

57
28



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLÁN"

**OBTENCION DE TOXINA A PARTIR DEL
AISLAMIENTO DE CORYNEBACTERIUM OVIS**

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a :

Severo Margarito Navarrete García

asesor: **m. v. z. susana garcía vázquez**

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página.
RESUMEN	2
I.- INTRODUCCION	3
1.- Generalidades	3
2.- Taxonomía de las Corinebacterias	10
3.- Linfadenitis Caseosa	12
a) Etiología	13
b) Hospederos y Distribución Geográfica	16
c) Transmisión	18
d) Patogenia	19
e) Manifestaciones Clínicas	25
f) Hallazgos Patológicos	27
g) Inmunidad	34
h) Diagnóstico	38
i) Tratamiento	43
j) Prevención	46
k) Control	48
II.- OBJETIVOS	50
III.- MATERIAL Y METODOS	51
IV.- RESULTADOS	67
V.- DISCUSION	72
VI.- CONCLUSIONES	74
VII.- BIBLIOGRAFIA	76

R E S U M E N

De las enfermedades infecciosas que afectan a los pequeños rumiantes, la Linfadenitis Caseosa tiene importancia relevante, ya que está considerada como una de las principales enfermedades que encabezan las causas de pérdidas económicas en la industria pecuaria de México. Sin embargo, todavía se desconocen varios aspectos en cuanto a los mecanismos de patogenidad del agente etiológico y métodos de diagnóstico eficientes, por lo que ésta investigación se encaminó hacia la obtención de la toxina de Corynebacterium ovis y evaluar su actividad en un sistema "invitro".

Para culminar nuestro estudio, que puede ser el prelude de otras investigaciones, encaminadas a esclarecer las dudas que se tienen respecto a dicho padecimiento, se cubrieron los objetivos fijados: se llevó a cabo el aislamiento e identificación del microorganismo Corynebacterium ovis agente causal de la Linfadenitis Caseosa y se obtuvo la toxina a partir del cultivo de la bacteria en un medio líquido, además de la realización de ensayos hemolíticos empleado eritrocitos de diferentes especies animales.

I. INTRODUCCION

1.- Generalidades.

México cuenta con grandes extensiones territoriales favorables para la cría de ovinos y caprinos, debido a que el 65% del territorio nacional (en sus zonas árida, semiárida, tropical seca y templada) está provisto de pastizales naturales, ciertas leguminosas y vegetación xerófila, constituyendo un área propicia para la explotación de estas especies; se cuenta también con la disponibilidad de gran cantidad de esquilmos agrícolas y una gran variedad de subproductos industriales, que con un mínimo procesamiento pueden ser utilizados en la alimentación complementaria de dichas especies. Es por eso que los ovinos y caprinos deberían jugar un papel muy importante en el aprovechamiento pecuario de esas vastas regiones que por sus características ecológicas son sólo aptas para estas especies. Sin embargo su explotación se ha estancado en las últimas décadas tanto en su número como en sus índices productivos a consecuencia de complejas situaciones socio-económicas y político-tecnológicas que han determinado que la mayor parte de este ganado se encuentre agrupado en pequeños hatos que pertenecen en su mayoría a los sectores marginados del campesinado, los cuales no tienen posibilidad de incorporar tecnologías sofisticadas y la tenencia de los pequeños ruminantes constituye una forma de ahorro familiar, sin pretensiones de alcanzar niveles importantes de productividad y rentabilidad en el hato (Pijoan y Tórtora, 1985; Vázquez, 1986).

En México, al igual que en otros países, se destinan a los ovinos y los caprinos los pastizales o agostaderos que los bovinos no pueden aprovechar o que ya han sido intensamente utilizados por éstos, en estas condiciones los animales pasan la mayor parte del día en búsqueda de alimentos. Por la noche, a diferencia de lo que ocurre en otras latitudes, los animales son encerrados en corrales reducidos, en condiciones de hacinamiento y pésima higiene. De esta forma se combinan los peores elementos de una explotación extensiva en pastizales pobres, con grandes carencias nutricionales cualitativas y cuantitativas, que se agravan en los periodos de sequía; con los severos problemas sanitarios presentes en las explotaciones intensivas, donde el hacinamiento, la falta de higiene y las construcciones inadecuadas, favorecen la transmisión y permanencia de los agentes infecciosos.

Esta combinación de animales mal nutridos que no pueden establecer una respuesta inmune adecuada, con un ambiente sobrecontaminado, resulta en cuadros "explosivos" de las distintas enfermedades, con graves pérdidas de condición y muerte en los hatos (Pijoan y Tórtora, 1985).

La especie ovina tiene una gran importancia por su potencial en producir carne, lana, leche, pieles, lanolina, etc. Sin embargo el desarrollo de la ovinocultura del país ha sufrido un estancamiento muy marcado en las últimas décadas, estimándose un promedio de 5 mi-

llones de ovinos con tendencia a decrecer (García, 1980; Sastre, 1985; Arbiza, 1986).

Según el censo agrícola y ganadero (SARH, 1983) la disminución anual promedio de ovinos es de 1.096% (Enguilo, 1985).

La subsecretaría de ganadería (SARH) por medio del Instituto Nacional de Ovinos y Lanas (INOL) realiza un Programa Nacional de Repoblación de Ganado Ovino (PRONARECO) que tiene como objetivos abastecer el mercado nacional de productos ovinos, la utilización de tierras improductivas y el dar empleo permanente a la población rural que se dedica a esta actividad (Sastre, 1985).

En la actualidad los ovinos contribuyen con el 1.2% del valor total de la producción pecuaria, dentro de los cuales el 0.8% es el de la carne, el 0.3% es el de lana y el 0.1% de subproductos principalmente pieles. La carne y lana ovina en México son obtenidas de animales criollos en un 90% y la producción nacional es insuficiente (Arbiza, 1986; Estrada, 1986).

La evolución de los ovinos durante 44 de los últimos años, según la Dirección General de Extensión Agrícola de la SARH, es como sigue: (cuadro 1).

Cuadro No. 1
POBLACION Y PRODUCCION LANAR (1940 - 1983)

AÑO	No. DE CABEZAS
1940 a 1944	4 866 110
1945 a 1949	6 268 559
1950 a 1954	5 453 633
1955 a 1959	5 587 744
1960 a 1964	5 863 329
1965 a 1969	5 419 456
1970 a 1974	4 483 233
1975 a 1979	4 858 658
1980	4 916 219
1981	4 954 994
1982	4 997 624
1983	5 044 145

Fuente DGEA Econotecnia Agrícola Vol. 11, No. 10 (Estrada, 1986).

El desarrollo que ha tenido el ganado caprino, tampoco corresponde a la importancia que representa para el país esta especie ya que puede ser la principal alternativa para aquellas zonas del país que por sus condiciones climáticas, topográficas y calidad de sus suelos no son aptas para la agricultura o para otro tipo de explotación. En México se le explota bajo niveles de subsistencia en zonas donde predomina la pobreza, debido a la habilidad que tiene la cabra para sobrevivir y producir bajo condiciones climáticas y de manejo desfavorables (García, 1980; Montiel y Vargas, 1985; Arbiza, 1986).

De acuerdo con cifras proporcionadas por la Secretaría de Industria y Comercio, las cabras ocupan el tercer lugar del inventario zootécnico nacional, tras los bovinos, con 28,186,298 y los porcinos con 12,186,298 y aunque en la década de los setentas se estimaba una baja anual del 0.5%, DCEA (SARH) de 1980 a 1982 demuestra en sus estadísticas que la población ya se está incrementando paulatinamente, registrando 9,121,655 cabezas (1970), 9,638,000 (1980) y 10,289,754 (1982). (Montiel y Vargas, 1985; Arbiza, 1986).

Para satisfacer la demanda de ganado ovino y caprino destinados al abasto y para ajustar programas de mejoramiento genético, México se ha visto en la necesidad de importar ganado de los Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Nueva Zelanda y Australia, afectando la economía del país por la fuga de divisas, y por otro lado, el riesgo de introducir agentes patógenos que ponen en peligro la salud de la depopulada población nacional de pequeños rumiantes en los rebaños que están destinados a la cría y mejoramiento genético de la población ganadera del país, produciendo mermas en la industria pecuaria al ocasionar pérdidas de peso e incrementar gastos por tratamiento y mano de obra (Vázquez, 1986).

Existen pocos estudios sobre las principales enfermedades que afectan a los ovinos y caprinos del país, sin embargo los escasos datos recopilados de las regiones norte y centro del país, sitúan a la Linfadenitis Caseosa (reportada en Guanajuato desde 1965) como una

de las principales enfermedades con alta prevalencia en esas zonas, que ocasionan grandes pérdidas por morbilidad y mortalidad del ganado (García, 1980; Ramírez, 1987).

La mayoría de los ovinos sacrificados en el rastro de Ferrería son de importación y los caprinos casi no se importan porque el país cuenta con suficiente población para cubrir las demandas de la población y la mayoría de estos caprinos provienen de varias entidades de la República principalmente de San Luis Potosí, Zacatecas, Aguascalientes, Puebla, Hidalgo y Edo. de México.

Los ovinos provenientes de Estados Unidos son animales de desecho y los que provienen de Nueva Zelanda llegan ya procesados y en canal congelada. Las canales que ahí se expenden, son destinadas a la elaboración de platillos típicos (Vázquez, 1986).

Según registros de Inspección Sanitaria de la Secretaría de Salud en Industrial de Abastos durante el período 1982-1985, la causa más importante de decomisos fué por Linfadenitis Caseosa, encontrándose que en el caso de canales es del 80%, fracciones de canal 94-98%, Cabezas 99% y vísceras 71%. A continuación se enlistan las diez principales causas de decomiso en canales y vísceras en la Industrial de Abastos: (cuadro 2).

Cuadro No. 2

PRINCIPALES CAUSAS DE DECOMISO EN LA INDUSTRIAL DE ABASTOS:

Canales	Visceras
1.- Linfadenitis	1.- Linfadenitis
2.- Abscesos	2.- Abscesos
3.- Ictericia	3.- Quistes Parasitarios
4.- Congestión	4.- Fasciolosis
5.- Septicemia	5.- Congestión
6.- Traumatismos	6.- Neumonía
7.- Rigor mortis	7.- Parasitosis
8.- Contusiones	8.- Cirrosis
9.- Putrefacción	9.- Peritonitis
10.- Tuberculosis	10.- Taeniasis

(Vázquez, 1986).

Con las observaciones anteriores se puede detectar que la enfermedad tiene una alta incidencia y es por demás resaltable la importancia que este padecimiento representa para la economía pecuaria nacional, haciéndose notar que es urgente realizar investigaciones encaminadas al conocimiento de la enfermedad y establecer medidas de prevención y control.

2.- Taxonomía de las Corinebacterias.

Las corinebacterias han presentado problemas en cuanto a su taxonomía y clasificación. Los términos "corineforme" o "difteroide" fueron muy utilizados para describir a los organismos que constituyen al género Corynebacterium. Las Corinebacterias (del griego: coryne = porra o maza y bacterion = bastoncito) son bacilos Gram positivos que presentan dilataciones irregulares características en uno de sus polos, lo cual les da una apariencia de maza; son pleomórficos y tienen a agruparse en "empalizada" o "letras chinas", no esporulan ni tienen flagelos, son aerobios y anaerobios facultativos, son fermentativos y catalasa positivos. Cerca de los polos se encuentran con frecuencia gránulos metacromáticos, los cuales se tiñen intensamente con colorantes de anilina, dando al bacilo una apariencia de rosario (García, 1980; Hagan y Bruner, 1983; Jawetz, 1983; Davis y Dulbecco, 1985).

En base a constituyentes moleculares, los taxonomistas indican que estos microorganismos parecen estar relacionados con las Micobacterias y Nocardias, ya que los antígenos principales de la pared celular de estos tres géneros se hallan íntimamente relacionados, tanto desde el punto de vista químico como serológico. Las Corinebacterias contienen en sus paredes celulares alto contenido de lípidos, principalmente ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena ramificada muy larga) algo más pequeños que los de las Micobacterias (Davis y Dulbecco, 1985; Ramírez, 1987).

Actualmente los microbiólogos sugieren que la composición de la pared celular es una base más sólida para la clasificación. De acuerdo a esto podemos mencionar que hay una estrecha correlación entre los azúcares, lípidos y antígenos de las Corinebacterias, las Micobacterias y las Nocardias. Usando este criterio es válido incluir dentro del género Corynebacterium a las siguientes especies: C. diphtheriae, C. bovis, C. equi, C. pseudotuberculosis (C. ovis) y C. renale. Por otra parte, C. pyogenes y C. hemoliticus, aunque son pleonórficos, tienen características bioquímicas y componentes estructurales diferentes y comparten un antígeno de pared con los estreptococos del grupo G de Lancefield. Por estas razones se ha sugerido que estas dos especies patógenas deben reclasificarse (Hagan y Bruner, 1983).

En el cuadro 3 se encuentran resumidas las principales características bioquímicas de algunas especies del género Corynebacterium que afectan a los animales y al hombre; se trata de una recopilación de aquellas que han sido propuestas como las más importantes en la diferenciación de las especies según el criterio de diferentes autores (Cowan y Steel, 1979; García, 1980; Hagan y Bruner, 1983; Carter, 1980).

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES
DE CORYNEBACTERIUM

MODIFICADO DE:

- CARTER
- COWAN Y STEEL
- GARCIA
- HARARY Y BRUNNER

CARACTERISTICA	C. pseudotuberculosis (Covata)	C. pyogenes	C. equi	C. renale	C. bovis	C. sialae	C. diphtheriae	C. haemolyticum	C. kutscheri
Hemólisis	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Producción de Catalasa	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Leche Tornasol	-	+	-	+	V	+	-	+	-
Granulos metacromáticos	+	-	-	+	-	-	V	V	?
Oxido / Fermentación	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Reducción de Nitrato	V*	-	+	V	-	-	+	-	+
Licuefacción de Gelatina	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Producción de Ureasa	+	-	+	+	V	+	-	-	+
Rojo de Metilo	-	-	?	?	?	?	?	?	?
Voges Proskauer	-	-	-	V	-	-	-	-	-
Arginina	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Acido a partir de glucosa	+	+	-	+	+	+	+	+	+
" " Lactosa	+	+	-	V	-	-	-	+	-
" " Maltosa	+	+	-	-	+	+	+	+	+
" " Sucrosa	V	-	-	-	-	+	-	+	+
" " Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" " Almidón	+	+	-	V	-	+	V	V	?
" " Xilosa	-	+	-	-	-	-	-	-	?
" " Salicil	-	-	?	-	?	?	-	-	?
" " Trehalosa	-	-	?	-	?	-	-	-	?

+ = REACCION POSITIVA

- = REACCION NEGATIVA

V = REACCION VARIABLE

* = Las especies de equinos y bovinos(4)

3.- Linfadenitis Caseosa.

Es una enfermedad a la que se le han otorgado diferentes nombres tales como: "Pseudotuberculosis", "Chessy Glands", "Enfermedad de los Abscesos" o "Linfangitis", pero muchos autores han coincidido en denominarla "Linfadenitis Caseosa", la cual es una enfermedad infecto contagiosa de las ovejas y las cabras, que se caracteriza por producir lesiones purulentas de aspecto caseoso a nivel de la piel, ganglios linfáticos y en otros órganos internos como pulmón, hígado, bazo, riñón y corazón (Jubb y Kennedy, 1979; Merck, 1981; Quittet, 1982; Hagan y Bruner, 1983; Smith y Jones, 1983; Blood y Henderson, 1985; Unanian, 1985).

La Linfadenitis Caseosa es un padecimiento crónico con una amplia ocurrencia en ovejas y cabras, caracterizada por provocar un aumento unilateral y lesiones purulentas de aspecto caseoso en los ganglios linfáticos y ocasionalmente en órganos internos, pero tiene escasa repercusión sobre la salud general de los animales, a menos que el padecimiento se generalice; esta enfermedad es detectada generalmente durante la inspección sanitaria post-mortem a nivel de rastro, en donde las canales de los ovinos y caprinos afectadas por abscesos, son decomisadas parcial o totalmente, afectando de esta forma la economía de la industria de la carne a nivel mundial (Hiepe, 1972; Renshaw, 1979; Jensen, 1982; Stoops, 1984; Unanian, 1985).

a) Etiología.

Corynebacterium pseudotuberculosis (C. ovis) es la causa específica de la enfermedad en pequeños rumiantes. Dependen también de este mismo germen la Linfangitis Ulcerosa de los bovinos y equinos, Artritis Supurativa y Contagiosa de los corderos, Orquitis Supurativa de los carneros, el Acné Contagioso de los equinos y Aborto en yeguas, pero éstas nunca se encuentran acompañadas de Linfadenitis Caseosa (Blood y Henderson, 1985; Brown, 1985).

En 1888, Nocard aisló un germen de un bovino que era Corynebacterium pseudotuberculosis. En 1891, Preinsz y Guinard aislaron un organismo similar del riñón de una oveja. Nocard en 1893 observó este germen en el pseudotumor equino. Preinsz en 1894, fué el primero en describir completamente el organismo y observar su parecido con el bacilo diftérico, al mismo tiempo denominó al organismo Bacillus pseudotuberculosis ovis, desde entonces se ha comprobado su intervención en la Linfadenitis Caseosa de las ovejas y cabras (Nelson, 1970; Jubb y Kennedy, 1979; Blood y Henderson, 1985).

El microorganismo fué denominado posteriormente Corynebacterium pseudotuberculosis, también se le ha denominado Corynebacterium ovis o Bacilo de Preinsz-Nocard, el cual ha sido reportado como el agente causal de la Linfadenitis Caseosa y se caracteriza por ser una bacteria cocoide o en forma de bastón filamentosos pequeño -

y pleomórfico; mide de 1 a 3 micrómetros de longitud y de 0.5 a 0.6 μm de ancho pero puede medir hasta 4 a 5 μm ; tiene forma de maza o pera, se tiñe fácilmente pero de modo desigual con tinciones ordinarias como soluciones acuosas de anilina, azul de metileno y por el método de Gram, siendo Gram (+), no es ácido-resistente, no forma esporas, es inmóvil, no capsulado, es aerobio y anaerobio-facultativo, crece adecuadamente a temperatura de 37 °C y a un pH ajustado de 7.0 a 7.2. A menudo se encuentra formando asociaciones características semeñando "letras chinas" o "empalizadas", forman ácido pero no gas a partir de algunos carbohidratos; su crecimiento es más abundante si se le adiciona suero al medio de cultivo (Cowan y Steel, 1979; Hagan y Bruner, 1983; Carter, 1985; Davis y Dulbecco 1985).

En lesiones naturales el organismo es notablemente pleomórfico, pero uniformemente cocoide sobre medios artificiales. En el medio de suero coagulado de Leoffler las colonias son pequeñas, granulares y grisáceas, forman una película con bordes irregulares. En gelosa sangre McLeod conteniendo telurito de potasio, las colonias son desde grisáceas hasta negras debido a que éste es reducido a telurio intracelularmente. Se desarrollan en todos los medios ordinarios, pero en forma escasa; las colonias en gelosa sangre son bastante características, se desarrollan lentamente y no alcanzan el tamaño máximo hasta varios días más tarde (48 a 96 hrs. aproximadamente) cuando son incubadas a la temperatura óptima (37°C), las -

colonias bien desarrolladas presentan centros papiliformes, rodeados de anillos concéntricos friables, paralelos al borde irregular. En el aislamiento primario de las lesiones el crecimiento es escaso, pero en la resiembr a el crecimiento es uniforme y abundante. Los gránulos metacromáticos irregularmente teñidos son más notables en las formas bacilares que cocoides. El color de las colonias es parduzco o blanco amarillento y las superficies son opacas y secas. Al tocarlas con el asa de platino se fragmentan con facilidad, es posible desplazar por la superficie del medio toda una colonia pequeña como si fuera una hojuela de parafina. Las colonias son ligeramente hemolíticas produciendo una hemólisis tipo Beta (Hagan y Bruner, 1983; Jawetz, 1983; Davis y Dulbecco, 1985; Unanian, 1985).

Las cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis tienen la capacidad para fermentar diferentes tipos de carbohidratos y de utilizar una amplia variedad de medios para su desarrollo, fundamentos que han sido adaptados con la finalidad de conocer al microorganismo en base a características fisiológicas y bioquímicas (García, 1980).

La mayoría de las cepas producen ácido pero no gas a partir de la glucosa, fructuosa, maltosa, manosa, sucrosa, xilosa, rafinosa, lactosa, ramosa, inulina, dulcitol, ni el almidón. No produce indol. Este organismo no es proteolítico por lo tanto es gelatina negativo. Crece en leche pero no altera al medio. Es ca-

talasa fuertemente positivo y ureasa positivo (Cowan y Steel, 1979; Carter, 1985).

Las cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis aisladas en abscesos de equinos son bioquímicamente distintas de aquellas originadas de pequeños rumiantes, debido a que consistentemente son capaces de reducir al nitrato; en contraste, las cepas de ovejas y cabras son siempre nitrato-negativo. La separación en dos biotipos se ha hecho en base a esta característica (Brown, 1985; Ramírez, 1987).

b) Hospederos y Distribución Geográfica.

La bacteria es patógena para las ovejas, cabras, caballos, bovinos, venados, perros, conejos, cobayos y ratones, las aves son refractarias. Pero existen diferencias entre las ovejas y las cabras en cuanto a la afección de los nódulos superficiales, apariencias morfológicas de las lesiones y la frecuencia y severidad de la forma visceral (Haberman, 1977; Jubb y Kennedy, 1979; Hagan y Bruner, 1983; Brown, 1985).

Se reporta que está difundida o es esporádica en todas las áreas de crianza ovina y caprina, pero reviste mayor importancia en los rebaños de ganado lanar de los países de Sudamérica (Argentina, Uruguay, Chile, Perú y Brasil), Australia, Nueva Zelanda, Alemania, España, Francia, Italia, Bulgaria, Noruega, Inglaterra,

Africa del Sur, Sudán, Egipto, Irán y las Filipinas. También es frecuente en los Estados Unidos y Canadá e inclusive se presenta en México y algunos otros países en los cuales, no se da la importancia real que merece esta enfermedad (Manninger, 1968; Jubb y Kennedy 1979; Frape, 1981; Unanian, 1985).

La Linfadenitis Caseosa es una de las enfermedades de mayor prevalencia en la generalidad de las poblaciones ovinas y caprinas. Abscesos es el nombre más comúnmente utilizado por los criadores de los rebaños, para designar a este padecimiento, que al producir ese tipo de lesiones en la piel, ganglios linfáticos y órganos internos puede implicar una merma en la producción láctea y la eliminación prematura de algunos animales por amaciación. Además se le ha asociado con el desarrollo del "Síndrome de la Oveja Flaca" y con la afección de la eficiencia reproductiva que frecuentemente acompaña a este desorden (Ashfaq y Campbell, 1979; Williams, 1980; Ellis, 1983; stoops, 1984).

Los cobayos son muy susceptibles a la infección por Corynebacterium pseudotuberculosis, ésta se caracteriza por la producción de abscesos en el hígado, bazo y riñón, evolucionando rápidamente hasta causar la muerte. En estos animales la inyección intraperitoneal de grandes dosis de la bacteria produce una intoxicación rápida y muerte por peritonitis. La inoculación del microorganismo en ratones da por resultado la producción de abscesos caseosos en -

los órganos internos especialmente en hígado, riñones y bazo (Cameron y Buchan, 1966; Lovel y Zaki, 1966; Cameron y Smith, 1970; - - Muckle y Cyles, 1983).

c) Transmisión.

El microorganismo reside en la materia fecal, suelo e intestinos, sobre la piel y órganos infectados especialmente los nódulos linfáticos. La fuente de infección está constituida por las - secreciones procedentes de los ganglios linfáticos fistulizados. - Los factores ambientales predisponentes, así como agujas contaminadas y material quirúrgico utilizado para debridar los abscesos, deben ser considerados en la transmisión de la enfermedad. Actualmente se ha demostrado que existe otra fuente de infección importante - constituida por los líquidos comerciales desinfectantes, que son - aplicados a las ovejas poco antes de la trasquila debido a que la - bacteria tiene la capacidad de sobrevivir por lo menos 24 horas en esos líquidos de inmersión (jensen, 1982; Lund, 1982 a; Blood y - Henderson, 1985).

Corynebacterium ovis es un microorganismo con notable resistencia al medio ambiente, que al contaminar el suelo, pesebres y camas tiene la capacidad de sobrevivir y persistir en el medio por períodos prolongados. Asimismo se conserva en carne congelada, heces y pus, en el glicerol el tiempo de conservación es más duradero. Lo destruyen rápidamente los rayos solares directos, el calentamiento

to a 70°C, los antisépticos y desinfectantes comunes; también una amplia variedad de antibióticos lo inactivan aunque esto sólo sea demostrable "in vitro" (Ashfaq y Campbell, 1979; Hiepe, 1979; Jubb y Kennedy, 1979).

d) Patogenia.

El período de incubación es variable y se relaciona estrechamente con la virulencia de la cepa infectante y la resistencia natural del hospedero. La introducción de un sólo animal afectado en un rebaño libre de la enfermedad da como resultado la aparición de una ola de abscesos en cualquier estación del año durante los dos o tres años siguientes. En la oveja se piensa que la infección ocurre a consecuencia de abrasiones de la piel y lesiones que puede dejar la esquila, descole, castración, mordida de perros ovejeros, instalaciones rústicas con salientes punzantes, colocación de aretes, tatuajes y el cordón umbilical en el recién nacido; pero en el caso de la cabra puede tener mayor importancia el hecho de que se le cría ampliamente en lugares áridos, donde la vegetación arbustiva y espino sa es la dominante y se piensa que los hábitos de ramoneo, característicos de esta especie, la predisponen a sufrir lesiones sobre todo en la cara y el cuello, abriendo vías de acceso para la bacteria. Se ha visto que ovejas de la raza Merino y animales de 3 a 6 años de edad son los más afectados, seguramente por la naturaleza rugosa de la piel de estos animales, dando lugar a ocasionar un mayor número de heridas durante la esquila. Por otro lado no se ha encontrado -

relación al hecho de que, las cabras Angora y Nubia sean las más susceptibles (Nelson, 1970; Jubb y Kennedy, 1979; Williams, 1980; Blood y Henderson, 1985; Brown, 1985).

La enfermedad se ha reportado como rara en las crías, en animales jóvenes se limita a lesiones superficiales, pero se considera que es muy común en los animales adultos. La secuencia de eventos que caracterizan a la Linfadenitis Caseosa se inicia por la penetración de la bacteria a través de una herida, alcanza los vasos linfáticos aferentes y gradualmente produce la extensión de la infección a los nódulos linfáticos regionales, donde continúa su crecimiento y multiplicación. En el tejido linfoide, los leucocitos, especialmente neutrófilos, se aglomeran alrededor de la bacteria, mientras que los fibrocitos y los capilares forman la periferia de la infección. Los metabolitos tóxicos bacterianos, incluyen la exotoxina lisan lenta pero continuamente a los leucocitos y al tejido. La lesión típica, consiste de una masa central de tejido necrótico, limitado por una gruesa pared de tejido conectivo y capilares. La bacteria sin control de la pared, entra a los capilares y forma colonias que ocluyen y trombosan los vasos. La isquemia resultante y la toxinas destruyen las células de la parte interna de la pared de tejido conjuntivo y de este modo se agrega una nueva capa a la masa necrótica. Nuevo tejido conjuntivo prolifera para reforzar la pared. Por este lento proceso repetitivo, sucesivas capas se adicionan a la masa necrótica. Como la bacteria viva es-

capa de la lesión, se extiende continuamente por vía de los vasos - linfáticos aferentes, penetra a otros nódulos a lo largo de la cadena, eventualmente entra a la sangre venosa y se dirige a los pulmones. Los organismos al pasar continuamente a través de los pulmones pueden causar lesiones en cualquier órgano invadido. En un nódulo infectado, la licuefacción de tejido necrótico y la formación de - abscesos resultan de la entrada de neutrófilos y la liberación de - enzimas proteolíticas, junto con la invasión por otras especies de bacterias piogénicas. El tejido conectivo de la pared puede romperse y descargar pus y bacterias a el medio ambiente (Jubb y Kennedy, 1979; Jensen, 1982).

Por lo general, aunque exista supuración, la infección - primaria en las heridas de la piel es controlada espontáneamente - y es poco frecuente que la infección progrese hasta el ganglio linfático. No obstante, una vez localizada en el ganglio, ésta persiste aún cuando el ganglio se rompa y supure hacia la piel. La única asociación significativa que parece existir entre el sexo y la enfermedad es que los machos castrados aparentemente se tornan menos afectados que los machos enteros y las hembras, lo cual puede explicarse por los cambios en el comportamiento social que experimentan después de la castración (Ashfaq y Campbell, 1979).

En la oveja la penetración de la bacteria por una herida - produce la extensión de la infección a los ganglios linfáticos super

ficiales (particularmente preescapulares y precurales), ocasionalmente la enfermedad se torna generalizada y la formación de abscesos ocurre en muchos órganos incluyendo ganglios viscerales (mediastínicos, bronquiales y sublumbar), para posteriormente producir metástasis vía linfógena y hematógena hacia vísceras vitales como pulmón, corteza renal, bazo, hígado, cerebro y médula espinal, lesiones que son más aparentes a la edad avanzada. La forma generalizada o visceral de la enfermedad se asocia a un debilitamiento y emaciación progresiva referido como "Síndrome de la Oveja Flaca". La Linfadenitis Caseosa visceral puede contribuir como debilitante, eliminación prematura y muertes en los animales (Renshaw, 1979; Stoops, 1984).

En la cabra la infección puede ser contraída no sólo a través de heridas en la piel, sino también mediante la ingestión y entrada del organismo por la mucosa bucal; las lesiones en la mucosa, causada ya sea por la dentición y por la masticación de alimentos fibrosos, pueden servir de entrada para la bacteria hacia los nódulos linfáticos. Los nódulos linfáticos superficiales más afectados son los de la cabeza (parotídeos, mandibulares y retrofaríngeos), los del cuello y los preescapulares. Los abscesos superficiales gruesamente encapsulados, pueden permanecer localizados por largos períodos, para después romperse y drenar un líquido blanco o amarillo verdoso con una gran cantidad de bacterias que contaminan directamente a otros animales o en forma indirecta contaminan -

comederos, bebederos y alojamientos. Las bacterias persisten por varios años y se pueden estar eliminando con cierta frecuencia, a través de los abscesos cutáneos y de los ganglios linfáticos. Los abscesos contienen exudado purulento de aspecto caseoso y de color amarillo verdoso sin olor, con el tiempo el pus se convierte en una masa firme y seca que se organiza en capas concéntricas dentro de una cápsula fibrosa. Por lo general la mayoría de los animales se restablecen de los abscesos superficiales pero quedan como portadores y son los responsables de perpetuar la enfermedad (Ayers, 1977; Ashfaq y Campbell, 1979; Renshaw, 1979; Williams, 1980; Ellis, 1983; Stoops, 1984; Brown, 1985).

Corynebacterium pseudotuberculosis (C. ovis) es un parásito intracelular facultativo, su patogenicidad se relaciona con un fenómeno sinérgico en el que se encuentran interactuando: la producción de una exotoxina soluble, termolábil, con características de β hemolisina, sensible al oxígeno y con capacidad para aumentar la permeabilidad vascular; un factor piogénico termolábil asociado al soma bacteriano que atrae fagocitos al sitio de la infección y un lípido de superficie que es leucotóxico. La exotoxina que se localiza en el citoplasma, junto con el lípido de la pared celular son considerados los principales factores de la patogenicidad y de la virulencia. La potente exotoxina es una fosfolipasa D que tiene efectos vasogénicos, sus células blanco son las células endoteliales a nivel de la esfingomielina que constituye a la pared celular del

revestimiento interno de los vasos sanguíneos, la cual al ser disociada causa desorganización de la membrana y lisis celular; esta toxina tiene un efecto facilitador de la dispersión de la bacteria. El factor piogénico es una sustancia adicional existente, resiste los efectos del calor y el formol y puede contribuir a la formación de lesiones locales. La capa de lípido superficial que el microorganismo posee, ha sido propuesta como el principal factor degenerativo, que le imparte resistencia contra enzimas lisosomales permitiéndole sobrevivir y multiplicarse, destruyendo finalmente las células del hospedador tras haber evadido los mecanismos intracelulares destructivos y degradativos de los macrófagos. El porcentaje de lípidos extraíbles de la pared guarda relación estrecha con la patogenicidad de la cepa bacteriana; cuando éstos son inyectados subcutáneamente, producen abscesos estériles, por lo que algunos autores lo han considerado como el factor más importante en la patogénesis de la Linfadenitis Caseosa (Ellis, 1983; Hagan y Bruner, 1983; Tashjian, 1983; Brown, 1985; Hsu, 1985; Ramírez, 1987).

Corynebacterium ovis produce una exotoxina que es letal para cobayos, ratones y en grandes dosis para ovejas y cabras; también presenta actividad demonecrótica para cuyes y conejos; en pequeños rumiantes cuando es inyectada por vía intravenosa produce anemia hemolítica e ictericia. La alta incidencia de la enfermedad en pequeños rumiantes puede deberse a las repetidas exposiciones a la enfermedad o porque los animales una vez que han sido infecta-

tados, raramente eliminan la infección completamente (Shigidi, 1978; Burrell, 1980b; Gall, 1981; Hsu, 1985).

Sé han utilizado roedores de laboratorio como modelo experimental para determinar los efectos de la toxina y su relación con la enfermedad natural en las ovejas y cabras, considerando en la patogénesis que tiene un efecto facilitador de la dispersión de las bacterias a los nódulos linfáticos y hacia otros órganos vitales, por ejercer efectos sobre la esfingomielina de los vasos sanguíneos, aumentando la permeabilidad vascular local en la piel a los lados de los sitios iniciales de la infección, seguida generalmente por la formación secundaria de abscesos en los nódulos linfáticos regionales y a veces en órganos internos (Jolly, 1965; Husband, 1977; Carne, 1978; Muckle, 1983).

Los géneros bacterianos de tipo piogénico que también son frecuentemente aislados de casos de Linfadenitis Caseosa han sido los siguientes: Corynebacterium pyogenes, Staphylococcus spp, Streptococcus spp, Moraxella spp, Pasteurella spp, Pseudomona spp y Mycobacterium spp (Ashfaq y Campbell, 1979; Awad, 1979; Renshaw, 1979; Richard y Fontaine, 1979).

e) Manifestaciones Clínicas.

La enfermedad tiene una evolución subclínica y lenta, los animales se muestran afebriles, con buen apetito y los signos clíni

cos sugestivos de cualquier enfermedad específica pasan inadvertidos en el 90% de los casos y las lesiones son hallazgos incidentales en el examen post-mortem. Sin embargo los animales con emaciación progresiva y con agrandamiento de los ganglios linfáticos explorables se deben considerar como sospechosos de la enfermedad. Además se ha podido observar que los animales afectados experimentan una pérdida de peso considerable en comparación con los no afectados (Pijoan, 1985; Unanian, 1985; Arbiza, 1986).

Seguido a un período de incubación prolongado, los nódulos linfáticos superficiales infectados, especialmente el preescapular, precural y poplíteo, se encuentran alargados unilateralmente y des cargan pus en la lana o el pelo según la especie afectada. Conforme avanza la enfermedad, los animales desarrollan emaciación, pueden tener trastornos respiratorios y metabólicos. La morbilidad en el rebaño alcanza rangos superiores al 15% siendo en su mayoría animales de 4 a 5 años de edad (Jensen, 1982; Blood y Henderson, 1985).

Observaciones clínicas indican que las infecciones de Corynebacterium pseudotuberculosis causan la muerte rápida en corde ros y cabritos con signos clínicos indicativos de enfermedad tóxi génica, raramente se llega a presentar poliartritis con recupera ción instantánea. Se cree que los animales adquieren la enfermedad durante su primer año de vida (Jubb y Kennedy, 1979; Lund, 1982a; Hsu, 1985).

Ovejas gestantes inoculadas experimentalmente en la segunda mitad de la gestación, con Corynebacterium pseudotuberculosis por vía endovenosa, llegan a presentar aborto y metritis. El microorganismo puede ser aislado de los diferentes fluidos y tejidos de los productos abortados (Addo, 1979; Jensen, 1982).

La propagación local a partir de los ganglios linfáticos supramamarios pueden afectar el tejido de la glándula mamaria dando lugar a la presentación de mastitis exudativas, con la consecuente caída de la producción láctea que puede originar desnutrición, crecimiento inadecuado, e incluso la muerte de las crías (Blood y Henderson, 1985; Arbiza, 1986).

f) Hallazgos Patológicos.

A la necropsia, la mayoría de las lesiones en la carcasa emaciada se localizan en los nódulos linfáticos superficiales y profundos con exudado purulento y capas de tejido necrosado, pero pueden existir también lesiones en órganos torácicos y abdominales en menor grado. Los abscesos son generalmente encapsulados y contienen exudado purulento espeso, inodoro, de color verdoso y de consistencia caseosa, con poca tendencia a que las lesiones calcifiquen. En las lesiones antiguas, el contenido pierde su color verde, volviéndose amarillento con aspecto de masilla rodeada por una pared de tejido conectivo. Los cortes transversales de las lesiones pre-

sentan una disposición concéntrica del material caseoso recientemente añadido, que adopta un aspecto laminado característico. Esta laminación puede ser observada en cualquier órgano afectado. Las lesiones mayores de los ganglios linfáticos superficiales determinan atrofia por compresión y depilación de la piel situada sobre ellos, frecuentemente se rompen para supurar crónicamente a través de una fístula estrecha (Jubb y Kennedy, 1979; Williams, 1980; Gall, 1981; Jensen, 1982; Blood y Henderson, 1985; Pijoan, 1985).

En la forma visceral de la Linfadenitis Caseosa no existen signos clínicos específicos indicativos de la enfermedad. Cuando se presentan casos generalizados los abscesos están distribuidos principalmente en pulmón, hígado, riñón y bazo, pero otros órganos viscerales también llegan a afectarse, tal es el caso de la lesión detectada en el diafragma, omento, lengua, pleura, peritoneo y corazón; también se ha reportado la lesión escrotal y cerebral. Sin embargo la lesión en el escroto no afecta la calidad espermática (Jansen, 1980; Williams, 1980; Ellis, 1983; Stoops, 1984).

Los daños nodulares en el pulmón son similares a los observados en los ganglios linfáticos y se asocian con lesiones características presentes en los ganglios linfáticos bronquiales. Se puede observar en la oveja una bronconeumonía crónica difusa, pielonefritis, ataxia y paraplejia. La presentación en la cabra es muy similar, excepto que la enfermedad torácica es más común y puede tomar

la forma de una bronconeumonía aguda altamente fatal. Las lesiones del parénquima pulmonar pueden ser en forma de abscesos múltiples - acompañados de tejido cicatrizal principalmente, o uno que otro absceso de grandes dimensiones que puede obliterar grandes zonas de tejido pulmonar. Las lesiones más drásticas pueden disminuir la capacidad de la función respiratoria, aumentar la susceptibilidad a padecer enfermedades sistémicas y limita la habilidad de los animales para enfrentarse a estrés ambiental que resulta eventualmente en un número considerable de animales muertos (Valero, 1980; Gall, 1981; - Jensen, 1982; Stoops, 1984).

Con el paso del tiempo los nódulos pulmonares evolucionan - hasta abscesos subpleurales encapsulados y bien delimitados que pueden obliterar porciones de parénquima; A menudo se presenta pleuritis con adherencias, acompañando a procesos patológicos activos como las neumonías extensivas. La atelectasia subpleural puede ser evidente en el tejido pulmonar adyacente a los abscesos en los ganglios mediastínicos. En el parénquima pulmonar pueden existir áreas discretas o extensivas de consolidación (Sharma, 1977; Valero, 1980; - Stoops, 1984; Blood y Henderson, 1985).

Microscópicamente en el sitio de la infección se observa - una pared de tejido conjuntivo, circundando la zona central de necrosis caseosa que en algunos casos puede aparentar ligeros grados de calcificación, esta se encuentra rodeada por una barrera de neu-

trófilos y macrófagos ocasionales en degeneración y algunas células gigantes, además de una gruesa cápsula fibrosa de tejido conectivo - (Sharma, 1977; Runnells, 1980; Valero, 1980; Stoops, 1984; Brown, - 1985).

Los cambios asociados con los conductos aéreos comprenden - infiltración bronquiolar, bronquiectasis, hiperplasia de las células epiteliales bronquiolares y fibrosis peribronquiolar (Stoops, 1984;

Las colonias de *Corynebacterium ovis* son discernibles en el tejido necrótico y en el lumen de los capilares en la pared; la infiltración de linfocitos y células plasmáticas son prominentes en - las cápsulas (Ellis, 1983; Stoops, 1984).

El examen histopatológico de tejidos representativos de animales inoculados experimentalmente, llega a revelar anemia hemolítica grave, con escaséz marcada de glóbulos rojos en las venas, arterias y en la red pulposa del bazo (Hsu, 1985).

Nagy (1976) ensayando métodos de infección, detectó una relación definitiva entre la ruta de infección y los órganos afectados. La infección vaginal resultó en vaginitis, prepucial en postitis, - intratraqueal en rinitis, intraocular en conjuntivitis y subcutánea en abscesos cutáneos; paralelamente la inoculación oral no produjo - síntomas clínicos.

Brown (1985) indicó que los cambios histológicos relevantes observados en cabras que habían sido inoculadas con diferentes biotipos de Corynebacterium ovis estuvieron presentes en los nódulos linfáticos afectados, donde el parénquima nodal, estuvo desplazado a un lado por los abscesos alargados, que comprendían una masa amorfa central eosinofílica y macrófagos muertos, circundados por un margen de neutrófilos en degeneración, y periférica a ésta, una banda de células gigantes y tejido fibroso. El teñido bacterial demostró organismos Gram positivos ordenados en típicas "letras chinas", con figuración esparcida, continúa a la masa central necrótica. Lo anterior resalta la habilidad de Corynebacterium ovis como un parásito intracelular facultativo con capacidad para ejercer efectos leucocidas en el huésped.

La dosis infectante y la vía de inoculación guardan correlación directa con el número y la localización de los abscesos, Ashfaq y Campbell (1980) utilizando 1×10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por tres diferentes vías de inoculación, desarrollaron la enfermedad en cabras a los 95 días después del desafío.

Brogden (1984) indicó que la utilización intravenosa de 1×10^5 UFC dió lugar a la formación de múltiples abscesos pulmonares y adherencias pleurales, después de haber ocasionado toxemia y muerte a corderos que habían sido inoculados experimentalmente.

En ovejas inoculadas con Corynebacterium ovis por vía intralinfática se observaron las siguientes lesiones: edema subcutáneo con infiltración de células sanguíneas en el tejido alrededor del punto de inoculación, los ganglios poplíteos desafiados aumentaron de volumen y después de la incisión presentaron edema y hemorragias. El ducto ganglionar desarrolló un engrosamiento fibroso y una distensión con pus. Los cadáveres presentaron una ictericia muy marcada. El hígado y el bazo se alargaron y los riñones se ennegrecieron (Burrell, 1978).

En forma experimental la inoculación de células vivas de Corynebacterium pseudotuberculosis, sobrenadante de cultivos, exotoxina cruda fraccionada con sulfato de amonio o preparaciones de exotoxina purificada por cromatografía, en pequeños rumiantes gnotobióticos, les ocasiona la muerte en poco tiempo; con la aparición de hemorragias y edema en el sitio de la inyección, hemoglobinuria y anemia hemolítica, presencia de líquido rojo oscuro en las cavidades, edema pulmonar e ictericia y cambios necróticos en los túbulos contorneados proximales de los riñones (Hsu, 1985).

En el cobayo la inoculación intraperitoneal de células vivas a dosis bajas o cepas poco virulentas, provoca inflamación de las bolsas testiculares con exudado fibrino-purulento conocido como "Reacción de Strauss"; posterior a la orquitis se desarrollan los abscesos, a grandes dosis les produce una intoxicación rápida y

muerte por peritonitis (Nelson, 1970; Hagan y Bruner, 1983).

La inoculación del microorganismo en ratones desarrolla una enfermedad aguda que se caracteriza por una toxemia fatal, mientras que en la enfermedad subaguda y crónica, la muerte sobreviene a consecuencia de la abscedación de los órganos vitales (Hagan y Bruner, 1983; Muckle, 1983).

Las lesiones producidas por la toxina de Corynebacterium ovis en animales de experimentación son similares a las provocadas por la toxina diftérica. La inyección intradérmica de la toxina diluida provoca una área local de inflamación intensa y necrosis, mientras la inyección subcutánea causa acumulación de fluido gelatinoso en el sitio de la inyección y puede haber también dilatación de vasos sanguíneos o pequeñas hemorragias (Jolly, 1965; Cameron y Buchan 1966; Lovell y Zaki, 1966; Frape, 1981).

En experimentos recientes se ha demostrado que la exotoxina tiene un efecto lítico sobre las células endoteliales "in vitro" sugiriendo que un mecanismo similar es el que opera "in vivo", indicando que los diferentes grados de degeneración y necrosis del endotelio provocados por la toxina puede tener los mismos efectos sistémicos (Carne, 1978; Brown, 1985).

g) Inmunidad.

El fenómeno de inmunidad para la Linfadenitis Caseosa no está totalmente dilucidado, permanecen diferentes interrogantes respecto a los fenómenos de resistencia y patogenicidad (Ayers, 1977).

La estructura antigénica no está bien definida, pero parece ser heterogénea, este bacilo forma una exotoxina filtrable que ejerce efectos letales sobre animales de laboratorio y pequeños ruminantes. Se ha reportado que todas las cepas del organismo producen la toxina con similitud serológica. Sin embargo hay una substancial variabilidad en la toxigenicidad de diferentes cepas, lo que sugiere diferencias en la cantidad de toxina producida por las diferentes cepas (Doty, 1964; Renshaw, 1979; Hsu, 1985).

Se ha propuesto que un fenómeno de inmunidad celular es el que opera en las infecciones por Corynebacterium pseudotuberculosis, esta inmunidad se asocia con el desarrollo de una población de macrófagos maduros especializados que son activados por C. Pseudotuberculosis. La infección produce hipertrofia, congestión, inflamación y desarrollo de abscesos, lo que bloquea en esta forma la recirculación de linfocitos T, evitando así la interacción con macrófagos e impidiendo de este modo que sea combatida exitosamente la infección (García, 1980; Ellis, 1983).

C. pseudotuberculosis puede inducir leucoestasis pulmonar, lo que resulta en una trombosis capilar por la activación del complemento (C), generando C5a el cual da lugar a un aumento en la adherencia granulocítica, como está propuesto en otras infecciones por bacterias Gram (+) (Brogden, 1984).

Jolly (1965) demostró el importante papel que juega la antitoxina en la adquisición de resistencia contra los efectos de la toxina, ya que suero de ovejas inmunizadas, fué capaz de neutralizar el efecto del aumento de la permeabilidad vascular.

Hard (1970) reprodujo exitosamente el fenómeno de transferencia adoptiva de inmunidad en ratones contra C. ovis por medio de la inyección intraperitoneal de macrófagos y linfocitos sensibilizados y viables; al mismo tiempo evaluó la inmunidad por la reducción de contenido bacteriano en la cavidad y por la supresión de las lesiones en los animales desafiados.

Lund y col. (1982 b) estimaron que la ruta de infección y la dosis del antígeno son también importantes cuando se considera la magnitud de la producción de anticuerpos y que esa producción es tá bajo control poligénico; también asumieron que la resistencia y el curso de la infección dependen de la inmunidad celular. Paralelamente con la serología, indicaron que existe transferencia calos-tral de antitoxinas, presentes en el suero de corderos y cabritos -

nacidos de madres seropositivas y que el título promedio en el suero decrece durante los tres primeros meses de vida. Además indicaron que las antihemolisinas para Corynebacterium pseudotuberculosis pertenecen a la clase de las IgG, que tienen una vida promedio de - 12 días en los neonatos, concluyendo que los anticuerpos maternos - junto con factores ambientales y de algún otro tipo, son los responsables de proteger a cabritos contra las infecciones de Corynebacterium pseudotuberculosis.

Cameron y Buchan (1966) demostraron que los factores tóxicos y los antígenos inmunizantes presentes en las células de Corynebacterium pseudotuberculosis son distintos; estos antígenos pueden ser separados exitosamente por precipitación con sulfato de amonio, precipitación ácida y por electroforesis.

La bacteria es resistente a la muerte y digestión del macrófago, probablemente debido a su cubierta lípidica constituida - por ácido corinemicólico (Cameron y Smith, 1970; Tashjian, 1983).

La exotoxina ayuda al establecimiento de la bacteria en - el tejido del nódulo linfático y en el desarrollo progresivo y persistencia de las lesiones de Linfadenitis Caseosa por actividad - citotóxica local (Jolly, 1965; Cameron, 1966; Husband, 1977; Carne, 1978).

La antigenicidad de la exotoxina se relaciona con tres actividades biológicas conocidas: actividad hemoaglutinante, actividad hemolítica y actividad demonecrotica, las cuales pueden ser inactivadas por la acción de antitoxina, formación de toxoide con formalina y por tratamiento con calor y filtración (Burrell, 1978; Burrell, 1980 b).

La exotoxina está integrada por dos componentes mayores: uno estable, proteína de alto peso molecular y otro inestable, proteína de bajo peso molecular. Dicha toxina puede tener varias actividades biológicas: letalidad para algunos animales incluyendo pequeños rumiantes gnotobióticos; actividad parcial de hemolisina " in vitro " y hemólisis " in vivo "; inhibición de la hemolisina B estafilococal; potenciación de la lisina estafilococal; factor promotor de la permeabilidad vascular y la necrotización para algunos tejidos (hsu, 1985).

La toxina de Corynebacterium ovis es una esfingomielinasa específica que actúa directamente sobre importantes fosfolípidos (esfingomielina y lisofosfatidilcolina) que constituyen las lipoproteínas estructurales de la membrana celular de células endoteliales de los vasos sanguíneos y de los eritrocitos. La esfingomielina es desdoblada a fosfato ceramida y colina (Carne, 1978; Hsu, 1985).

Recientemente se han realizado estudios con la potente exotoxina producida y purificada "in vitro", indicando que tiene actividad de fosfolipasa D, que muestra efectos vasogénicos, con un peso molecular de 31,000 Daltons y un punto isoeléctrico de aproximadamente 9.6 (Carne, 1978; Onon, 1979; Ellis, 1983; Hsu, 1985).

h) Diagnóstico.

La Linfadenitis Caseosa es la mayor causa de linfadenopatías unilaterales en las ovejas y cabras (Williams, 1980; Ellis, 1983).

El diagnóstico de la enfermedad superficial se hace en base a la exploración clínica por medio de la inspección y palpación minuciosa de los ganglios linfáticos superficiales; esto puede tener poco valor en la detección de lesiones tempranas y en casos de linfadenitis sistémica. En cambio la presencia de ganglios voluminosos al momento de la inspección post-mortem, con lesiones características y la presencia al corte de exudado purulento de consistencia caseosa, sin olor, de color amarillo verdoso, son únicas y altamente sugestivas de la enfermedad, con lo cual se integra un diagnóstico presuntivo. Por el contrario, el aislamiento del agente etiológico a partir de exudado, el cual se desarrolla característicamente formando colonias secas, escamosas y hemolíticas, con microorganismos dispuestos en "empalizada", más los resultados de las pruebas bioquímicas, confirman el diagnóstico (Jubb y Kennedy, 1979; Jen-

sen, 1982; Blood y Henderson, 1985; Pi Joan, 1985; Arbiza, 1986).

Diversas pruebas serológicas han sido desarrolladas para efectuarse "tanto "in vivo" como "in vitro" y han sido adaptadas - como auxiliares en el diagnóstico confirmativo de la enfermedad y en la detección de portadores asintomáticos. La mayoría de ellas - se basan en la detección de antitoxinas (respuesta humoral contra - la exotoxina) presentes en el suero. Sin embargo, por lo general to - das han tenido una utilización limitada, ya sea por su elevado cos - to de realización, por ser complejas y laboriosas, pero sobre todo porque muchas de ellas son poco confiables ya que pueden dar valo - res inexactos y errores en su interpretación. Entre estas pruebas se tiene a: la demorreacción, la neutralización, fijación de com - plemento, inhibición de la antihemolisina, hemoaglutinación, inmu - nodifusión, actividad hemolítica y prueba de ELISA; de las cuales - la hemaglutinación indirecta ha mostrado ser la más satisfactoria - (Ayers, 1977; Renshaw, 1979; Burrell, 1980; Ellis, 1983; Brown, 1985).

La prueba de Inhibición de la Antihemolisina desarrollada por Ayers (1977) da numerosas reacciones falsas positivas (García, 1980).

La prueba cutánea para reacción de Hipersensibilidad Retar - dada utilizando un antígeno a base de Corynebacterium pseudotubercu - losis sonicado, es de valor limitado para detectar a la Linfadeni--

tis Caseosa visceral (Renshaw, 1979; Ellis, 1983).

La prueba serológica de Protección al Ratón desarrollada por Zaki y Abdel-Hamid (1974), detecta la Linfadenitis Caseosa sistémica, ésta depende de la neutralización de 2 dosis mínimas letales (DML) de la toxina de Corynebacterium ovis por anticuerpos específicos presentes en 1 ml de suero de ovejas infectadas. Ofrece utilidad como una herramienta diagnóstica debido a que no da reacciones falsas positivas, la única desventaja es la falla para detectar a todos los animales afectados, especialmente en los estados tempranos de la enfermedad (Nairn, 1974; Shigidi, 1978; García, 1980).

Shigidi (1978) pudo detectar anticuerpos contra la toxina de Corynebacterium ovis en animales afectados naturalmente, al efectuar un estudio comparativo entre la prueba de Hemaglutinación Indirecta (IHA) y la prueba de Inhibición de la Antihemolisina (AHI) utilizando eritrocitos sensibilizados, encontrando que la IHA era -- más sensitiva que la AHI, indicando que estas pruebas son adecuadas para investigaciones seroepidemiológicas de la Linfadenitis Caseosa, pero ninguna de las dos es 100% confiable.

Burrell (1979), citado por Lund et al. (1982a) describió a la prueba serológica de Aglutinación como una prueba no confiable para el diagnóstico de la Linfadenitis Caseosa, debido a que un factor aglutinante de carácter no-anticuerpo estaba presente en el sue

ro y que actuaba sobre células bacterianas; por esta razón, dicha prueba puede dar reacciones falsas positivas.

En otro reporte al estudiar las condiciones para la actividad hemolítica de la exotoxina de Corynebacterium ovis "In vitro", descubrió que esta fué hemolítica a un pH de 6.0 y que indujo adhesión de glóbulos rojos a un pH neutro o ligeramente alcalino.

Burrell (1980b) realizando la prueba de Hemoaglutinación Directa "In vitro" con la exotoxina de Corynebacterium ovis, indicó que esta es otra actividad atribuida a la exotoxina; la aglutinación y la hemólisis pueden ser inhibidas por la antitoxina y este puede ser un prelude para el uso de esa actividad como indicador en ensayos de diagnóstico. También demostró que junto con la actividad hemolítica y hemoaglutinante, existe la actividad demonecrotica de los sobrenadantes de cultivos del microorganismo.

En otro estudio basado en la neutralización de la exotoxina hemolítica de Corynebacterium ovis por la antitoxina, indicó que la prueba de Inhibición de la hemólisis es simple de ejecutarse, debido a que sólo implica la incubación de sobrenadante de cultivo y suero, seguido por la adición de eritrocitos de oveja, indicando que esta prueba es adecuada para estudios sobre inmunidad perinatal, señalando al mismo tiempo que los resultados obtenidos sugieren una transferencia calostrala de antitoxinas. Esta prueba mide la habilidad

dad del suero inmune para inhibir la acción hemolítica de la exotoxina. En un tercer estudio, paralelo a los anteriores, utilizó la prueba de Inmunodifusión Doble en Gel, demostrando que es un método extremadamente económico y práctico para ser utilizado en sueros de animales infectados, ya que sólo requiere de 0.05 ml de sobrenadante de cultivo no concentrado y suero. Por lo menos 16 muestras pueden ser probadas en cada placa y los resultados pueden ser obtenidos dentro de 24 horas de la realización de la prueba. Este puede ser el método más práctico para el diagnóstico de la Linfadenitis Caseosa, pero requiere de perfeccionamiento.

La prueba de Inhibición de la B-hemólisis (BHI) y el radioensayo para fosfolipasa D, han sido usadas como medidas de la actividad de la exotoxina; en todos los casos fueron positivas, pero hubo diferencias en la correlación de ambas pruebas, indicando que el radioensayo detecta enzimáticamente la exotoxina activa, mientras que la prueba BHI no diferencia las formas activa e inactiva (Muckle, 1983).

Brown y col. (1985) utilizaron una prueba sinérgica de Inhibición de la Hemólisis, esta prueba demostró ser un indicador confiable de la infección activa. Los títulos de 1 : 4 se interpretaron como respuestas seropositivas. Todos los animales con abscesos tenían un título y aquellos con el mayor número de abscesos tuvieron títulos positivos más altos; mientras los animales sin absce

sos fueron seronegativos.

El Ensayo Hemolítico es un sistema "in vitro" de cuantificación de la actividad de la exotoxina de Corynebacterium ovis sobre los eritrocitos (Hsu, 1985).

La prueba de ELISA ha suministrado resultados prometedores en el diagnóstico de la Linfadenitis Caseosa (Arbiza, 1986).

i) Tratamiento.

La naturaleza encapsulada de las lesiones hace sumamente difícil la penetración de los medicamentos, evitando que entren en contacto con el microorganismo para destruirlo. Corynebacterium pseudotuberculosis es un parásito intracelular facultativo, su habilidad para penetrar en los leucocitos lo hace relativamente inaccesible a los antibióticos, quimioterápicos y sustancias humerales. Por eso a pesar de la sensibilidad que muestra el agente ante una amplia gama de antibióticos "in vitro", los resultados de la administración parenteral de medicamentos ha dado pobres resultados (Hagan y Bruner, 1983; Pijoan, 1985; Arbiza, 1986).

Existen varias razones posibles para la ineficacia de la terapia con antibióticos "in vivo". Primero, puede resultar de los bajos niveles del antibiótico difundido dentro del nódulo linfático

abscedado, debido a la cápsula fibrosa o a la presencia de pus caseosa densa. Segundo, algún factor antagonista en la pus, puede neutralizar el efecto bactericida del antibiótico. Por último, Corynebacterium pseudotuberculosis es un parásito intracelular habitante de las células fagocíticas, de este modo no puede entrar en contacto -- con cantidades substanciales de los antibióticos (Ashfaq y Campbell, 1979).

En abscesos crónicos la terapéutica antibacteriana puede prolongar la enfermedad por retardar la maduración de los abscesos. Esta maduración podría acelerarse con el uso de ungentos o calor (Merck, 1981).

Los medicamentos que con mayor frecuencia han sido empleados en pruebas de sensibilidad "in vitro" son la penicilina, ampicilina, eritromicina, gentamicina, sulfonamidas, tetraciclinas y clo-ranfenicol (Ashfaq y Campbell, 1979; Carter, 1985).

Algunos trabajos refieren que el uso de una mezcla de yodo orgánico con sal (una parte de yodo en base azucarada + dos cuartas partes de sal) reducen la incidencia de la enfermedad, particularmente la presencia de nódulos (Nelson, 1970).

El tratamiento individual de abscesos periféricos en animales no es económicamente factible ni prudente, debido a que los -

animales afectados sirven como reservorios. Sin embargo recientes experimentos con períodos prolongados (meses) de penicilina intramuscular y la extirpación quirúrgica de los abscesos, sugieren alternativas para evitar la eliminación de animales consentidos o selectos que mantengan un gran valor productivo, de cualquier modo, tales animales tratados deben ser aislados del resto del lote - - - (Ellis, 1983).

La mayoría de los autores coinciden que el tratamiento quirúrgico se puede practicar adecuadamente en el caso de abscesos superficiales, aunque éste pudiera tener limitantes para su realización en determinadas regiones del cuerpo (cuando involucra vasos sanguíneos, nervios y glándulas adyacentes), siendo nulo cuando se presenta la forma visceral de la enfermedad (Jubb y Kennedy, 1979; Renshaw, 1979; Williams, 1980; Gall, 1981; Blood y Henderson, 1985; Pijoan, 1985; Arbiza, 1986).

Para la extirpación quirúrgica de los abscesos primeramente se deben aislar los animales infectados del resto del rebaño, se debe rasurar la zona, el absceso ya maduro se desinfecta y remueve antes de que fistulice, a través de una insición vertical que va del vértice al fondo de la lesión, se ejerce presión digital para lograr un completo drenado del absceso, teniendo la precaución de recolectar el exudado para su destrucción posterior; la cavidad se debe inundar con peróxido de hidrógeno, luego se impregna con un anti

séptico cuidando de cambiarla, repitiendo las curaciones diariamente hasta que sanen y cicatricen completamente antes de reinstalar a los animales en el rebaño. Alternativamente los nódulos linfáticos superficiales que se encuentren abscedados también pueden removerse quirúrgicamente, pero para ello se requiere del uso de anestesia general (Mayfield, 1979; Call, 1981; Pijoan, 1985; Arbiza, 1986).

j) Prevención.

Todos los intentos que se han efectuado para producir una vacuna que induzca inmunidad artificial contra el microorganismo de la Linfadenitis Caseosa han dado pobres resultados. En gran parte se ha logrado protección contra los efectos letales de la toxina bacteriana, pero no se ha logrado disminuir la aparición de los abscesos (Blood y Henderson, 1985; Pijoan, 1985).

La naturaleza intracelular facultativa del microorganismo sugiere que la inmunidad celular y los agentes que estimulan su producción como las vacunas autógenas vivas atenuadas, probablemente son necesarias para la protección contra Corynebacterium pseudotuberculosis, sin embargo se ha visto que llegan a producir la formación de abscesos en el sitio de la inoculación (Call, 1981; Hagan y Bruner, 1983).

La Linfadenitis Caseosa raramente se llega a observar entre animales de menos de 3 meses. Algunos resultados experimentales indican que la inmunoprofilaxis contra Corynebacterium ovis puede ser introducida a una edad de 2 a 3 meses (Lund, 1982).

La aplicación de una autobacterina a partir de microorganismos muertos estimula la inmunidad humoral, pero requiere mayor investigación. Las medidas higiénicas pueden prevenir la presencia de la enfermedad en explotaciones libres. La aplicación de toxoide de Corynebacterium ovis en animales jóvenes está en fase de experimentación, pudiendo esperarse buenos resultados prácticos en el futuro (Arbiza, 1986).

La prevención de la enfermedad se encamina a reducir las oportunidades de infección. Para ello se debe seleccionar en favor de animales sin abscesos; en caso de importar ganado, se debe chequear el grado de infección del rebaño donante y los animales que se van a introducir deberán ser sometidos a un examen clínico cuidadoso; finalmente se deben evitar al máximo las situaciones que cursan con heridas, al igual que tener cuidado durante el parto desinfectando el ombligo del recién nacido, además de guardar medidas sanitarias en las instalaciones (Merck, 1981; Lund, 1982a; Arbiza, 1986)'

k) Control.

Existen una serie de medidas y recomendaciones encaminadas a controlar la Linfadenitis Caseosa, las cuales bien realizadas pueden disminuir la incidencia de la enfermedad. Son entre otras:

1) No introducir animales afectados en el rebaño, esto puede llevarse a cabo inspeccionando los nódulos linfáticos superficiales.

2) En caso de aplicar tratamiento quirúrgico para algún animal este debe ser aislado y tratado con rigurosa higiene en un lugar especial y sólo podrá ser reincorporado al rebaño cuando ya esté debidamente restablecido de los abscesos.

3) Los procedimientos quirúrgicos podrán emprenderse solamente en lugares limpios y con equipos estériles, o bien, sumergidos previamente en soluciones desinfectantes.

4) Los animales muy delgados e improductivos con nódulos linfáticos aumentados deben ser considerados para la eliminación, ya que ellos pueden desarrollar abscesos y constituyen una fuente de infección para el resto del rebaño.

5) Desinfección de las manos de los esquiladores, las máquinas y los pisos de las instalaciones a intervalos frecuentes.

6) Esquilar en forma secuencial a las ovejas de 1, 2, 3, 4, y 5 años dejando al final a los animales más viejos y a los sospechosos.

7) Los animales ya trasquilados deben ser tratados con soluciones antisépticas en las heridas que les deja el proceso de la

esquila y cualquier otra práctica que implique la pérdida de continuidad de la piel, liberándolos a las praderas con pastizales para evitar el roce entre ellos (Gall, 1981; Jensen, 1982; Ellis, 1983; Pijoan, 1985; Arbiza, 1986).

II. OBJETIVOS

- 1.- Aislamiento e identificación de Corynebacterium ovis de muestras obtenidas de rastro.
- 2.- Obtención de toxina cruda de los cultivos de la bacteria.
- 3.- Realizar Ensayos Hemolíticos con la toxina cruda, utilizando eritrocitos de diferentes especies animales.

III. MATERIAL Y METODOS

1.- Material.

a) Colección de muestras.

Se acudió al Rastro de Ferrería (Industrial de Abastos) para sustraer muestras sospechosas de Linfadenitis Caseosa. La toma de muestras se realizó en el momento de la inspección post-mortem, los órganos de elección fueron aquellos que contenían abscesos de gran tamaño, principalmente, ganglios linfáticos mediastínicos, pulmón e hígado, los cuales se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Microbiología de la FES-C en donde se realizó el aislamiento de la bacteria.

Se seleccionó este rastro porque es la principal instalación tecnificada del país, que se dedica al procesamiento de las especies ovina y caprina. En conjunto su volumen de sacrificio mensual es de aproximadamente 30,000 cabezas, cuyas canales se destinan para abastecer al Distrito Federal y en mínima parte al área metropolitana (Vázquez, 1986).

b) Medios de cultivo.

b.1 Medios de cultivo para aislamiento primario.

El agar sangre se preparó a partir del medio basal comercial como sigue: Se hidratan 40 gr. de la base (Difco) con un litro de agua destilada en un matraz Erlenmeyer y se homogeniza, luego se clarifica por calentamiento al mechero a más de 95 °C, se pasa a esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión du-

rante 15 minutos, se deja descender la temperatura a 50 °C aproximadamente para añadirle 5 a 10% de sangre desfibrinada de bovino homogenizando el medio con movimientos giratorios, el medio todavía líquido se vierte en cajas de Petri estériles de 25 a 30 ml por cada caja de 10 cm de diámetro, con esto se asegura una altura en el agar de 3 a 6 mm como máximo, esto es muy importante para detectar la presencia de hemólisis; en caso de burbujas de aire, éstas son eliminadas pasando la flama del mechero por la superficie. Una vez gelificado el agar, las placas se someten a la prueba de esterilidad en estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas, al término se eliminan las que presentan contaminación y se almacenan a 4°C aquellas que pasaron la prueba, para poder ser utilizadas en los siguientes siete días (Córdoba y García, 1985).

b.2 Medios de Caracterización Bioquímica.

Estos medios comerciales se prepararon de acuerdo a las especificaciones del laboratorio que los produce, los cuales se mezclan y distribuyen en tubos de 13 X 100 ml con tapón de baquelita para luego esterilizarse y almacenarse para ser utilizados. Son los siguientes:

Heart Infusion Broth	(Difco Lab.)	662071
Litmus Milk	(Difco Lab.)	647270
Nitrate Broth	(Difco Lab.)	620720
MR - VP Medium	(Difco Lab.)	607722
SIM Medium	(Difco Lab.)	603790

O/F Basal Medium-Hugh & Leison	(Difco Lab.)	640481
Special Agar Noble	(Difco Lab.)	583045
Caldo Urea	(Lab. Bioxon)	215-1
Medio Gelatina	(Lab. Sigma)	158-1
Peptona Bacteriológica	(Lab. Sigma)	975-2

c) Reactivos (Cowan y Steel, 1979).

I.- Prueba de Catalasa:

Peróxido de Hidrógeno (Sol. acuosa al 3%)

II.- Prueba de Oxidasa:

NNN-Tetrametil-p-fenilendiamina.

III.- Prueba de Nitratos:

Sol. 0.8 de ac. sulfanílico en ac. acético 5 N

Sol. 0.6 de dimetil naftilamina en ac. acético 5 N.

IV.- Solución de Rojo de Metilo para la prueba de MR:

Rojo de Metilo 0.04 gr

Etanol 40.0 ml

Agua destilada 100.0 ml

V.- Prueba de Voges Proskauer (VP):

5% de alfa naftol en etanol.

Sol. de hidróxido de potasio al 40%

VI.- Reactivo de Kovac's (para detección de Indol):

p-dimetilaminobenzaldehído	5 gr
alcohol amílico	75 ml
HCl concentrado	25 ml

VII.- Solución Salina Fisiológica.

VIII.- Tris Buffer.

d) Tinciones: (Cowan y Steel, 1979).

I.- Tinción de Gram.- se utilizan soluciones de -
cristal violeta, lugol, acetona y safranina.

II.- Tinción para Acido-Resistentes (Ziehl-Neelsen).
Se efectúa sobre una fuente de vapor, utiliza
soluciones de fucsina fenicada, alcohol ácido
y un colorante de contraste como verde de mala
quita.

e) Material Biológico.

Suero estéril de equino, 2 frascos de heparina, sangre
desfibrinada de bovino, eritrocitos lavados de bovino, ovino, capri
no, conejo, cuye y ratón.

f) **Material. Inespecífico:**

- bolsas de polietileno.
- charola de disección.
- pinzas y tijeras de disección.
- mechero de Bunsen.
- espátula.
- asa bacteriológica.
- cajas de Petri.
- tubos de ensayo de 10, 15 y 20 ml.
- pipetas graduadas de 1 y de 5 ml.
- matraces de Erlenmeyer.
- agujas metálicas con bisel.
- jeringas insulínicas y de 10 ml.

g) **Implementos Científicos:**

- agitador orbital (NB-Scientific Co. USA).
- cámara de liofilización (labconco Freeze Dry-5 USA)
- centrífuga (Damon/IEC-DFR-600 USA).
- compresora de aire.
- desfibrinador.
- estufa bacteriológica (Scientific M-3151 USA).
- filtros (Millipore Corp. B-M USA).
- refrigerador (Ultra-Low Revco Freezer USA).
- sistema de microfiltración (Mic. Systems D-Court USA)

2.- Métodos.

a) Obtención de sangre para elaborar los medios.

La sangre se recolectó de la siguiente manera: se desinfectó la zona con una torunda de algodón impregnada de alcohol al 79%, luego se punccionó la vena yugular del bovino con aguja estéril del número 14 ó 16 y de 2.5 pulgadas de longitud; como la sangre para este fin debe ser desfibrinada, se utiliza un desfibrinador mecánico; una vez que se obtiene el volumen deseado, se retira la aguja alejando el desfibrinador, teniendo la precaución de asegurarnos de la hemostasia del vaso punccionado; posteriormente la sangre es vertida en recipientes estériles bajo condiciones de esterilidad y se almacena en refrigeración para ser empleada durante los siguientes 10 días.

La sangre que se emplea para la elaboración de los medios que se utilizan para Ensayo Hemolítico, debe obtenerse en forma completa; para ello se requiere del uso de un anticoagulante natural como la heparina, el cual es adicionado al recipiente antes de que se deje fluir lentamente la sangre necesaria por las paredes del recipiente, utilizando la aguja recomendada en cada caso y la técnica de punción ya descrita. En el caso de los roedores de laboratorio utilizados (conejo, cuye, ratón) resultó más práctico adicionar el anticoagulante directamente a la jeringa y así obtener el volumen de sangre requerido, para ello se emplearon agujas del cali

bre 23, 25 y 27 respectivamente y la vía de punción fue la intracar-
diaca. La muestra sanguínea en seguida fue centrifugada a 2.500 rpm
durante diez minutos para realizar el lavado de los eritrocitos - -
(Córdoba y García, 1985).

b) Procedimientos de cultivo.

En la recolección y manejo de las muestras se tomaron
en cuenta las medidas rigurosas que minimizan la contaminación. Una
vez en el laboratorio, se seleccionó el área orgánica que presenta-
ba abscesos y se selló quemando la superficie con espátula al rojo
vivo para eliminar los contaminantes indeseables. Se incidieron -
los abscesos con tijeras estériles, en seguida, con el asa bacterio-
lógica esterilizada al mechero, se sembró de las porciones periféri-
cas profundas en agar sangre, utilizando la técnica americana para
dilución de colonias, las placas fueron incubadas en estufa bacte-
riológica a 37°C durante 48 horas, chequeando el crecimiento diaria-
mente; también se realizaron improntas, las cuales fueron teñidas -
por el método de Gram y el de Ziehl Neelsen. Al término de la incu-
bación de las placas de aislamiento primario, se seleccionaron las
colonias de acuerdo a su morfología, las cuales fueron resembradas
a continuación para lograr su purificación (García, 1980; Stoops, -
1984; Córdoba y García, 1985).

c) Identificación.

La identificación es la forma más conveniente del diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas, el cual se fundamenta en sus tres aspectos básicos:

- Demostración.- A través de un examen directo de la apariencia morfológica y con el empleo de las tinciones.

- Aislamiento.- Al lograr el desarrollo del microorganismo en medios de cultivo artificiales enriquecidos.

- Identificación.- Empleando pruebas bioquímicas, con el auxilio de tablas de reacción bioquímica ya existentes.

La identificación del género y especie de la bacteria involucrada en el padecimiento, se realizó de acuerdo a la metodología descrita por varios autores (Mc Fadin, 1976; Pijoan, 1978; Cowan y Steel, 1979; García, 1980; Carter, 1985).

Las pruebas empleadas fueron las siguientes:

I.- Tinción de Gram:

Una vez que se seleccionaron las colonias, se realizaron los frotis correspondientes para luego ser teñidos por el método de Gram; al microscopio se deben observar pequeños bastones Gram positivos, agrupados en empalizadas.

II.- Prueba de Catalasa:

En un portaobjetos se coloca una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, se añade con el asa bacteriológica una colonia bacteriana (cuidando de no tocar los eritrocitos del medio ya que éstos presentan catalasa), si en ese momento aparecen burbujas es una prueba positiva, si no hay alguna reacción es negativa.

III.- Prueba de Oxidasa:

Se utiliza el método de la caja de Petri.- En un trozo de papel filtro colocado dentro de una caja de Petri e impregnado con el reactivo, se adiciona la colonia con el asa bacteriológica. Si aparece un color púrpura será una prueba positiva, si no hay cambio de color es una prueba negativa.

IV.- Prueba de O/F (Oxidación-Fermentación).

Se inoculan por picadura, con una asa de platino de terminación recta tubos del medio O/F por duplicado. A uno de ellos se le agrega una capa de glicerina o vaselina estéril, aproximadamente un centímetro, se incuba a 37°C.

Resultados	Tubo abierto	Tubo sellado
Oxidación (O)	amarillo	verde
Fermentación O/F	amarillo	amarillo
Fermentación (F)	verde	amarillo
Ninguna acción sobre el carbohidrato O/F	verde	verde

V.- Reacción a la Ureasa:

Se inocula un tubo de urea por agitación y se incuba a 37 °C. Si cambia a color rosa intenso es una prueba positiva, sin cambio de color es una prueba negativa.

VI.- Reducción de Nitratos.

Se inocula un tubo con medio de nitratos y se incuba a 37°C. A las 48 horas se agregan 4 gotas de ác. sulfanílico y 4 de alta naftilamina, si cambia a un color rojo es una prueba positiva; si al adicionar el zinc cambia a un color rojo, será una prueba negativa.

VII.- Prueba de MR/VP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer):

Se inoculan dos tubos de medio MR/VP y se incuban en la estufa bacteriológica a 37°C. A las 24 horas se le adiciona el reactivo de rojo de metilo al tubo destinado para la prueba de MR, si cambia a un color rojo es una prueba positiva; si no hay ningún cambio es una prueba negativa. A las 48 horas se hace la lectura para el tubo de VP, a éste se le adicionan los siguientes reactivos: 4 gotas de alfa naftol y 4 gotas de KOH al 40%; si cambia a un color rojo es una prueba positiva, si no hay cambio en el medio será negativa.

VIII.- Prueba de Leche Tornasol:

Se inocula un tubo con medio de Litmus Milk. A

las 24 horas se pueden obtener los siguientes resultados:

a) Coágulo ácido, indicado por un coágulo rosa, firme, el cual se retrae y es insoluble en álcali.

b) Coágulo de cuajo, manifiesto por un coágulo blanco, el cual se retrae y expande un líquido claro y grisáceo (suero); el coágulo es insoluble en álcali; puede ocurrir la reptonización o digestión del coágulo posteriormente.

c) Producción del ácido, indicado por un color rosa.

d) Producción del álcali, indicado por un color azul.

e) Reducción del indicador, el medio se encuentra incoloro (blanco).

IX.- Medio para el Estudio de Carbohidratos:

A cada tubo con agua peptonada se le adiciona con pipetas estériles, 0.5 ml del azúcar correspondiente que debe estar a una concentración del 18; se inoculan con una asada de colonias y se incuban a 37°C. La lectura se realizó a las 48 horas; un cambio a color rosa se considera como reacción positiva.

X.- Gelatina:

Inocular gelatina nutritiva e incubar a 37°C durante 14 días; cada 2 o 3 días se debe enfriar primero en un refrigerador durante 2 horas y después examinar la licuefacción. Se debe tener un tubo sin inocular como control.

XI.- SIM:

Se siembra en un medio de SIM por picadura y se incuba durante 24 hrs. Pasado este tiempo se le agregan 4 gotas del reactivo de Kovac's para detectar producción de indol (esto se observa por la aparición de un anillo rojo). Si el medio se pone de un color negro nos indica la producción de H_2S , además se puede observar la motilidad en caso de que existiese.

Nota: A todos los medios inoculados fué necesario adicionarles 0.5 ml de suero estéril de equino para tener un crecimiento adecuado.

d) Proceso para la Obtención de la Toxina.

d.1 Crecimiento masivo de Corynebacterium ovis.- Una vez purificadas e identificadas las cepas del microorganismo, fueron numeradas y almacenadas las placas de agar que contenían los cultivos más representativos; de ellas se eligió la placa # 8 por presentar un grado hemolítico sobresaliente. En seguida, de ésta fue tomada una asada de colonias en forma pura y se inocularon 100 ml de caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) contenidos en un ma-

traz de 250 ml, el cual fué incubado 48 hrs a 37°C. La suspensión de los microorganismos desarrollados en ese caldo, fue vertida en un matraz de 5 lts conteniendo 4 lts de Medio Hidrolizado de Lactoalbúmina (MHL). A continuación el matraz fue colocado en un agitador orbital e incubado a 37°C durante 48 hrs con agitación constante de 130 rpm, para evitar la formación de una película de conglomerados bacterianos, ya que el microorganismo en medios artificiales es muy propenso a formar aglutinaciones o escamas suspendidas que se separan con dificultad. Posteriormente se realizaron frotis para confirmar la presencia de la bacteria (Jolly, 1965; Burrell, 1980c; Muckle, 1983; Brodgen, 1984).

d.2. Filtración.- La suspensión fue tratada por centrifugación a 2,500 rpm durante 30 minutos para remover los grupos de células con sus paredes intactas y otros restos celulares insolubles, el producto anterior fue decantado para separar a continuación el paquete celular y el líquido sobrenadante por medio de una filtración continúa a través de filtros de membrana con poro de 0.22 μ m (Millipore Corp.). El líquido sobrenadante estéril constituyó el extracto crudo de la toxina. El paquete celular fue colectado y almacenado en congelación. El sobrenadante fue distribuido en matraces de 500 ml para proceder a efectuar la microfiltración (Jolly, 1965; Cameron & Buchan, 1966; Burrell, 1978).

d.3. Microfiltración.- Por investigaciones precedentes se tienen datos que indican que la exotoxina de Corynebacterium ovis tiene un Peso Molecular (PM) de 31,000 Daltons (Hsu, 1985). Por lo que fue necesario concentrar el sobrenadante filtrado. Para esto se emplea un sistema de microfiltración utilizando membranas de exclusión tipo F (Microf. Systems) que retienen pesos moleculares de 100,000 y 10,000 D, aplicándoles una presión positiva de 4 kg/cm^2 generada por una compresora de aire. Parte del sobrenadante se pasó primero por la membrana de 100,000 D de PM; a continuación una parte fue almacenada y la otra fue pasada por la membrana de 10,000 D. De este modo se obtuvieron volúmenes de 150 ml por duplicado. Este proceso se llevó a cabo dializando todo el día y la noche en un cuarto frío a 4°C (Mendoza, 1986).

d.4. Liofilización.- Finalizada la microfiltración se procedió a la liofilización parcial, para conseguir concentrar más los solutos presentes en los 150 ml de los frascos con tapón de rosca que contenían las tres diferentes preparaciones en duplicado (Extracto Crudo, Filtrado de 100,000 y 10,000) fueron congelados a -70°C y los recipientes destapados fueron colocados en una cámara de liofilización, luego se le aplicó vacío a una temperatura aparente de -50°C durante aproximadamente 8 hrs para deshidratar su contenido llevándolo cerca del secado, logrando así un medio más concentrado. Se sellaron con su tapa y fueron almacenados a -20°C . Las diferentes muestras requeridas para probar actividad hemolítica

se extraen de los recipientes previamente descongelados con pipetas estériles (Cameron & Smith, 1970; Shigidi, 1978; Lund, 1982b; Muckle 1983; Mendoza, 1986).

e) Ensayo Hemolítico.

Una modificación del método de Knight (citado por Hsu, 1985) fue empleada como una medida cuantitativa de la actividad de la exotoxina de Corynebacterium ovis en sus diferentes fracciones, empleando un procedimiento "in vitro" que a continuación se describe: Se obtuvieron eritrocitos de bovino a partir de una muestra de sangre heparinizada, la cual fue centrifugada a 2,500 rpm durante diez minutos y posteriormente fue lavada tres veces con solución salina y resuspendida al volumen original. A 10 ml de tris buffer con pH de 8.2 se le agregan 90 ml de agua destilada, luego se desechan 28 ml, en seguida se disolvió un gramo de agar noble en los 72 ml de 10 mM tris buffer conteniendo 10 mM de $MgCl_2$ y 0.85% de NaCl por calentamiento a 100°C.

Después de permitir enfriar la muestra del agar y el tris a 55°C aproximadamente, se adicionaron 7 ml de eritrocitos de bovino ya lavados y 1 ml de merthiolate diluido a una concentración de 1 : 10,000. La mezcla (10 a 12 ml) fue vaciada en cajas de petri estériles de 9 cm de diámetro, dando una profundidad al medio de aproximadamente 3 mm y se almacenaron a 4°C para ser utilizadas en los cinco días siguientes; sobre la mezcla solidificada fueron -

cortados tres pozos de 0.5 cm de diámetro utilizando sacabocados del no. 2, los cuales fueron llenados en su totalidad con las tres preparaciones (EC, F 100 y F 10) de la exotoxina, todo esto efectuándose por duplicado, las placas fueron incubadas por 18 hrs a 37°C.

El diámetro del halo de hemólisis fue medido alrededor de cada pozo. Este proceso fue repetido utilizando los eritrocitos de cada una de las especies domésticas y de laboratorio que estaban contempladas para la culminación de este experimento.

De esta manera los efectos "in vitro" de la exotoxina sobre eritrocitos de bovino, oveja, cabra, conejo, cuye y ratón fueron evaluados utilizando el ensayo hemolítico. Las mezclas se prepararon como fue descrito previamente para los eritrocitos de bovino y en ningún caso se buscó la sensibilización de los glóbulos rojos - descrita en algunos reportes (Burrell, 1980c; Muckle, 1983; Hsu, - 1985).

IV. RESULTADOS

a) Lesiones Macroscópicas Observadas.

Las muestras de ganglios linfáticos y órganos viscerales se encontraron aumentados de volumen. Al momento de la insición se observó un exudado purulento de color verdoso que en algunas ocasiones era de color amarillento; los cortes transversales de las lesiones presentaban una disposición concéntrica. Los pulmones, riñones e hígado presentaron abscesos de aspecto y tamaño característicos.

b) Características de los Aislamientos.

1. Morfología Colonial.- Después de 48 horas de incubación a 37°C, se obtuvieron 10 placas con aislamientos primarios cuyas colonias eran pequeñas y producían hemólisis tipo Beta, algunas tenían aspecto granular de color blanco cremoso y se fragmentaban con facilidad, aparentaban una hojuela de parafina, al tocarlas con el asa de platino se podía desplazar por la superficie de la placa toda una colonia pequeña.

2. Identificación.- Al microscopio los frotis teñidos por el método de Gram revelaron una gran cantidad de bacilos Gram (+) - que estaban agrupados en forma de "letras chinas". Para la completa identificación del género y especie de la bacteria se efectuaron las pruebas bioquímicas correspondientes; al comparar los resultados obtenidos, éstos coincidían con los que se describen en la literatura para Corynebacterium ovis. Dichos resultados se encuentran agrupados en el cuadro no. 4

CUADRO No. 4

PRUEBAS EMPLEADAS EN LA IDENTIFICACION DE *C. OVIS*

Prueba	Interpretación
Tinción de Gram	bacilos Gram (+) pequeños, pleomórficos
Tinción de Ziehl Neelsen	(-)
Hemólisis β	(+) -
Gelatina	(-)
Leche Tornasol	sin cambio
Ureasa	(+)
Nitratos	(-)
Catalasa	(+)
MR	(-)
VP	(-)
O/F	(F)
Motilidad	(-)
SIM H_2S	(-)
Indol	(-)
Glucosa	(+)
Lactosa	(+/-)
Maltosa	(+)
Sucrosa	(-)
Manitol	(+)
Salicin	(-)
Trehalosa	(-)
Xilosa	(-)
Manosa	(-)
Arabinosa	(-)
Galactosa	(-)
Sacarosa	(-)
Rafinosa	(-)
Ramnosa	(-)

c) Efecto de la Toxina Sobre el sistema Hemolítico.

Después de la incubación de las tres preparaciones de exotoxina, con los eritrocitos de las diferentes especies de animales domésticos y roedores de laboratorio, en las variantes del Ensayo Hemolítico, se pudo detectar que la actividad de la toxina ocasionaba una lisis celular parcial.

El experimento se llevó a cabo en dos ocasiones empleando los eritrocitos de bovino, ovino, caprino y conejo, pero solamente una vez cuando fueron utilizados los de cuye y ratón, ya que en éstos dos últimos se presentaron dificultades desde el momento de la obtención de la sangre y en el momento de su elaboración los medios se hemolizaban completamente.

Los resultados que se obtuvieron se encuentran descritos en las figuras de las páginas siguientes y no se observaron diferencias entre las dos pruebas.

En ellas aparecen hacia el lado izquierdo los resultados de la primera prueba, con la preparación utilizada y su halo hemolítico correspondiente; mientras que a la derecha aparecen en el mismo orden las dimensiones del halo respectivo de la segunda prueba, donde a simple vista no se aprecian diferencias en su diámetro.

EC = extracto crudo.
F100 = filtrado de 100,000 Daltons
F10 = filtrado de 10,000 Daltons

Fig.1 Hematíes de bovino

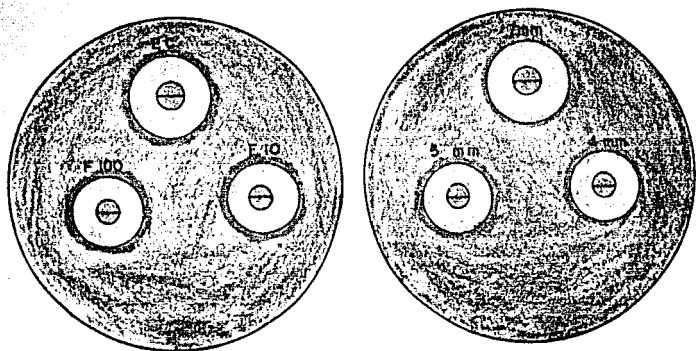


Fig 2 Hematíes de ovino

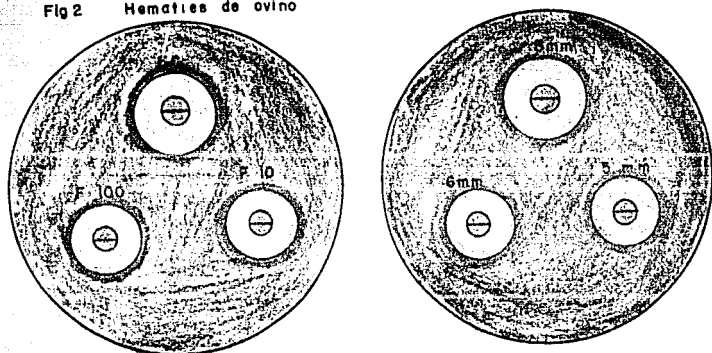


Fig. 3 Hematias de caprino

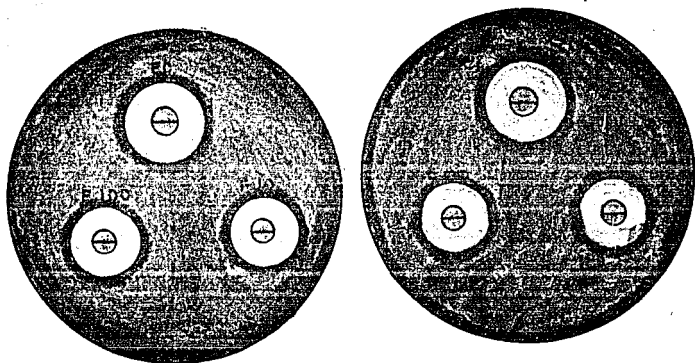
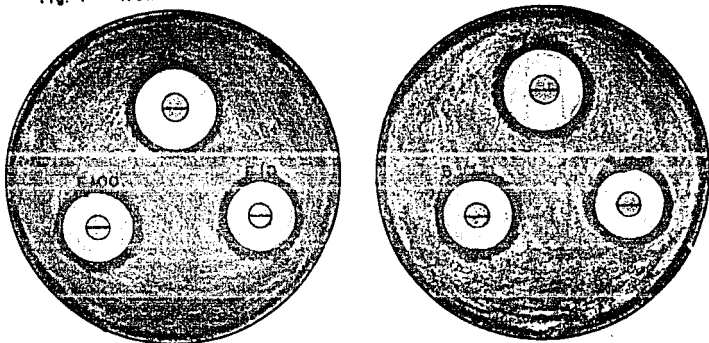


Fig. 4 Hematias de conejo



V. DISCUSION

Al realizar los aislamientos de Corynebacterium ovis suplementando el medio con el 10% de sangre, microscópicamente se observó - su morfología característica, en cambio si sólo se empleaba el 5%, - éste se desarrollaba en menor cantidad y adoptaba una forma cocoide. Esto puede deberse a que la bacteria es muy exigente en nutrientes para su desarrollo.

Durante la obtención de la toxina se tuvieron presentes aquellos aspectos que, Mendoza (1986) considera en su trabajo, al mencionar que: todas las exotoxinas bacterianas encontradas han resultado ser proteínas; son excretadas por los microorganismos que las producen al medio en el que se desarrollan; su concentración en la mayoría de los casos parece ser paralela al crecimiento bacteriano; son polipéptidos de 10,000 a 900,000 D; producen efecto tóxicos altamente específicos en ciertos tejidos; no producen fiebre en el huésped; son poco estables; pierden rápidamente toxicidad por calor a los 60°C y en forma similar se alteran con la temperatura ordinaria o por la exposición a la luz ultravioleta; pueden ser convertidos en toxoides antigénicos.

Después que se obtuvo la toxina y fue probada sobre el sistema hemolítico, se pudo apreciar que existe muy poca diferencia en el grado de hemólisis que se presenta entre las 3 preparaciones; lo que sugiere que son varios los componentes tóxicos que posee ésta bacteria y que parte de ellos pueden separarse por filtración debi-

do a que difieren en su peso molecular. También se observó un ligero aumento en la lisis de los eritrocitos de ovino por la toxina, - posiblemente se deba a que como sabemos, los ovinos son especialmente susceptibles a los efectos de la toxina y a la bacteria "in vivo". Por otra parte se abandonó el empleo de los eritrocitos de cuy y - ratón en éste sistema, porque la obtención de las muestras sanguíneas son más difíciles y traumáticas, además de que éstas células - tienen la peculiaridad de ser muy frágiles.

También cabe resaltar que aunque la hemólisis fue detectable y medible, no alcanzó las magnitudes que otros autores mencionan en - estudios preliminares, cuando emplearon otras variantes del sistema con eritrocitos que habían sido previamente sensibilizados con cepas de Staphylococcus peoria o Rhodococcus equi.

Se estima que las pérdidas económicas por Linfadenitis Caseosa en la industria pecuaria son cuantiosas, sin embargo, en nuestro - país poco se ha hecho para aminorar esas pérdidas, debido a que se desconocen todavía muchos aspectos de la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

1.- Se considera a la Linfadenitis Caseosa como una de las enfermedades infecciosas que más afectan a los pequeños rumiantes, dando lugar a una merma en la producción de los rebaños y a numerosos decomisos a nivel de rastro; por lo que se requieren estudios detallados que determinen el impacto de este padecimiento en la economía nacional.

2.- En el presente trabajo se cubrió el objetivo de lograr la obtención de la toxina de Corynebacterium ovis, la cual puede disponerse para realizar estudios posteriores.

3.- El Ensayo Hemolítico es un método cuantitativo de la actividad de la exotoxina "in vitro" para estudios de la patogenicidad del microorganismo. Sin embargo, se pudo apreciar que para poder lograr un mayor grado de hemólisis, los eritrocitos empleados deberán ser tratados previamente con una cepa sensibilizadora en acorde con los reportes de otros autores.

4.- Los eritrocitos de ovino, caprino, bovino y conejo, son de similar utilidad en la detección de la actividad hemolítica de la toxina de Corynebacterium ovis.

5.- Nuestros resultados obtenidos en la presente investigación producto de la utilización de 3 fracciones de sobrenadante, sugieren la existencia de diversas fracciones tóxicas que deben estar

relacionadas con la patogenicidad y antigenicidad de la bacteria. - De aquí deriva la necesidad de lograr purificar e identificar plenamente sus componentes, con miras a estimular los mecanismos inmunológicos, para la profilaxis y control de la enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Addo, P.B.(1979). Pathology and bacteriology of abortion in sheep experimentally infected with Corynebacterium pseudotuberculosis. Bull. An.Hilth.Afr.27 (4):257-262
- 2.- Arbiza Aguirre, S.I.(1986). Producción de Caprinos. 1a. Edición, AGT Editor.
- 3.- Ashfaq, M.K. and Campbell, S.G.(1979). A survey of Caseous Lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. Agri. Pract. Vet. Med. Small Anim. Clin. 1161-1165.
- 4.- Ashfaq, M.K. and Campbell, S.G.(1980). Experimentally induced Caseous Lymphadenitis in goats. Am. J. Vet. Res. 41 (11): 1789-1792.
- 5.- Awad, F.I.; El-Molla, A.A.; Shawkat, M.E.A.; Arab, R.M.(1979). Isolation and identification of Corynebacterium ovis from sheep in Egypt. Egyptian J.Vet.Sci. 14 (1): 7-24.
- 6.- Ayers, J.L. (1977). Caseous Lymphadenitis in goats and sheep: A review of diagnosis, pathogenesis and immunity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171 (12) : 1251-1254.
- 7.- Blood, D.C. y Henderson, J.A.(1985). Linfadenitis Caseosa de los ovinos en Medicina Veterinaria. 5a. Edic., Ed. Interamericana. pp. 439-440.
- 8.- Brogden, K.A., Cutlip, R.C. and Lehmkühl, H.D.(1984). Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis infection in lambs. Am. J. Vet. Res. 45 (8): 1532-1534.

- 9.- Brown, C.C., Olander, H.J., Biberstein, E.L. and Moreno, D. (1985). Serologic response and lesions in goats experimentally infected with Corynebacterium pseudotuberculosis of caprine and equine origins. Am. J. Vet. Res. 46 (11) : 2322-2326.
- 10.- Burrell, D.H.(1978). Experimental induction of Caseous Lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of Corynebacterium ovis. Res. Vet. Sci. 24 : 269-276.
- 11.- Burrell, D.H.(1980a). A haemolysis inhibition test for detection of antibody to Corynebacterium ovis exotoxin. Res. Vet. Sci. 28 : 190-194.
- 12.- Burrell, D.H.(1980b). In vitro direct haemagglutination by Corynebacterium ovis exotoxin. Res. Vet. Sci. 28 : 51-54.
- 13.- Burrell, D.H.(1980c). A simplified double immunodiffusion technique for detection of Corynebacterium ovis antitoxin. Res. Vet. Sci. 28 : 234-237.
- 14.- Cameron, C.M. and Buchan, L.(1966). Identification of the protective and toxic antigens of Corynebacterium pseudotuberculosis. Onderstepoort J. Vet. Res. 33: 39-48.
- 15.- Cameron, C.M. and Smith Maria, C.(1970). Relationship of Corynebacterium pseudotuberculosis protoplasmic toxin to the exotoxin. Onderstepoort J. Vet. Res. 37: 97-104.
- 16.- Carne, H.R. and Onon, E.O.(1978). Action of Corynebacterium ovis exotoxin on endothelial cells of blood vessels. Nature 271 : 246-248.

- 17.- Carter, G.R.(1985). Corynebacterium ovis en Bacteriología y Micología Veterinaria. 2a. Edic. Ed. El Manual Moderno. pp. 127-130.
- 18.- Córdova, P.R. y García, T.R.(1985). Manual Ilustrado de las Técnicas de Laboratorio Utilizadas en Microbiología Veterinaria: Bacteriología y Micología. Tesis de Licenciatura, FES-Cuautitlán, UNAM.
- 19.- Cowan, S.T. y Steel, K.J.(1979). Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. 1a. Edic. CECSA. pp. 217-220.
- 20.- Davis, D. y Dulbecco(1985). Corynebacterias en Tratado de Microbiología. 3a. Edic. Salvat Editores, pp. 482-488.
- 21.- Doty,R.B.(1964). A comparisson of toxins produced by various isolates of Corynebacterium pseudotuberculosis and the development of a diagnostic skin test for Caseous Lymphadenitis of sheep and goats. Am. J. Vet. Res. 25: 1679-1685.
- 22.- Ellis, J.A.(1983). Ovine Caseous Lymphadenitis. Cont. Educ. - Art. # 10. 5 (9) : 504-510.
- 23.- Engullo,G.V.M.(1985).Aspectos Clínicos de la Verminosis Gastroentérica en Ovinos con Infestación Natural e Inducida. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM.
- 24.- Estrada, Ch.J.I.(1986). Estudio de la Heredabilidad de la Característica de Peso al Nacimiento y Efecto del Sexo en Ganado Ovino de la Raza Suffolk. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM.

- 25.- Frappe, M.C.R.(1981). Linfadenitis Caseosa en Manual de Infec-
tología Veterinaria. 1a. Edic. Ed. Francisco Méndez
Oteo. pp. 65-67.
- 26.- Gail, C.(1981). Caseous Lymphadenitis in Goat Production. Ed.
Academic Press London. pp. 455-460.
- 27.- García, V.S.(1980). Aislamiento y Caracterización de Corinebac-
terias de Muestras de Ovinos y Caprinos en México. -
Tesis de Licenciatura. ENEP-Cuautitlán. UNAM.
- 28.- Goel, M.C. And Singh, I.P.(1972). Purification and Characteri-
zation of Corynebacterium ovis Exotoxin. J. Comp. Pa-
thol. 82 : 345-353.
- 29.- Hagan y Bruner(1983). Linfadenitis Caseosa en Enfermedades In-
fecciosas de los Animales Domésticos. 4a. Edic. Ed. -
Prensa Médica Mexicana. pp. 213-215.
- 30.- Haberman Jules, J.(1977). Linfadenitis Caseosa en Manual de --
Veterinaria para Granjeros y Avicultores. 12a. Edic.
Edi. CECSA. pp. 204-205.
- 31.- Hard, G.C.(1970). Adoptive transfer of immunity in experimen-
tal Corynebacterium ovis infection. J. Comp. Pathol.
80 : 329-334.
- 32.- Hiepe, T.H.(1972). Linfadenitis Caseosa en Enfermedades de la
Oveja. 4a. Edic. Ed. Acribia. pp. 160-162.

- 33.- Hsu, T.Y.(1985). Corynebacterium pseudotuberculosis Exotoxin.- Fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral Administration of preparations containing exotoxin. Am. J. Vet. Res. 46 : - 1206-1211.
- 34.- Husband, A.J. and Watson, D.L.(1977). Immunological events in the popliteal lymph node of sheep following injection of live or killed Corynebacterium ovis into an afferent popliteal lymphatic duct. Aust. Res. Vet. Sci. 22 : 95-112.
- 35.- Jansen, B.C.(1980). The aetiology of ram epididymitis. Onderstepoort J. Vet. Res. 47 : 101-107.
- 36.- Jawetz, E. y Melnick, J.L.(1983). Corynebacteria en Microbiología Médica. 10a. Edic. Ed. El Manual Moderno. pp. 217-220.
- 37.- Jensen, R.(1982). Caseous Lymphadenitis in Diseases of Sheep. - 2nd. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, USA. 313-315.
- 38.- Jolly, R.D.(1965). The pathogenic action of the exotoxin of - Corynebacterium ovis. J.Comp. Pathol. 75 : 417-431.
- 39.- Jubb, K.V.F. y Kennedy, C.P.(1979). Linfadenitis Caseosa en Patología de los Animales Domésticos. 3a. Edic. Ed. Labor. 1 : 440-442.
- 40.- Lovell, R. and Zaki, M.M.(1966). Studies on growth products of Corynebacterium ovis. Res. Vet. Sci. 7 : 302-306.
- 41.- Lund, A., Almid, T., Larsen, H.J. and Steine, T.(1982a). Antibodies to Corynebacterium pseudotuberculosis in adult

- goats from a naturally infected herd. *Acta Vet. Scand.* 23 : 473-482.
- 42.- Lund, A., Aldmid, T., Syeine, T. and Larsen, H.J.(1982b). Colostral transfer in the goat of antibodies against *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the antibody stayus of kids during the first 10 months of life. *Acta Vet. Sc.* 23 : 475-489.
- 43.- Manninger, R., Mocsy, J.(1968). Pseudotuberculosis de los Ovinos en Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos, Ed. Labor. pp. 739-741.
- 44.- Mayfield, M.A., and Martin, M.T.(1979). *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Texas horses. *Southwestern Vet.* 32 : 133-136.
- 45.- Mac Faddin, J.F.(1976). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. The Williams and Wilkins Company - Baltimore, pp. 311.
- 46.- Mendoza, E.S.E.(1986). Localización del Gene Responsable de la Producción de la Exotoxina de *Pasteurella multocida* Tipo D. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM.
- 47.- Merck.(1981). Linfadenitis Caseosa en Manual Merck de Veterinaria. 2a. Edic. Ed. Merck and Co. 1 : 283-285.
- 48.- Montiel, R.M.H. y Vargas, B.A.J.(1985). Presentación de la pubertad en cabras alpinas bajo dos regimenes alimenticios. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM.

- 49.- Muckle, C.A. and Gyles, C.L.(1983). Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of Corynebacterium pseudotuberculosis in mice. Am. J. Vet. Res. 44: 1149-1153.
- 50.- Nagy, G.(1976). Caseous Lymphadenitis in sheep. Methods of infection. J. S.Afr. Vet. Assoc. 47 (3) : 197-199.
- 51.- Nairn, M.E.(1974). Corynebacterium pseudotuberculosis infection of sheep; role of skin lesion and dipping fluids. - Aust. Vet. J. 50 : 537-542.
- 52.- Nelson, A.M.Q.(1970). Estudio Clínico de la Linfadenitis Caseosa en Caprinos de Venezuela Criollos e Importados. -- Rev. Med. Vet. XIII : 245-264.
- 53.- Onon, E.(1979). Purification and partial characterization of the exotoxin of Corynebacterium ovis. Biochem. J. - 177 : 181-186.
- 54.- Pijoan, C., Cíprían, C. y Lastra, A.G.(1978). Manual de Identificación de Bacterias de Interés Veterinario. 2a. Edic. ENEP-Cuautitlán, UNAM.
- 55.- Pijoan, P. y Tórtora, J.(1985). Linfadenitis Caseosa en Principales Enfermedades de los Ovinos y Caprinos. 1a. Edic. Ed. Pijoan y Tórtora.
- 56.- Quittet, E.(1982). La Cabra: Guía Práctica Para el Ganadero. - Ed. Mundi. Prensa Madrid España. pp. 260-261.
- 57.- Ramírez, C.I.C.(1987). Linfadenitis Caseosa en Ovinos y Caprinos en Bases de la Cría Ovina. Memoria del II Curso - AVDES, pp. 123-124.

- 58.- Renshaw, H.W., Graff, V.P. and Gates, N.L.(1979). Visceral Caseous Lymphadenitis in the thin ewe syndrome: Isolation of Corynebacterium, Staphylococcus and Moraxella ssp. from internal abscesses in emaciated ewes. *Am. J. Vet. Res.* 40 : 1110-1114.
- 59.- Richard, Y., Fontaine, M. AND Oudar, J.(1979). Epidemiological Study and Pathogenesis of Caseous Lymphadenitis of Sheep in France. *Comp. Imm. Mic. Inf. Dis.* 2 (1) : 125-148.
- 60.- Runnells, R.A., Monlux, S.W. y Monlux, W.A.(1980). Linfadenitis Caseosa en Principios de Patología Veterinaria. 1a. Edic. Ed. CECSA. pp. 426-428.
- 61.- Sastre, O.J.L.(1985). Determinación de las Principales Características de la Lana de Ovejas Corriedale de Importación de la Unidad Ovina Hueyotlipan Tlaxcala. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM.
- 62.- Sharma, D.N., Dwivedi, J.N.(1977). Pseudotuberculosis lesions in lungs of sheep and goats. *Indian J. An. Sci.* 46 (12) : 663-665.
- 63.- Shigidi, M.T.A.(1978). An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of Corynebacterium ovis infection in sheep. *Res. Vet. Sci.* 24 : 57-60.
- 64.- Smith, A.H. y Jones, C.T.(1983). Linfadenitis Caseosa en Patología Veterinaria. 4a. Edic. Ed. Hispanoamericana. - pp. 423-425.

- 65.- Stoops, S.G., Renshaw, H.W. and Thilsted, J.P.(1984). Ovine Caseous Lymphadenitis: Disease prevalence, lesion distribution and thoracic manifestation in a population of mature culled sheep from western United States. - Am. J. Vet. Res. 45 (3) : 557-561.
- 66.- Tashjian, J.J. and Campbell, S.G.(1983). Interaction between caprine macrophages and Corynebacterium pseudotuberculosis : An electron microscopic study. Am. J. Vet. Res. 44 (4) : 690-693.
- 67.- Unanlian, M.M., Feliciano Silva, A.E.D. and Pant, K.P.(1985). - Abscesses and Caseous Lymphadenitis in Goats in Tropical Semi-Arid North-East Brazil. Trop. An. Hlth. Prod. 17 : 57-62.
- 68.- Valero, E.G. y Trigo, T.F.J.(1980). Atlas de Patología Pulmonar con Referencia Especial a las Enfermedades más Comunes de los Bovinos, Ovinos y Cerdos en México. - BNEP-Cuautitlán, UNAM.
- 69.- Vázquez, L.L.A.(1986). Estudio Sanitario y del Funcionamiento del Rastro y Frigorífico de Ferrería en el Departamento de Ovinos y Caprinos. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM.
- 70.- Williams, C.S.F.(1980). Differential Diagnosis of Caseous Lymphadenitis in the Goat. Agri. Pract. Vet. Med./Sm. An. Cl. : 1165-1170.