infección.
- 3 Es el primer trabajo en México en el cual se describen lesiones histopatológicas ocasionadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* luego de una infección experimental controlada.
- 4 Con relación a la presencia de anticuerpos en la prueba de ELISA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas esto probablemente debido a la respuesta heterogénea entre los individuos y a la duración del experimento.
- 5 Aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas en la prueba de ELISA los animales vacunados con desafío no presentaron lesiones macroscópicas y microscópicas características de infección ocasionada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

IX. SUGERENCIAS

- 1 Continuar realizando evaluaciones inmunes para seguir evaluando la respuesta inmune humoral así como implementar estudios sobre la respuesta celular inferida por la bacteria implementada.
- 2 Implementar estudios sobre la protección inferida por la bacteria en unidades de producción con altas prevalencias de LCA.

X. REFERENCIAS

- 1) Abreu S.R.O., Mota R.A., Rosinha G.M.S., Forner O., Pinheiro J., Pereira R.R.B., Castro R.S., Elisei C., Soares C.O., Araujo F.R., Madireira R.C.,(2008) Comparación genotípica de asilados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de ovinos y caprinos de Sertão de Pernambuco. Pesquisa veterinaria Brasileira, v 28, p.481-487.
- 2) Aleman, M., Spier, S.J., (2001).*Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In: Smith PB.Large Animal Internal Medicine:1078-84.
- 3) Almeida, S., Sandeep, T., Mariano, D., Rocha, FS., Jamal, Syed Babar., Coimbra, NAR., Raittz, RT., Dorella, FA., Carvalho, AF., Pereira, FL., Leal, CAG., Debmalya Barh Ghosh, P., Figueiredo, HCP., Moura-Costa, LF., Portela, RW. (2016). The Genome Anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a Highly Virulent Strain Causing Caseous lymphadenitis. Stand Genomic Sci 11:29.
- 4) Aguilera, A.A. (2007). Métodos de diagnóstico para Linfadenitis Caseosa y su aplicación práctica. Cátedra de reproducción y genética en ovinos y caprinos, Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlan, UNAM
- 5) Araújo, C.L., Dias L.M., Veras, A.A, Alves, J.T., Cavalccante, A.L., Dowson, C.G., Azevedo, V., Ramos, R.T., Silva, A., Carneiro, A.R. (2016). Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* 262 biovar equi isolated from cow milk. Gen Announ 4(2):e00176-16. doi:10.1128/genomeA.00176-16.
- 6) Augustine, J.L., Renshaw, H.W. (1986). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. Am. J. Vet. Res. 47:713–715.
- 7) Baird, G.J., Fontaine, M.C. (2007) *Corynebacterium pseudotuberculosis* anda its rola in ovine caseous lymphadenitis. J Com Pathol. 137:179-2010
- 8) Batey R.G. (1986). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Aust Vet J.63:269-272.

- 9) Braga, W.U. (2007). Protection in alpacas against *Corynebacterium Pseudotuberculosis* using different bacterial components. *Vet Microbiol.* 119: 34-41
- 10) Braga, W., Schul, S., Un, A., Pezo, D., Franco, E. (2007). A primary *Corynebacterium pseudotuberculosis* low dose infection in Alpacas (*Lama Pacos*) protects against a lethal challenge exposure. *Small Rumin Res.* 72: 81-86.
- 11) Brogden K.A., Cutlip R.C., Lehmkuhl, H.D. (1984). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Am J Vet Res.* 45:1532-1534.
- 12) Brown, C.C., Olander, HJ. (1987). Caseous Lymphadenitis of Goat and Sheep: A Review. *Veterinary Bulletin.*57:1-12.
- 13) Burrell D.H. (1980).Caseous Lymphadenitis In Goats. *Aust. Vet. J.* 57:105-110.
- 14) Carrillo G., Ortega S., Hernandez S., (2005). Prevalencia de Linfadenitis caseosa en hatos caprinos de la Comarca Lagunera de Durango, *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 4 51-56
- 15) Cetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin R., De Baere, T., Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiol.* 88:75-83.
- 16) Corona T.R. *et al* Evaluación de dos pruebas de diagnóstico para Linfadenitis Caseosa en ovinos utilizando tres métodos de obtención de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (2011) FESC-UNAM, Tesis de licenciatura
- 17) Costa, M.P., McCulloch, J.A., Almeida, S.S., Dorella, F.A., Fonseca, C.T., Oliveira, D.M., Teixeira, M.F.S., Laskowska, E., *et al.* (2011). 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 Not* 4: 243.
- 18) Chehuquepán F.; Rios M.; Abalos P.; Retamal P. (2008). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Una breve actualización. *Depto de Med. Prev. Animal*

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Av. Cs. Vet.
Vol. 23 p 30-34

19) Chirino C., Scaramelli, A., Rey C. (2006) Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks vol 20:12 .

20) Cubero P., et al (2002) Estrategias de Policía sanitaria en Linfadenitis Caseosa Ovis 78, Enero

21) Crowther, J.R. 2001 The ELISA guidebook. Methods in molecular biology; Vol. 149.USA: Humana press; 1 - 8; 45 - 82.

22) Delgado Duno A., Zárraga J. Chirino-Zárraga, C.I, Carrero Portillo, L.L. (2015) Caracterización epidemiológica de la Linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Praguana, Venezuela.Rev. Med. Vet. 31: 35-45

23) De Rose R, Tennent J., Mcwaters P., Chaplin P.J, Wood P.R, Et Al. (2002). Efficacy Of DNA Vaccination By Different Routes Of Immunisation In Sheep. Vet Immunol Immunopathol 90: 55-63.

24) Dorella, F.A.; Pacheco, L.G.C.; Miyoshi, A.; Azevedo, (2006). V.;*Corynebacterium pseudotuberculosis* microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet.Res. v. 37, p 201-218.

25) Dorella, F.A, Pacheco, L.G.C,Seyffert,N.,Portela,R.W.,Miyoshi, A., Azevedo, V.(2009)Antigensof *Corynebacterium pseudotuberculosis* ad prospects for vaccine development. Exp Rev Vaccines, 8, 205-213.

26) Dorneles, E.M.S., Santana, J.A., Ribeiro, D., Dorella, F.A., Guimaraes, A.S., Moawad, M.S., Selim, S.A., Garaldi, A.L.M., Miyoshi, A., Ribeiro, M.G., Gouveia, A.M.G., Azevedo, V., Heinemann, M.B., Lage, A.P. (2014). Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. PLoS One 9(6): e98758. doi:10.1371/journal.pone.0098758

- 27) Eggleton D.G, Middleton H.D, Doidge C.V, Minty D.W. (1991). immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. Aust Vet J 68: 317-319.
- 28) El-Enbaawy M.I, Saad M.M, Selim S.A. (2005). Humoral and cellular immun responses of a murine model against *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Antigens. Egypt J Immunol 12:13-19.
- 29) Ellis, J.A. (1988). Immunophenotype of pulmonary cellular infiltrates in sheep with visceral caseous lymphadenitis. Vet Pathol. 23: 362-368.
- 30) Erganis O., Hadimli H.H., Kav K., Sakmanoglu A., Sayin Z., Pinarkara Y. (2013). Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Eurasian J Vet Sci.
- 31) Esteveao & Gallardo, *et al* (2006). Actualización sobre Linfadenitis Caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. depto. bioquímica, Fac. Ciencias Naturales. Universidad Nacional De La Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. Departamento de zoonosis, secretaría de salud de la provincia de Chubut, Sarmiento, Chubut, Argentina Veterinaria Argentina, 23 (224):258-278.
- 32) Esteveao, B. Gallardo A., Ábalos, A., Dias, Y., Alvarez, L., Callejo, R., Prieto, M., Jodor, N., Jensen, (2007) Diagnostico de *pseudotuberculosis* en ovinos patagónicos, Revista Argentina de Microbiología, 39:44-46 ISSN 0325-7541,
- 33) Esteveao B.; Gallardo S.G.; *et al* (2009). *Corynebacterium pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revisión de casos, Rev. Electron. Vet. vol. 10 p 13-14
- 34) FAO (2013).<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/>
- 35) Figueiredo, C.N. (2012). Desenvolvimento de ensaio imunoenzimatico (ELISA) indireto na detecção de anticorpos anti *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tesis de doctorado, Universidad de São Paulo, Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, departamento de clínica medica.

- 36) González, C.; Jorge, M.C.; Zeballos, H.; West, M.; Mateos, E.; Yotti, C. (1991). Actualización y estudio de situación de la Linfadenitis caseosa de los lanares en el partido de Tandil. *Veterinaria Argentina*.3 (75):304-310.
- 37) Guimaraes A., Borges F., Barbosa R. P., Seyffert N., Ribeiro D., Pereyra A. L., Heinemann M. B., Miyoshi A., Azevedo M., Guimaraes A.M. (2011). Caseous Lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and Control. *The IIAOB Journal India*, Vol 2 p 33-43
- 38) Hernandez, F. (2015). *Caracterización mololecular de Corynebacterium pseudotuberculosis aislados de muestras de casos clínicos de linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos*. Tesis de Maestría, FMVZ., Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México
- 39) Hodgson, A.L.M., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, L.A., *et al.* (1999). A Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *J Bacteriol* 17: 802-808.
- 40) Hodgson A.L.M, Krywult J., Corner L.A., Rothel J.S., Radford A.J. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect Immun* 60: 2900-2905.
- 41) Hodgson, A.L., Bird P., Nisbet, L.T. (1990). cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia Coli* of the phospholipase d gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 172: 1256-1261.
- 42) Homme, J., Devriese, LA., Vaneechoutte, M., Riegel, P., Butaye, P., Haesebrouck.F (1999). Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbioj*.37:954-957
- 43) Irwin, M.R., Knight, H.D. (1975). Enhanced resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in levamisole-treated mice.*Infect Immun*. 12:1098-1103.

- 44) Jones, D., Collins, MD. (1986). Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Smeath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore:1261–1282.
- 45) Kaba, J., Kutschke, I., Gerlach, GF. (2001). Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. Vet. Microbio. 78(2)155-63.
- 46) Khamis, A., Raoult, D., La Scola, B. (2005). Comparison between *rpoB* and 16S *rRNA* gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium* J. Clin. Microbiol.. 43:1934–1936.
- 47) Langenegger Charlotte H.; Langenegger J.; Scherer P.O. 1991. Prevalencia e diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos do estado do Rio de Janeiro. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 7: 1/2, 1-7.
- 48) Llambí S., García C.B. y Arruga M.V., (2006). Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Área Genética. Facultad de Veterinaria. Montevideo-Uruguay, Albéitar: publicación veterinaria independiente, Nº. 93, 2006, pags. 32-35
- 49) Leardini, N., Prieto, M., Martínez, C., Aguerre I, Loaysa R. (2002). Infecciones por Bacilos Gram positivos aeróbicos, corinebacterias, bacillus y actinomycetes. en curso a.n.i.i.s. "dr carlos malbrán. departamento de bacteriología, servicio de bacteriología especial.
- 50) León, V., Garrido, F., Gonzalez, Candela., Cubero, M., Pablo, MJ. (2002b). Anatomía patológica de la *pseudotuberculosis*. Rev. Ovis, [Http/ Wwww.Exopol.Com/Circulares/205.Htmi](http://www.Exopol.Com/Circulares/205.Htmi)
- 51) Leoncio, P. Julio Zambrano, Elizabeth Boggiano, Marinés Vera, Lilia Carrero y Carmen Chirino-Zárraga (2016). Linfadenitis Caseosa en rebaños ovinos de la península de Paraguaná, municipio Falcón, estado Falcón, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXVI, Nº 1, 5-12

- 52) Lopes, Bastos B., Wagner, R., Dias, P., Dorella, FA., Ribeiro, D., Seyffert, N., Castro, TLP., Miyoshi, A., Costa, S., Meyer, R., Azevedo, V., (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological responses in animal models and zoonotic potential. J Clin Cell Immunol, S4.
- 53) Magdy, H., Al-Gaabary, Salama A., Osman, Atef F. Oreiby (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies Small Ruminant Research 87, 116–121.
- 54) Martin W. B. y Aitken I. D. (2002). Enfermedades de la oveja. 2 ed. Editorial Acribia.
- 55) Menzies, P.I., Muckle, CA. (1989). The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. Can. J. Vet. Res. 53(3):313-318.
- 56) Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad, Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (2013)
- 57) Middleton, MJ.; Epstein, VM.; Gregory, GG. (1991). Caseous lymphadenitis on Flinder Island: prevalence and management surveys. Australian Veterinary Journal. 68(9):311-312.
- 58) Muge, G.R..S., Veras, AAO., de Sá, P.H.C.G., Cavalcante, A.L.Q., Alves, J.T.C., Morais, E., Silva, AGM., Guimarães, L.C., Azevedo, V., Folador, A.R.C., Silva, A., Ramos, R.T.J. (2016). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain PA02 isolated from an ovine host in the Amazon. Genome Announc 4(4):e00838-16.
- 59) Mújgan *et al.*, (2010). Studies on vaccine development for ovine caseous lymphadenitis. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 57: 161-165

60) OCDE/FAO,. (2013). OCDE-FAO Agricultural Outlook 2013-2022, OCDE/FAO 2013 http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2013-es

61) Ortiz A.G. (2015). Tesis de licenciatura: Producción de una Bacterina inactivada contra Linfadenitis Caseosa y la evaluación de la protección en ovinos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

62) Oliveira, A., Teixeira, P., Azevedo, M., Jamal, S.B., Tiwari, S., Almeida, S., Silva, A., Barh, D., Dorneles, E.M.S., Haas, D.J., Heinemann, M.B., Ghosh, P., Pereira, A., Figueiredo, H., Ferreira, R.S., Azevedo, V. (2016). *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under anagenesis and biovar *Equi* forms biovar *Ovis*: a phylogenetic inference from sequence and structural analysis. BMC Microbiol. 16:100

63) O'Reilly K.M., Medley G.F. Green L.E. (2010). The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. Prev. Vet. Med. 95 (2010) 115–126

64) Pacheco, L.G.C., Pena, R.R., Thiago, L.P., Dorella, F.A., Bahia, R.C., Marcilio, MC., Frota, N.L., Oliveira, S.C., Meyer, R., Alves, SF., Miyoshi A., Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. J. Med. Microbiol. 56:480–486.

65) Paton, M.W., Rose, I.R., Hart, RA., Sutherland, S.S., Mercy, A.R., Ellis, T.M., *et al.* (1994). New Infection With *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Reduces Wool Production. Aust Vet J 1994. 71: 47-9.

66) Paule, B.J.A., Azevedo, V., Regis, LF., Carminati, R., Bahia, R., *et al.* (2003). 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* 96: 129-139.

67) Peel M.M., Palmer, G.G., Stacpoole, A.M., Kerr, T.G. (1997). Human Lymphadenitis Due To *Corynebacterium Pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis.* 24:185–191.

68) Pépin, M.; Pardon, P.; Marly, J.; Lantier, F. (1988). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in external ear. *Am J Vet Res* 49 (4):459- 63.

69) Pinho J.M.R., Dorella FA, Coelho S, Fonseca CT, Cardoso FC, Et Al. (2009). Heat-Shock Protein (Hsp)-60 Is Able To Induce An Immune Response In Mice, But Fails To Confer Protection Against Infection. *Open Vet Sci J* 3: 22-27.

70) Pinochet V. (1992). Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Monografías de Medicina Veterinaria. vol. 14 No. 1

71) Pinto, AC., Caracciolo, PH., Gomes de Sá, R., Ramos, TJ., Barbosa, S., P Melo Barbosa, H., Ribeiro, AC., Silva, WM., Rocha, FS., Santana, MS., Castro, TLP., Miyoshi, A., Schneider, M., Silva, S., Azevedo, V., 2014. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics.* 15–14.

72) Piontkowski M.D., Shivers D.W. (1998). Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* For Use In Sheep. *J am preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenitis caseosa. Pesq Agropec Bras* 26: 461-465.

73) Rebouças M.F, Portela R.W, Lima D.D, Loureiro D., Bastos B.L, *et al.* (2011). *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* 23: 213-220.

- 74) Romanenko E.E., Baturu A.P., Mokronosova M.A., Tarasova G.D., Sergeev A.V. (2003). Microflora of the nasal mucosa in allergic perennial and infectious rhinitis. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 3: 66-71.
- 75) Rios C.M.A. (2010). Descripción fenotípica y genotípica de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aisladas desde caprinos y equinos en Chile. Universidad de Chile, Escuela de Ciencias Veterinarias, Departamento de Medicina Preventiva Memoria para optar al título de Médico Veterinario p 16
- 76) Ruiz, L., Jerónimo, R.; Barrera Valle, M.; Frias, MT. (2007). Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. RECVET. 2 (8).
- 77) Ruiz L.; Jeronimo R.; BARRERAV.M. ; FRIAS M.T. (2008). Linfadenitis caseosa II: Diagnostico, control y aspectos epizootiológicos Rev. Vet. vol III p 11-12
- 78) Santana-Jorge, K.T.O., Santos, TM., Tartaglia, N.R., Aguiar, E.L., Souza, R.F.S., Mariutti, R.B., Eberle, R.J., Arni, R.K., Portela, R.W., Meyer, R., Azevedo, V. (2016). *Putative virulence factors of Corynebacterium pseudotuberculosis FRC41: vaccine potential and protein expression.* Microb Cell Fact. 15:83.
- 79) SIAP-SAGARPA (2015). WWW.siap.gob.mx/ganaderia
- 80) SIAP-SAGARPA (2013) WWW.siap.gob.mx/ganaderia
- 81) Siel D., Vidal S., Sáenz L., (2014) Principales sistemas de entrega de Antígenos en Medicina Veterinaria y Humana, Rev Av Cien Vet, Vol 29, No.1
- 82) Singer, GJ., Beckenbach, K., Marshall, M., Olson, GB., Kelley, L. (1988). Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am J Vet Res. 49: 223-226.
- 83) Simmons CP, Dunstan SJ, Tachedjian M, Krywult J, Hodgson ALM, Et Al. (1998). Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* In Sheep. Infect Immun 66: 474-479.

- 84) Solanet J.J., Malena, R., Estein, S.M., Estevao, S.G., Paolicchi, F.A. (2011). *Desarrollo de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en carneros vacunados o infectados con Corynebacterium pseudotuberculosis*. Rev Argent Microbiol 43: 9-17.
- 85) Stanford K., Brogden K.A., McClelland L.A., Kozub, G.C., Audibert F (1998). The incidence of Caseous Lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. Can J Vet Res 1: 38-43.
- 86) Szwaco A., Ortiz N., Lopez D. (2014). Prevalencia de Linfadenitis Caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) en caprinos de establecimientos lecheros del Departamento Central-Paraguay, Universidad Nacional de la Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Compendio de Ciencias Veterinarias p 24-29
- 87) Tadich, N.; C. Alvarez ; T. Chacon ; H. Godoy (2005). "Linfadenitis caseosa (LAC) en ovinos en la XI región, Chile" Arch. Med. Vet 37 p 161-167
- 88) Tizard I., (2009) Introducción a la Inmunología Veterinaria, 8a ed. Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, Texas.
- 89) Urquiza P.M. (2006). Establecimiento de una prueba de ELISA para el Diagnóstico de Linfadenitis Caseosa en cabras. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlan UNAM.
- 90) Unión Nacional de Ovinocultores (UNO) (2015).
- 91) Valdivia J.D.Z. (2015), Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Tesis doctoral, Universidad de las Palmas de la Gran Canaria, Instituto de salud animal y seguridad alimentaria.
- 92) Vay, CM., Almuzara (2002). Actualización en bacilos Gram positivos, taxonomía, identificación e importancia clínica. En II Simposio de infectología y Microbiología Clínica.

- 93) Villalonga D.V. (2013). Estudio de la etiología e impacto económico de los decomisos de un matadero de ovinos. Tesis Doctoral Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Depto de Medicina y Sanidad Animal p 51- 60
- 94) Wenger I. (2002). Sheep Canada Quartely Magazine vol 28:2.
- 95) Walker J., Jackson I.H.J, Eggleton D.G., Meeusen E.N.T., Wilson M.J. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* That protects sheep against caseous lymphadenitis. Infect Immun 62: 2562-2567.
- 96) Windsor P.A. (2011). Control de Caseous Lymphadenitis. Farm Animal and Veterinary Public Health Group, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 425 Werombi Road, Camden, New South Wales 2570, Australia p193-202
- 97) Williamson, LH. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.17:359–371.
- 98) Zeru, F., Kahsay, A. (2014). *Caseous lymphadenitis in goats from Borena Range Land South Ethiopia slaughtered at Luna Export Abattoir*. J Vet Med Anim Health. 6(6): 168-173

Anexo1. Constantes fisiológicas tomadas durante el experimento

GRUPO	NUMERO	TEMPERATURA C° (día del evento)					PESO kg		
		Inicial	Vac 1 +1 día	Vac 2 +1 día	Desafío +1 día	Final	Inicial	Final	GP
1 VACUNADO	88	39.5	38.4	40.6	38.6	38.7	26.5	26	-0.5
	99	38.8	38.6	39.7	39.3	38.4	19.5	27.5	8
	87	39.1	38.6	39.6	38.6	38.5	14	22.5	8.5
	45	39.3	39.3	39.9	39.2	38.9	18	23	5
Promedio		39.1	38.7	39.9	38.9	38.6	19.5	24.7	5.2
2 VACUNADO Y DESAFIADO	95	38.3	38.5	39.6	38.8	32.7	9	7.5	-2.5
	98	39	38.8	39.4	39.6	38.4	13	21	7
	97	38.6	38.9	39.9	39.6	39	18	26	6
	90	37.9	38.9	39.0	40.1	38.6	12	20	8
Promedio		38.4	38.7	39.4	39.5	37.1	13	18.6	5.6
3 DESAFIADO	89	39.3	38.7	39.0	40.2	39.4	24	34	10
	96	39.2	38.6	39.4	39.6	39.3	13	14.5	1.4
	94	37.9	39.4	38.8	39.6	39.3	11	9	-2
	92	38.8	38.9	39.5	39.8	39.7	11	21.5	10.5
Promedio		38.8	38.9	39.1	39.8	39.4	14.75	19.7	5
4 CONTROL	4	39	39.3	39.6	39.5	39	30	32	2
	3	39.2	39.7	39.8	39.6	39.3	43	50	7
	2	39.3	39.4	39.5	39.6	39.1	34	40	1
	1	39.5	39.1	39.7	39.1	39	40	49	4
Promedio		39.2	39.4	39.6	39.4	39.2	36.7	42.7	6

Anexo 2. Resolución de la Comisión Revisora de Proyectos del Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.



PARA:	Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez Responsable de Proyecto
DE:	Comisión Revisora de Proyecto COByBA - FMVZ
FECHA:	13/12/2016

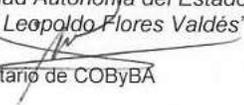
Con el envío de un cordial saludo, la Comisión Revisora de Proyecto del Comité de Bioética y Bienestar Animal de la FMVZ, emite el dictamen correspondiente a la revisión del protocolo del proyecto de investigación "**Identificación de genes de patogenicidad de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y desarrollo de una bacterina multicomponente**", con registro 3806/2014/CIA, bajo la responsabilidad del Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez.

Observaciones y Comentarios

El proyecto corresponde a un desafío controlado de una bacterina en modelo animal ovino; por la naturaleza del experimento, se recomienda ofrezcan un enriquecimiento ambiental y de confort a los animales en experimentación; y se invita a cumplir lo planteado en el protocolo en armonía con los lineamientos de ética y bienestar animal.

Dictamen:
Aceptado.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes.

ATENTAMENTE
"PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO"
"2016, Año de la Universidad Autónoma del Estado de México"
"2016, Año de Leopoldo Flores Valdés"

Secretario de COByBA

c.c.p. Los H.H. Consejo Académico y de Gobierno de la FMVZ
Archivo
/fsg*****

