

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**ESTABLECIMIENTO DE UNA PRUEBA DE ELISA  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LINFADENITIS  
CASEOSA EN CABRAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
MIRNA PATRICIA URQUIZA PÉREZ**

**ASESORES:  
MVZ. SUSANA ELVIRA GARCÍA VÁZQUEZ  
DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Establecimiento de una prueba de ELISA para el diagnóstico de Linfadenitis Caseosa en Cabras.

que presenta la pasante: Mirna Patricia Urquiza Pérez  
con número de cuenta: 088020848 para obtener el título de:  
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalih, Méx. a 05 de Diciembre de 2006.

PRESIDENTE	<u>MVZ. Susana Elvira García Vázquez</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Virginia Citlali Hernández Valle</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Jorge Luis Tórtora Pérez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Arturo Carmona Ocañas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Juan S. Barrientos Padilla</u>	

Autorización para el uso de los recursos de la  
UNAF para el pago del seguro de vida el  
CORPAC (Caja Costarricense de Seguro Social).

NO. Mirna Patricia Uiqueza  
Pérez.

FECHA: 19 / Febrero / 2007

FIRMA: 

*Gracias a Dios por permitirme llegar al final de un camino y poder comenzar otro lleno de ilusión y esperanza.*

*A mi madre, María Pérez, gracias por tu gran amor, paciencia y comprensión; por ser el motivo que me lleva a seguir adelante, por que me has enseñado que con esfuerzo y coraje se puede realizar cualquier sueño, a ti va dedicada esta realidad.*

*A la memoria de mi padre, José Urquiza, por ser el ángel que siempre me acompaña, gracias por tu cariño y enseñanzas, siempre estarás en mi corazón y mis pensamientos.*

*A mis hermanas, Verónica, Edwin y Edgar, y a mi sobrino Edgar, gracias por su cariño y la ayuda que siempre me han brindado y porque a pesar de todas las dificultades hemos permanecido unidos.*

*A Lino, Tomás, Katia, Álvaro, Patty, Alma y Quique, gracias por su amistad y por todos aquellos momentos que compartimos juntos.*

## ÍNDICE.

### RESUMEN

	<b>Página</b>
<b>I) Introducción</b>	1
1) Linfadenitis caseosa	1
a) Agente etiológico	1
b) Especies afectadas	2
c) Distribución geográfica	3
d) Predisposición racial	3
e) Influencia de la edad	4
f) Otras determinantes	4
g) Patogenia	6
h) Respuesta inmunitaria	8
i) Acción patógena de la exotoxina	9
i. 1. Vasculopatía ecotóxica	9
i. 1. a. Lesiones en el sitio de entrada	9
i. 1. b. Lesiones viscerales	10
i. 1. c. Colapso circulatorio	10
j) Acción hemolítica	10
k) Acción metabólica a nivel plasmático	10
l) Acción necrótica	11
m) Diagnóstico	11
n) Tratamiento	18
ñ) Prevención	18
o) Control	19
p) Erradicación	19
<b>II. Objetivos</b>	21
<b>III. Hipótesis</b>	22
<b>IV. Material</b>	23
<b>V. Método</b>	24
<b>VI. Resultados</b>	32
<b>VII. Discusión</b>	36
<b>VIII. Conclusiones</b>	41
<b>IX. Apéndice</b>	42
<b>X. Bibliografía</b>	44

<b>XI. Índice de cuadros y figuras</b>	
<b>XI. I.</b> Cuadro 1. Diferencias patogénicas entre caprinos y ovinos	2
<b>XI. II.</b> Cuadro 2. Tipos de vacunas	19
<b>XI. III.</b> Cuadro 3. Prueba de dermonecrosis	27
<b>XI. IV.</b> Cuadro 4. Producción de un suero hiperinmune	29
<b>XI. V.</b> Cuadro 5. Pruebas empleadas para la identificación de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	32
<b>XI. VI.</b> Cuadro 6. Resultados de la prueba de dermonecrosis	33
<b>XI. VII.</b> Cuadro 7. Resultados de la prueba de Bradford	33
<b>XI. VIII.</b> Figura 1. Electroforesis en PAGE del concentrado de la exotoxina de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	34
<b>XI. IX.</b> Cuadro 8. Resultados de ELISA Indirecta	35

## RESUMEN

La Linfadenitis Caseosa es una enfermedad caracterizada por la formación de lesiones caseosas y purulentas principalmente en linfonodos y ocasionalmente en órganos internos, es responsable de importantes pérdidas económicas en la industria ovina y caprina y su diagnóstico generalmente se basa en la exploración y palpación minuciosa de los linfonodos superficiales, esto puede tener poco en la detección de lesiones tempranas y en los casos en los que se presenten lesiones viscerales sin antecedentes clínicos de infección periférica, detectándose casi siempre la enfermedad a nivel de rastro con la presencia de linfonodos voluminosos con exudado purulento y caseoso.

Este trabajo se realizó con el objetivo de emplear la prueba de ELISA Indirecta, que utiliza un anti-IgG de rumiante marcado con una enzima para detectar anticuerpos contra la fosfolipasa D de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

En éste estudio serológico, se emplearon 57 muestras de caprinos procedentes de Celaya, Guanajuato y 33 del Municipio de Cortazar, Guanajuato. La cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* se aisló de muestras de biopsias de los linfonodos afectados o a partir de abscesos. La exotoxina se obtuvo a partir del cultivo de la bacteria en medio líquido de PPLO, éste cultivo fue sometido a centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos, separando el paquete celular y el líquido sobrenadante. Este último se sometió a un proceso de concentración, empleándose un sistema de ultrafiltración, utilizando membranas de exclusión de 10 $\mu$ . A éste concentrado se le determinó la cantidad de proteína por medio de la prueba de Bradford encontrándose 88 microgramos por mililitro. Así mismo fue evaluado por electroforesis para determinar su peso molecular, encontrando diferentes bandas: p29, p31.5, p35, p45, p60 y p190 kD.

Para evaluar el efecto de la exotoxina se realizó la prueba biológica de dermonecrosis en cuyes, inoculando 0.3 ml del concentrado intradérmicamente, dándose la prueba por positiva cuando se presentó necrosis en el sitio de inoculación.

En el estudio serológico el criterio de validación de resultados, se basó en el número de actividad de anticuerpos sugerido por el Instituto Pourquier, Francia (Kit de diagnóstico para MAEDI-VISNA) el cual nos dice que el suero menor o igual a 110% se considera negativo, entre 110 y 120% sospechoso y el que sea mayor o igual a 120% será tomado como positivo; de los caprinos de Celaya 6 animales (1.05%) dieron positivo a ELISA Indirecta, 2 (3.5%) resultaron sospechosos y 49 animales (85.96%) dieron negativo; mientras que en los procedentes de Cortazar y El Jaral se encontró que 1 animal (3.22%) resultó positivo, el número de animales sospechoso resultó en 1 (3.22%) mientras que 29 animales (93.54%) dieron negativo a la prueba.



## I. INTRODUCCIÓN

### 1) LINFADENITIS CASEOSA.

La Linfadenitis Caseosa es un padecimiento crónico de cabras y ovejas que se caracteriza por provocar lesiones purulentas y caseosas, principalmente en linfonodos y ocasionalmente en órganos internos como pulmón, hígado, bazo, riñón y corazón; síndrome de debilidad y emaciación progresiva (Pijoan y Tórtora, 1985).

Es una enfermedad que a través del tiempo a recibido nombres como "Pseudotuberculosis", "Chessy Glands" o "Enfermedad de Preisz-Nocard", es considerada una infección de alta prevalencia en los rebaños, pero carente de investigaciones que contribuyan al conocimiento de la enfermedad en nuestro país, aunque a nivel mundial se a investigado desde tiempo atrás (Ramírez *et al*, 1992).

#### a) AGENTE ETIOLÓGICO.

El género *Corynebacterium* está constituido por células pleomórficas, de forma individual o con tendencia a agruparse a manera de empalizadas o "letras chinas", Gram-positivas, inmóviles, aerobias facultativas y no esporuladas. Algunas especies poseen gránulos metacromáticos que son reservas de fosfatos de elevada energía. Crecen en medios de cultivo enriquecidos con suero o sangre. En medios simples, las colonias se presentan opacas, blancas o cenizas, en cuanto a los medios ricos éstas se muestran convexas con una superficie semiopaca. (Cowan y Steel, 1974).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* (antes *Corynebacterium ovis*) agente etiológico de Linfadenitis Caseosa (LC) en cabras y ovejas, es un parásito intracelular facultativo de macrófagos, el cual se ve implicado en enfermedades como linfangitis ulcerativa en caballos y formación de abscesos en muchas otras especies animales (Miers y Ley, 1980).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) es un microorganismo muy resistente en el medio externo, aunque sensible a la luz solar directa y al calor, puede permanecer viable durante meses en la oscuridad y sobrevivir hasta temperaturas de 60° C bajo cero. La bacteria se muestra muy sensible a la desecación, ya sea esta ambiental o específica de las excreciones que lo vehiculan (Benham *et al*, 1962), puede permanecer viable en el suelo y en el material vegetal acumulado durante los meses en que la humedad sea favorable (Benham *et al*, 1962; Schreuder *et al*, 1986).

## b) ESPECIES AFECTADAS.

El ganado caprino es una especie altamente sensible a la acción patógena de *C. pseudotuberculosis* y en la que la LC se presenta con máxima prevalencia (Richard *et al*, 1979). El ovino es otra especie muy sensible (Benham *et al*, 1962; Schummer *et al*, 1981). Entre ambas surgen diferencias patogénicas y epidemiológicas que pueden definirse en:

Cuadro 1. DIFERENCIAS PATOGENICAS ENTRE CAPRINOS Y OVINOS.

	CAPRINOS	OVINOS
Principales ganglios linfáticos afectados	- Mandibulares - Parotídeos - Retrofaringeos - Cervical superficial	- Inguinal superficial - Poplíteo - Mediastínicos - Bronquiales
Características del exudado	- Pastoso, dentro de una cápsula fibrosa	-Material purulento granuloso rodeado de capas fibrosas concéntricas (lesión en cebolla)
Cuadro anatomoclínico	- Linfadenitis caseosa	- Pseudotuberculosis

Modificado de Cubero *et al*, 2002.

Sin embargo estas diferencias pueden variar dependiendo del lugar por donde penetre el agente, el tipo de explotación y la forma de cría.

*C. pseudotuberculosis* es muy poco patógeno para la especie humana, aunque se ha comprobado que es capaz de causar linfadenitis en el hombre, principalmente en aquellos que tienen contacto directo con animales afectados. La enfermedad es considerada una zoonosis de baja prevalencia (Henderson, 1979; López *et al*, 1966).

El mayor efecto de la enfermedad radica en las pérdidas económicas que son provocadas por una pobre producción de lana, baja de peso corporal y disminución de la eficiencia reproductiva (Ellis *et al*, 1991). La LC es una infección endémica económicamente importante de los caprinocultores en México y otros países (Espinoza y Tórtora, 1992).

### c) DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

*C. pseudotuberculosis* es un microorganismo cosmopolita, y la pseudotuberculosis es una enfermedad con un fuerte significado a nivel mundial (Benham *et al.*, 1962; Richard *et al.*, 1979), a causa de su elevada prevalencia y por originar importantes pérdidas económicas en la industria caprina y ovina (Skalka *et al.*, 1998). Su presentación se asocia con las áreas geográficas de alta producción (Richard *et al.*, 1979; Brown y Olander, 1987). Desde Australia (Paton *et al.*, 1994) a Sudáfrica (Naim *et al.*, 1977), Estados Unidos de Norteamérica (Ashfaq y Campbell, 1980) y Brasil (Kuria *et al.*, 2001; Unanian *et al.*, 1985), además de Europa; pero también en otros como Japón (Nakamura *et al.*, 1981) o Canadá (Stanford *et al.*, 1998) donde la explotación de los pequeños rumiantes carece de importancia. Se acepta que la sola existencia de poblaciones caprinas y ovinas conlleva a la comparecencia de esta enfermedad; y que solo la falta de estudios pertinentes explica que en muchos países no haya sido comunicada (Brown y Olander, 1987; Couterau y Laval, 1974).

La frecuencia de presentación en cada región o país depende principalmente de la densidad animal y del sistema de explotación. Es una enfermedad muy extendida pero escasamente notificada. El ganadero no informa al veterinario sobre la presencia de abscesos externos en su ganadería y los veterinarios no reseñan los decomisos parciales, sino que solo notifican la enfermedad cuando practican el decomiso total de la canal por la existencia de abscesos internos muy extendidos (Rizvi *et al.*, 1997).

El agente responsable de la enfermedad está muy diseminado por todo el ambiente que rodea directamente al ganado, persiste durante varias semanas sobre el suelo, en la cama del establo, muros y en el material de la explotación ganadera: bebederos, pesebres, collares de sujeción al comedero, puertas de pasillos (Richard *et al.*, 1979; Nakamura *et al.*, 1981). En general, la capacidad de supervivencia en el medio ambiente es suficiente para asegurar su persistencia (Miers y Ley, 1980; Smith *et al.*, 1997; Winter, 1997).

### d) PREDISPOSICIÓN RACIAL.

No existe raza alguna de cabras o de ovejas que se muestre refractaria al padecimiento de la pseudotuberculosis en cualquiera de sus formas clínicas. Pero sí resulta evidente que algunas razas parecen más susceptibles a sufrirla. En parte, existe un factor constitucional de base genética ligado a la raza; la reducción del grosor de la piel, que se acompaña de una particular calidad del tejido conjuntivo y finura de la dermis (Richard *et al.*, 1979).

Otros factores de aparente predisposición étnica son causalmente confusos; ya que su intervención predisponente estriba en la utilización zootécnica que de la raza en cuestión se hace. Tal es el caso de la predisposición de las razas lecheras a padecer con mayor prevalencia mastitis pseudotuberculosas que las razas de aptitud cárnica. Mientras que la linfadenitis caseosa resulta esporádica en el ganado cabrío extensivo en las

explotaciones intensivas la prevalencia es elevada. Se atribuye esta predisposición a la supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en los locales, suelos, pasillos y utensilios (Schreuder *et al*, 1986). El manejo intensivo usado en los animales lecheros dio origen a que la transmisión de las bacterias fuera más fácil entre las cabras confinadas ya que éste sistema es propicio para la presencia de múltiples heridas que sirvan de entrada a la infección, y también porque el ordeño representa en sí mismo un modo fácil de transmisión. Debido a la popularidad creciente en la producción de cabras para leche y de su transporte desde un área a otra se ha abierto un terreno viable para la transmisión de esta enfermedad a todas las razas de cabras. Los cruces de razas lecheras con razas de carne han facilitado aún más la probabilidad de los contagios y la diseminación de la linfadenitis caseosa. No ligado a la raza, pero sí a líneas genéticas, se encuentran ciertos determinantes de predisposición (Millot, 1989).

#### **e) INFLUENCIA DE LA EDAD.**

No hay un límite etario en la receptividad a la infección por *C. pseudotuberculosis*, pues en condiciones de alta contaminación o si maman de una hembra con mastitis pseudotuberculosa los animales se infectan desde muy jóvenes. Pero, si bien es cierto que, debido al prolongado periodo de incubación y al inicio de la enfermedad, los típicos abscesos de la linfadenitis y la pseudotuberculosis respiratoria suelen manifestarse pasados varios meses después del contagio (León, 1985). Las cabras y corderos se muestran sensibles a las formas agudas de pseudotuberculosis, en especial a la anemia hemolítica exotóxica. Pero en la práctica resulta poco frecuente que ocurra este padecimiento en animales menores de tres meses (Hsu *et al*, 1985; Winter, 1997), y muy raro en los lactantes. Esto se debe a que los anticuerpos calostroales anti-*C. pseudotuberculosis*, que son activamente antihemolíticos, persisten en el plasma hemolinfático al menos 12 días (a condición de que la madre haya desarrollado inmunidad frente a las corinebacterias). De hecho no se detectan diferencias significativas entre los títulos de antitoxina en los sueros de cabritos y en el calostro de sus madres (Nakamura *et al*, 1981). Aunque se han apreciado lesiones en animales de cuatro meses de edad la pseudotuberculosis es propia de animales adultos (Addo y Dennis, 1977; Brown y Olander, 1987). Con el transcurso del tiempo se van acumulando en los individuos las oportunidades de infectarse. Esta razón justifica que conforme aumenta la edad se asista a un incremento, con matices, en la frecuencia tanto de la infección como de la enfermedad (Brodgen *et al*, 1985; Daines y Austin, 1932; Richard *et al*, 1979).

#### **f) OTRAS DETERMINANTES.**

En general, el comportamiento y los hábitos de cada especie hospedadora influyen, a veces de manera determinante, en la susceptibilidad y en las manifestaciones de la enfermedad. Por ejemplo, una relevancia especial encierran las pugnas corporales para establecer el *status* de dominancia dentro del rebaño, ya que son origen de heridas, sobre todo entre machos por estar dotados de cuernos. Las heridas significan vías de entrada para la infección (Benham *et al*, 1962; Knight, 1978).

La inmunodepresión representa un factor predisponente para la difusión orgánica de las corinebacterias a partir de la vía de entrada. El estrés es capaz de iniciar las manifestaciones clínicas de la enfermedad en un animal con infección latente. La mala alimentación, las parasitosis y otras enfermedades concomitantes producen situaciones inmunodepresivas en el individuo que facilitan la diseminación del germen por el organismo (Smith *et al*, 1997).

Los factores ambientales juegan un importante papel en la epidemiología de la enfermedad (Miers y Ley, 1980). El hábitat en que se desenvuelven las especies receptivas es determinante para que se produzca la infección. La infección por *C. pseudotuberculosis* en la población está relacionada con el hacinamiento, tanto en la cabra, la oveja (Schreuder *et al*, 1986), o en el caballo (Knigh, 1978; Smith, 1966) como en cualquier otra especie. En este sentido, el modelo de explotación intensiva basado en una alta densidad animal (Richard *et al*, 1979; Schreuder *et al*, 1986) eleva la frecuencia de la enfermedad, por que se producen con facilidad luchas por la dominancia entre los animales (Smith, 1966).

La explotación extensiva arrastra factores de riesgo específico pero de inferior trascendencia a los inherentes de las ganaderías intensivas. Son los arañazos y otras lesiones menores de la piel adquiridas en el pastoreo en zonas con arbustos espinosos las que determinan la infección (Smith *et al*, 1997 y Williams, 1981).

Por último, las prácticas de concurrencia entre rebaños y entre individuos de procedencias varias, en pastos, ferias de ganado, mercados, etc., posibilitan la difusión geográfica de la infección (Benham *et al*, 1962).

Entre los factores de riesgo que favorecen la infección se incluyen todas las intervenciones en masa sobre los animales, tales como las operaciones quirúrgicas (caudotomía de los corderos, castración), las intervenciones sanitarias (inyecciones parenterales, baños antiparasitarios), las prácticas zootécnicas traumatizantes directamente (esquila, marcado) o como consecuencia indirecta (concentración de gran número de animales en locales poco higiénicos, amarre diario para el ordeño) y, por último, los propios medios de producción, tanto aparejos (collares) y equipos (comederos, bebederos, separadores, etc.) como las instalaciones (paredes con superficies hirientes, puertas con bordes metálicos punzantes o afilados u oxidados, etc.) (Benham *et al*, 1962; Brown y Olander, 1987; Burrel, 1981; Richard *et al*, 1979).

La enfermedad puede aparecer indistintamente en animales bien nutridos que en animales con alimentación deficiente. Sin embargo, la administración de complementos minerales y vitamínicos modifican profundamente la frecuencia de abscesos en el curso de semanas y años (Richard *et al*, 1979). La mejora de las condiciones higiénicas en una explotación parece no disminuir la incidencia de la enfermedad de forma notable (Burrel, 1981).

## g) PATOGENIA

La infección por *C. pseudotuberculosis* ocurre normalmente a través de la piel (Naim y Robertson, 1974). Es evidente que cualquier tipo de lesión cutánea facilita la entrada de las corinebacterias (Benham *et al.*, 1962; Burrell, 1981; Holstar, 1986; León, 1985; Richard *et al.*, 1979; Smith, 1966). Cualquier herida de las múltiples que accidentalmente se producen en el ganado junto a las derivadas de las prácticas zootécnicas (esqueleo, marcado de animales, corte de rabo, castración), inyecciones (tratamientos y vacunaciones rutinarias) realizadas sin la debida asepsia entre cada animal (Naim y Robertson, 1974), constituyen una vía de entrada habitual. En la ejecución del esqueleo resulta inevitable que al animal se le produzcan infinidad de pequeñas heridas, muchas submacroscópicas, que son suficientes para que por ellas penetren las corinebacterias (Ashfaq y Campbell, 1980; Brown y Olander, 1987; Burrell, 1981; Richard *et al.*, 1979).

La entrada por vía umbilical es posible por contacto en el momento del nacimiento con camas contaminadas por *C. pseudotuberculosis* o, en el momento del parto, con secreciones infectadas en el canal vaginal (Bair, 1997; Couterau y Laval, 1974; Richard *et al.*, 1979).

Diversas mucosas actúan como vía de entrada llegando a linfonodos regionales (Welsh, 1990). De manera habitual se produce la penetración de *C. pseudotuberculosis* a través de heridas en la mucosa bucal, como las producidas por gramíneas punzantes y otros alimentos groseros (Ashfaq y Campbell, 1980; Burrell, 1981; Richard *et al.*, 1979). Las amígdalas perifaríngeas captan también las bacterias. La mucosa gastroentérica es invadida por las corinebacterias casi exclusivamente en los lactantes. Otra vía de penetración muy importante es el árbol respiratorio (Brown y Olander, 1987) en todos sus tramos. La vía cisternal galactófora posibilita la penetración mediante el ordeño (Smith *et al.*, 1997).

La forma de contaminación del animal hacia el exterior radica, sobre todo, en los abscesos superficiales, pero también, cuando el enfermo padece lesiones respiratorias o mamarias en el exudado bronconeumónico y en la secreción láctea. Otras fuentes orgánicas de *C. pseudotuberculosis*, como el flujo genital, el semen, la placenta y los fetos apenas si contribuyen a la contaminación ambiental específica (Brown y Olander, 1987; Couterau y Laval, 1974; Miers y Ley, 1980; Richard *et al.*, 1979).

El material purulento eliminado a partir de los abscesos es la sustancia orgánica más contaminante (Brown y Olander, 1987; Richard *et al.*, 1979) y, por ende, de mayor relevancia en la difusión de la linfadenitis caseosa. Por una parte, contiene concentraciones muy elevadas de *C. pseudotuberculosis* ( $1.2 \times 10^6$  a  $5.2 \times 10^7$  UFC por gramo); y por otra, el hecho de que las corinebacterias presentes en el exudado se organizan formando agregados (grumos) bacterianos, que resultan especialmente idóneos tanto para su persistencia ambiental como para lograr con éxito la infección (Ashfaq y Campbell, 1980; Brown y Olander, 1987; Ellis *et al.*, 1987; Knight, 1978; Richard *et al.*, 1979; Schreuder *et al.*, 1986).

Los animales con la infección localizada en aparato respiratorio (pulmones, bronquios, tráquea, epiglotis), y carentes de abscesos superficiales, suponen también una importante fuente de infección. Las corinebacterias son excretadas por medio de las secreciones mucopurulentas broncopulmonares, bien eliminadas al toser (nódulos goticulares de Welch), o bien, en el flujo natural de la mucosidad al exterior por los oïares. (Welsh, 1990)

La particular frecuencia de los distintos modos y diversos sitios de la invasión explica por qué los abscesos tienden a presentarse con más asiduidad sobre determinadas regiones corporales. Además, la existencia de focos pseudotuberculosos en determinados órganos, vísceras y nódulos linfáticos sugiere (Schummer *et al*, 1981) la vía de penetración utilizada por el microorganismo (Burrell, 1978; Stoops *et al*, 1984); por ejemplo: la cabeza y el cuello cuando la penetración ocurre a través de piel de la cabeza y cara; hígado y nódulos linfáticos (n.l.) hepáticos si la infección es umbilical; pulmón y los linfocentros (lc.) bronquial y mediastínico en caso de contagio aerógeno; aunque la localización respiratoria puede también tener su origen en la diseminación hemolinfática. Una vez que la bacteria ha penetrado, se multiplica en el tejido subyacente (Ashfaq y Campbell, 1980; Brown *et al*, 1985; Naim y Robertson, 1974).

Las corinebacterias deglutidas son destruidas con facilidad por los ácidos y las enzimas digestivas, motivo por el que no suelen eliminarse con las heces. Tampoco suelen estar presentes en el exudado nasal (Ashfaq y Campbell, 1980).

La infección primaria, en circunstancias favorables, cuando se hace con bajas dosis de bacterias o si la cepa no dispone de una amplia capa lipídica externa, y si tiene lugar en territorios fácilmente accesibles para los macrófagos (amígdalas, mucosa respiratoria) en hospedadores inmunocompetentes, adopta un curso regresivo hacia la resolución en dos a tres semanas (Hard, 1972). En circunstancias opuestas se instaura la infección crónica (Radostits *et al*, 2001).

La difusión secundaria es favorecida por situaciones inmunodepresivas (mala alimentación, parasitosis y otras enfermedades), tras la infección primaria linfonodular sigue una difusión secundaria por vías hemática y linfática (Brogden *et al*, 1985; Nakamura *et al*, 1981), que origina metástasis en vísceras diversas (pulmones sobre todo, hígado, riñones y bazo) (Radostits *et al*, 2001; Hard, 1969; Hard, 1972; Jolly, 1965a; Nakamura, *et al*, 1981). Los microorganismos tienen que superar varios "filtros" linfonodulares antes de localizarse en vísceras (Burrell, 1978). Se sugieren diferencias patogénicas entre la oveja y la cabra con relación tanto a la difusión hemolinfática como al embolismo pulmonar de corinebacterias. En este sentido, respectivamente, las lesiones esplénicas son más comunes en las cabras y las lesiones pulmonares son más frecuentes en las ovejas (Batey, 1986).

Mientras permanecen en el medio extracelular las cepas virulentas, “de campo”, de *C. pseudotuberculosis* resisten la acción inespecífica primero (complemento), y luego, en etapas patogénicas posteriores, específica (inmunoglobulinas) de las sustancias humorales antibacterianas. Pero este microorganismo se comporta esencialmente como una bacteria facultativamente intracelular, caracterizada para la persistencia en el interior del fagocito (Cameron y Flus, 1973; Jolly, 1966), sobre todo en los macrófagos aún no activados por la inmunidad (Hard, 1972). En todo ello interviene la densa capa del lípido externo (similar al *cord factor* o factor de agregación de las micobacterias), que permite la formación de agregados bacterianos en cuyo interior *C. pseudotuberculosis* resiste a las enzimas lisosomales (Muckie, 1983; Jolly, 1966).

La diseminación de *C. pseudotuberculosis* tiene lugar de manera casi inmediata a la infección primaria; y en conjunto, el tejido de la vía de entrada (infección primaria), el nódulo linfático regional (difusión local) y nódulos linfáticos distantes y vísceras (difusión general), intervienen en la resolución de la infección o en el inicio de la fase crónica (Pépin *et al*, 1991).

La exotoxina de *C. pseudotuberculosis* se comporta como un factor de difusión (Pépin *et al*, 1991), que facilita el transporte y la diseminación del microorganismo por vía linfática hasta el estrato linfático inmediato (nódulo linfático regional) (Radostits *et al*, 2001), y propicia el asentamiento de la bacteria en lugares distantes (Brown *et al*, 1986).

El efecto a favor de la difusión bacteriana inducido por la exotoxina se concreta en un incremento de la permeabilidad vascular en el entorno del punto de infección (y de igual manera en otros sitios orgánicos en la posterior fase patogénica de difusión general o visceral) (Carne y Onon, 1978).

#### **h) RESPUESTA INMUNITARIA.**

*C. pseudotuberculosis* es un parásito intracelular facultativo (Jolly, 1965a; Jolly, 1965b; Jolly, 1965c; Jolly, 1966) frente al que se desarrolla una respuesta inmunitaria muy compleja de carácter humoral y celular que no recae sobre un único antígeno sino que es producto de la compleja configuración de la pared bacteriana (Radostits *et al*, 2001; Hard, 1969).

La protección contra bacterias intracelulares está mediada por células. Aunque los macrófagos de animales no inmunizados por lo general no son capaces de destruir estas bacterias, ésta capacidad la adquieren cerca de 10 días después del surgimiento de la infección, cuando los macrófagos se activan. Esta activación está mediada por el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2) liberados de células Th 1 sensibilizadas. La respuesta de estos macrófagos tiende a ser inespecífica, de modo que una vez activados los macrófagos son capaces de destruir una amplia variedad de bacterias normalmente resistentes. El desarrollo de estos macrófagos activados coincide a menudo con la aparición de hipersensibilidad retardada (tipo IV) contra el antígeno administrado por vía intradérmica (Tizzard, 1995).



La inmunidad para *Corynebacterium pseudotuberculosis* es compleja e involucra tanto respuesta inmune humoral como celular; sin embargo, se han realizado varios estudios para una respuesta celular, principalmente tipo Th 1, más que para una respuesta humoral protectora en cabras y borregos (Lan *et al*, 1998; Pepin *et al*, 1997; Alves y Olander, 1999; Simmons *et al*, 1998; Eggleton *et al*, 1991).

Paule *et al*, 2003 realizó un estudio para analizar aspectos de respuesta inmune humoral y celular después de una infección experimental en cabras. Este se llevó a cabo durante 20 semanas encontrando que la respuesta inmune humoral específica contra antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* muestra patrones similares en la producción de IgG, los títulos máximos encontrados se dieron entre los días 11 y 21 pi (post infección) y disminuyendo de forma regular hasta el fin del experimento considerándose serológicamente positivos de los días 6 al 11 pi. Sin embargo las pruebas de detección de anticuerpos pueden fallar en distinguir animales verdaderamente infectados o curados o detectar animales con pequeñas lesiones y bajos títulos de anticuerpos e intensidad de infección (Ellis *et al*, 1990).

Recientemente el uso de una respuesta a IFN- $\gamma$  para la detección de inmunidad por infección de *Corynebacterium pseudotuberculosis* parece ser una prometedora herramienta diagnóstica. La producción de IFN- $\gamma$  presentó una respuesta primaria de corta duración en el día 5 pi lo cual refleja una respuesta innata para IFN- $\gamma$  involucrando principalmente células NK (natural killer) y una respuesta secundaria fuerte y duradera comenzando en el día 16 y disminuyendo en los días 42 al 56 pi lo cual corresponde a una respuesta inmune adquirida mediada por células T. Una explicación de la aparente relación entre los bajos niveles detectables de IFN- $\gamma$  y la protección (no presencia de abscesos) puede ser el resultado del secuestro de la mayoría de las células T sensibilizadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* dentro de los órganos linfoides secundarios o en los sitios de agresión (Buddle *et al*, 1995).

## **i) ACCIÓN PATÓGENA DE LA EXOTOXINA.**

### **i.1. Vasculopatía exotóxica.**

La actividad de la exotoxina, fosfolipasa D, sobre los endotelios conduce a un aumento de la permeabilidad vascular que tiene varias consecuencias patológicas según el lugar y el momento patocrónico (Came y Onon, 1978).

i.1. a. Lesión en el sitio de entrada.- Inicialmente la infección en la vía de entrada conduce a un foco inflamatorio agudo a cuya formación contribuye la exotoxina. La capa córnea superficial de las corinebacterias ayuda a que se formen grandes agregados de células bacterianas las cuales inundan de exotoxina la zona (Muckle, 1983). Consecuencia de ello, es la formación de edemas y hemorragias. Este efecto tóxico es transitorio, de intensidad moderada (Ashfaq y Campbell, 1980), y más notable en la oveja que en la cabra. También, por efecto de la toxemia instaurada desde el lugar de entrada ocurre un breve periodo febril (Brown *et al*, 1985).

i.1. b. Lesiones viscerales.- El asentamiento de las corinebacterias en el parénquima pulmonar o en los riñones, aparte de inducir la formación de focos necróticos causa reacciones edematosas, sobre todo edema de pulmón, y necrosis de los túbulos contorneados proximales de origen tóxico. Estas alteraciones son más intensas en las formas agudas de los animales jóvenes (Schummer, *et al*, 1981).

i.1. c. Colapso circulatorio.- En los casos de intoxicación aguda de cabras y corderos neonatos ocurre la muerte a causa de un colapso circulatorio, debido a una rápida y generalizada alteración de la permeabilidad vascular (Soucek *et al*, 1967).

La explicación patogénica de la anemia y la caquexia en los casos avanzados de pseudotuberculosis se debe a que el FNT (Factor de Necrosis Tumoral) inhibe la síntesis de enzimas necesarias para la captación de lípidos en los preadipocitos ocasionando que los adipocitos maduros pierdan los lípidos almacenados. También estimula el catabolismo de las células musculares y hepatocitos (Tizzard, 1995).

#### **j) ACCIÓN HEMOLÍTICA.**

La producción de una potente exotoxina diferencia a *C. pseudotuberculosis* del resto de las bacterias intracelulares facultativas (Jolly, 1965a). La exotoxina, que tan importante papel desarrolla en la fase inicial aguda (Jolly, 1965c), no parece que intervenga de manera decisiva en la fase crónica de la enfermedad (Pépin *et al*, 1991). Además de contribuir a la instauración y difusión de la infección mediante la alteración de los endotelios vasculares, la exotoxina representa la causa específica de un cuadro agudo de intoxicación (Benham *et al*, 1962) caracterizado por una anemia hemolítica. La esfingomiélin, constituyente de la pared celular de los eritrocitos, es hidrolizada por acción de la exotoxina Fosfolipasa D liberada por *C. pseudotuberculosis* y se transforma mayoritariamente en fosfato de ceramida. Esto conduce a la alteración morfológica y a un estado de fragilidad de estas células, por lo que finalmente se produce la eritrolisis. No obstante, esta circunstancial intoxicación sistémica representa un proceso patogénico de muy limitada trascendencia en la patogenia de la reacción caseosa (Carne y Onon, 1978).

#### **k) ACCIÓN METABÓLICA A NIVEL PLASMÁTICO.**

En la fase de inflamación aguda de la enfermedad, mientras las corinebacterias se están multiplicando en el lugar de entrada y en el nódulo linfático que la drena, la exotoxina puede ser responsable de alteraciones (Hellmann *et al*, 1995), del metabolismo plasmático: elevación de la concentración de heptaglobulina y de cobre, disminución de zinc, disminución de los valores de hemoglobina y del hematocrito (Pépin *et al*, 1991).

## D) ACCIÓN NECRÓTICA.

El efecto necrótico característico de la pseudotuberculosis se produce mediante (a) la intervención, directa de *C. pseudotuberculosis* y por (b) acciones indirectas de naturaleza inmunopatológica. Respecto a la acción patogénica directa de la bacteria, la exotoxina y el lípido externo de membrana actúan en combinación (Blood *et al*, 1979). Por un lado, la (a<sub>1</sub>) **exotoxina** produce necrosis hística por la alteración de las membranas celulares y, sobre todo, de los endotelios. Y, por otro, el (a<sub>2</sub>) lípido externo (**factor piógeno**), que primero desarrolla una intensa acción citotóxica general sobre las estructuras histológicas infectadas y leucotóxica sobre macrófagos y glóbulos blancos, luego, es inductor de una reacción de caseificación de la zona necrosada. Estas acciones se ven complementadas por el efecto lesivo desarrollado sobre los tejidos infectados por los (b<sub>1</sub>) macrófagos y linfocitos T-citotóxicos, así como por las (b<sub>2</sub>) enzimas líticas lisosomales liberadas tras la ruptura de la célula fagocitaria por causa directa del microorganismo (Walker *et al*, 1990).

Reacciones de hipersensibilidad tardía conducen a la persistencia en equilibrio de la infección. La reacción patógena característica es el "nódulo pseudotuberculoso". Su tamaño y también su número son indicadores de un estado de generalización así como un reflejo de la reacción protectora. En su inicio hay un foco granulomatoso con acúmulo de neutrófilos sobre los macrófagos y los linfocitos. La imagen definitiva del nódulo la forman un centro de necrosis purulenta, formado por masas de macrófagos con un citoplasma repleto de corinebacterias (Hard, 1975), rodeado de una delgada capa de linfocitos, células plasmáticas, algunos macrófagos y neutrófilos, y todo envuelto por una red de fibroblastos. Resultan preponderantes los linfocitos T-citotóxicos. El crecimiento concéntrico de la lesión, motivado por crisis inmunodepresivas, provocadas por la infección, implica la necrosis caseosa de la capa celular precedente y la incorporación de otra nueva así mismo envuelta por otra cápsula fibroblástica. Resultado final es la imagen de "lesión en cebolla" (Walker *et al*, 1990).

## m) DIAGNÓSTICO.

Como en tantas otras enfermedades infecciosas, el diagnóstico médico, epidemiológico y patológico proporcionan una concepción presuntiva de la linfadenitis caseosa (pseudotuberculosis), pero no constituyen por sí mismas un método asertivo que permita ni establecer la causa específica de esta enfermedad, ni que logre diferenciarla de otras que con ella se confunden. Se hace preciso en todos los casos el diagnóstico específico, microbiológico e inmunológico (Benham *et al*, 1962; Brown y Olander, 1987; Muckle *et al*, 1992; Richard *et al*, 1979; Smith y Sherman, 1994; Yeruham *et al*, 1997).

Generalmente el diagnóstico de LC se basa en los signos clínicos característicos (presencia de una consistente pero limitada inflamación subcutánea en linfonodos). En un rebaño con historia de linfadenitis, los hallazgos clínicos se pueden evidenciar con la asistencia del laboratorio (Smith y Sherman, 1994).

La lesión macroscópica representada por una laminación concéntrica de la necrosis caseificante, o “lesión de cebolla”, debe de considerarse altamente presuntiva de la infección por *C. pseudotuberculosis*. Pero el análisis morfológico está sometido a ciertas limitaciones: (Benham *et al*, 1962)

#### Linfadenitis caseosa superficial:

- En primer lugar, y como es obvio, la apreciación de las lesiones exige la realización de la necropsia, pero en la mayoría de los casos, la enfermedad aparece tan focalizada en un nódulo y su evolución se muestra tan carente de gravedad, que no justifica al veterinario clínico la eutanasia de un animal por el mero objetivo de la constatación lesional.
- En segundo término, la evolución de la reacción necrótica hacia la fluidificación del exudado purulento limita el periodo de tiempo durante el que es factible el hallazgo de la caseificación laminar concéntrica.
- Y, por último, en la cabra la reacción caseosa aparece dominada por el componente exudativo. La lesión se asemeja más a la provocada en las piobacilosis y estafilococia alejándose de la típica necrosis caseosa “en cebolla”.

#### Linfadenitis caseosa visceral:

- El hallazgo de lesiones típicas de pseudotuberculosis asentadas en órganos internos (visceras, nódulos linfáticos, musculatura y otros) es causa, por un lado, de la necropsia de enfermos afectados o de la inspección en el matadero de animales caquexicos.
- Pero, también, puede constituir un hallazgo, bien, de necropsia de animales examinados para el estudio de procesos clínicos sin relación con la linfadenitis caseosa, o bien, hallazgo de matadero en animales aparentemente sanos.
- Una lesión focal de necrosis caseosa con laminación concéntrica y encapsulamiento fibroso es típica en las infecciones por *C. pseudotuberculosis*. Pero puede incurrir en confusión con la tuberculosis; de ahí que la enfermedad también se denomine “pseudotuberculosis” (falsa tuberculosis). Sin embargo esto no representa un problema diagnóstico en la patología ovina y caprina puesto que la presentación de esta enfermedad es más que excepcional en ambas especies (Benham *et al*, 1962).

En un rebaño donde existen animales con lesiones de linfadenitis purulenta no se presentan hechos epidemiológicos que ayuden a diferenciar la linfadenitis caseosa causada por *C. pseudotuberculosis* (CS) de otras infecciones purulentas de los nódulos linfáticos (linfadenitis por *Arcanobacterium pyogenes* (AP), *Staphylococcus aureus* (SA) u otras causas que no muestran un carácter endémico tan persistente como en el caso de la linfadenitis caseosa (Muckle *et al*, 1992).

## PARÁMETROS EPIZOÓTICOS EN LA EVOLUCIÓN TEMPORAL DE UN FOCO DE LINFADENITIS CASEOSA: ([www.fortdodge.com](http://www.fortdodge.com))

### Incorporación del agente al rebaño:

- Adquisición de animales
- Convivencia temporal de reproductores o del rebaño con un colectivo infectado.
- Utilización de pastos y alojamientos anteriormente ocupados por un colectivo infectado (hasta 4-6 meses).

### Lapso desde la primoinfección hasta la aparición de los primeros casos:

Hasta 4-6 meses.

### Periodo de incremento de la prevalencia puntual:

Durante un prolongado periodo, de tres a cinco años, en el rebaño infectado se van acumulando en incremento el número de casos.

### Periodo epizootico:

Permanece durante tiempo indefinido.

### Brotos epidémicos:

Ocurren brotes de linfadenitis después del esquila, tras intervenciones quirúrgicas colectivas (caudotomías, castraciones, etc.) o posterior a la incorporación de nuevos animales. Otro detalle epidemiológico que orienta, aunque no concluye, la diferenciación entre infecciones linfadeníticas es la edad de los enfermos, LC suele afectar a los adultos (Benham *et al*, 1962; León, 1985; [www.fortdodge.com](http://www.fortdodge.com)).

Como en cualquier otra enfermedad infecciosa el diagnóstico específico de la linfadenitis caseosa viene definido por el aislamiento e identificación de agente microbiano causal (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), conviene enfatizar que se presentan al menos cuatro elementos de ventaja para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad: (Smith y Sherman, 1994)

- Presencia constante de linfadenitis superficiales en el rebaño.
- Lesiones obvias en todas las formas clínicas (superficiales o internas).
- Abundancia de corinebacterias en el material patológico.
- Facilidad de aislamiento e identificación. (Smith y Sherman, 1994).

En primer lugar, una ventaja innegable que ofrece la enfermedad causada por *C. pseudotuberculosis* radica en la facilidad de obtención del material patológico idóneo para establecer el diagnóstico directo, ya que la forma clínica más típica y frecuente, la linfadenitis caseosa, siempre está presente en el rebaño y se caracteriza por la formación de notables focos reactivos en alguno de los nódulos linfáticos superficiales. De esta lesión resulta muy fácil extraer material patológico no contaminado aún en condiciones de escasa asepsia ambiental (Smith y Sherman, 1994).

En segundo lugar, cualquiera que sea la forma clínica bajo la que se presente esta enfermedad (linfadenitis, mastitis, artritis, focos piógenos internos, pleurobronconeumonía, orquitis, etc.) las lesiones resultan muy evidentes y por lo tanto indicadoras inequívocas del asentamiento del microorganismo. En oposición no suele aislarse *C. pseudotuberculosis* de órganos que no estén alterados (Smith y Sherman, 1994; Yeruham *et al*, 1997).

En los focos de reacción patológica, generalmente de naturaleza necrótico-purulenta, siempre existe una gran abundancia de corinebacterias, que además suelen hallarse sin mezcla de otras bacterias complicantes o concurrentes, con la excepción de las neumonías abiertas y algunos casos de mastitis. Sin embargo, en ocasiones, es posible que el agente causal esté prácticamente ausente en las lesiones más avanzadas (abscesos más grandes), cuando domina la reacción exudativa piógena sobre la proliferativa celular, y consecuentemente no se aisle con frecuencia *C. pseudotuberculosis* (Yeruham *et al*, 1997).

Por último no se trata de un microorganismo que plantee especiales dificultades técnicas para su desarrollo en medios de cultivo. El examen bacterioscópico de una extensión de pus o de la impronta de una pieza orgánica teñidas por el método Gram permite observar abundantes cocobacilos muy delgados y cortos ( $0.5 \times 1-3 \mu\text{m}$ ) sueltos y dispuestos en empalizada y en ángulo, con pleomorfismo hacia formas cocobacilares (Yeruham *et al*, 1997).

Como medio de aislamiento puede emplearse el agar-sangre, en el que *C. pseudotuberculosis* crece formando colonias diminutas (2mm de diámetro) rodeadas de un estrecho halo de hemólisis completa. Pero es preferible emplear medios selectivos. *Corynebacterium selective agar* (Merck), *Mueller tellurite agar* (Difco) y agar-chocolate-telurito son medios enriquecidos (5%) con suero bovino o equino o sangre para agar chocolate suplementados con telurito potásico (0.005 %) como inhibidor, en los que las colonias aparecen de color negro. En caso de muestras contaminadas está indicado el empleo de inhibidores más potentes: colistina (200  $\mu\text{g/ml}$ ) o fosfomicina (200  $\mu\text{g/ml}$ ), ácido nalidixico (4  $\mu\text{g/ml}$ ) y micostatina o anfotericina B (3  $\mu\text{g/ml}$ ) (Yeruham *et al*, 1997).

El diagnóstico de la infección por *C. pseudotuberculosis* queda establecido en forma definitiva cuando se logra la demostración del agente causal. La obtención de material patológico para la realización microbiológica del diagnóstico directo resulta factible en la mayoría de los enfermos, pues en esta enfermedad es habitual la formación de abscesos purulentos subcutáneos (linfadenitis caseosa), y también tiene lugar la afección de órganos externos o fácilmente accesibles desde el exterior (mastitis, aparato genital, artritis). Pero en no pocos casos clínicos el diagnóstico directo es inviable, salvo que procedamos a la necropsia del animal, tal ocurre en la pseudotuberculosis interna (forma respiratoria y caquexia). Y aún existe otra situación patogénica en la que resulta inviable el diagnóstico microbiológico, los animales infectados aparentemente sanos, sin lesiones externas, bien en periodo de incubación o portadores de lesiones internas. Allá en donde el diagnóstico directo muestra sus limitaciones cabe realizar un diagnóstico indirecto, basado en la constatación de una respuesta inmunitaria específica frente a antígenos específicos de *C. pseudotuberculosis* (Smith y Sherman, 1994; Walker *et al*, 1994, Yeruham *et al*, 1997).

En esta bacteria se conjuga una doble circunstancia, por un lado, actúa como parásito intracelular facultativo, es decir, que tiene capacidad de multiplicarse tanto dentro como fuera de la célula, a consecuencia de lo cual adquiere notable intensidad la respuesta inmunitaria tanto humoral como celular. Y por otro lado, de liberar en cantidad y con precocidad una exotoxina activamente inmunógena (Smith y Sherman, 1994; Walker *et al*, 1994, Yeruham *et al*, 1997).

Una gama muy amplia de técnicas inmunitarias han sido aplicadas sobre todo a la detección de anticuerpos y algunas también a la respuesta de base celular frente a *C. pseudotuberculosis* (Ternynck y Avrameas, 1989).

Shigidi, 1978 detectó anticuerpos contra la toxina de *C. pseudotuberculosis* en animales infectados naturalmente al efectuar una comparación entre la prueba de hemoaglutinación indirecta (IHA) y la prueba de inhibición de la antihemolisina (AHI) utilizando eritrocitos sensibilizados, encontrando que la IHA era más sensitiva que la AH, indicando que ambas pruebas son adecuadas para investigaciones seroepidemiológicas de la LC, pero ninguna de las dos es 100% confiable.

En otro estudio realizado por Shigidi, 1979 comparó cinco pruebas serológicas en animales afectados experimentalmente, al comparar el resultado de las cinco pruebas encontró un alto porcentaje de falsos negativos, siendo la AHI la que mostró un número menor de falsos negativos que en las otras pruebas. La Fijación de Complemento (CF) fue la primera prueba en detectar anticuerpos más rápidamente (después de una semana posinfección); la CF y la Aglutinación en Tubo (TA) presentan limitaciones para detectar la infección después de ocho y dieciocho semanas respectivamente. La Difusión en Gel (GD) presentó un alto porcentaje de falsos positivos, mientras que la IHA resultó ser más sensible a la detección de la antitoxina. Podemos observar que todas las pruebas son útiles para la detección de anticuerpos pero ninguna ofrece un 100% de confiabilidad en el diagnóstico de infecciones por *C. pseudotuberculosis*.

Prescott *et al*, 2002 desarrolló una prueba para detectar una respuesta hacia interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en animales infectados experimentalmente con *C. pseudotuberculosis*, utilizando sangre completa, usando una prueba comercial de ELISA para IFN- $\gamma$  bovino, encontrando una confiabilidad del 95.7%, la cual parece ser una prueba prometedora para el diagnóstico de la LC. Aunque como cualquier otra prueba diversos factores pueden afectar su efectividad.

Brown *et al*, 1986 utilizaron una prueba sinérgica de inhibición de la hemólisis (SHI) para animales con infección activa. La SHI detectó un alto porcentaje de animales subclínicos así como de animales con lesiones clínicamente reconocidos.

Burrell, 1981 utilizó las técnicas de inhibición de la hemólisis e inmunodifusión doble para la detección de antitoxina de *C. pseudotuberculosis* en dos rebaños de cabras, encontrando diferencias en el número de animales positivos entre los dos rebaños para las dos pruebas. En un rebaño el número de animales positivos fue menor usando la inhibición de la hemólisis y menor usando la inmunodifusión doble mientras que en el otro rebaño el número de animales positivos fue mayor para la inmunodifusión doble y menor para la inhibición de la hemólisis.

Menzies y Muckle, 1989 usaron la prueba de microaglutinación para la detección de anticuerpos en animales infectados naturalmente, la sensibilidad de esta prueba mostró ser relativamente satisfactoria mientras que la especificidad tuvo una pobre respuesta.

Burrell, 1980 utilizó la técnica de inmunodifusión doble el cual probó ser un método económico y práctico para utilizarlo en sueros de animales infectados y cuyos resultados pueden dentro de las 24 horas posteriores a la realización de la prueba. Pero a pesar de su practicidad requiere ser perfeccionado.

El diagnóstico serológico es de importancia en animales infectados subclínicamente ya que representan una fuente potencial de infección para cabras sanas. Una gran variedad de pruebas serológicas pueden ser aplicadas para diagnosticar LC tales como microaglutinación, inmunodifusión, inhibición sinérgica de la hemólisis, dot-blot, western blotting, fijación de complemento, hemoaglutinación indirecta y una variedad de procedimientos para ELISA. En los procedimientos de ELISA pueden ser usados diferentes componentes bacterianos como antígenos de fase sólida tal como la pared celular, exotoxina (fosfolipasa D) y además exotoxina recombinante (Cetincaya *et al*, 2002). Maki *et al*, 1985 utilizó la exotoxina cruda y diferentes formas de lisados celulares. Sutherland *et al*, 1987 usó toxina cruda y células de la pared bacteriana purificadas.



Menzies *et al*, 2004 utilizó una ELISA para comparar un IFN- $\gamma$  bovino y la fosfolipasa D (PLD) recombinante para diagnosticar cabras infectadas experimentalmente por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Kaba *et al*, 2001 usó un lisado celular de bacterias enteras como antígeno de fase sólida.

Sting *et al*, 1998 utilizó antígenos de la pared celular y exotoxina para la detección de anticuerpos específicos. Ellis *et al*, 1990 realizó una prueba de ELISA usando como antígenos a la pared celular y la exotoxina. Menzies *et al*, 1994 utilizó una fosfolipasa D recombinante con *Escherichia coli* como antígeno.

Los inmunoensayos (ELISA) en fase sólida son una herramienta de la inmunología clínica basados en los principios de interacción anticuerpo-anticuerpo en placas de plástico (poliestireno o polivinilo principalmente). Se utilizan cromógenos solubles para detectar las enzimas. Es una técnica fácilmente automatizable para un gran número de muestras en un primer análisis. Además no necesita equipo sofisticado, se puede adaptar a condiciones de campo con estabilidad de los reactivos, estandarización del empaquetado, simplicidad y conveniencia de los instrumentos de medida. La realización práctica de una ELISA tiene cinco apartados: fabricación de los reactivos, preparación de las placas (tapizado, bloqueado y almacenado), diluciones y pipeteado de muestras, pipeteo del conjugado y medida de la actividad enzimática (Coll, 1993).

El principio básico del método indirecto de la prueba de ELISA es que un antígeno se adsorba a una superficie, pudiendo ser ésta de diferentes materiales. Una dilución del suero problema es agregada y si contiene anticuerpos específicos, se unirán al antígeno, formándose un complejo antígeno-anticuerpo. Al agregar el conjugado marcado (anti-anticuerpo especie específico, con la enzima conjugada) se va a unir al complejo antígeno-anticuerpo, al cual se le agrega un sustrato para activar la enzima, produciendo un cambio de coloración. Se agrega una solución para detener la reacción. El color final, es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo. El resultado puede ser leído directamente por observación visual o con la utilización de un espectrofotómetro, para medir la densidad óptica de la reacción (Ternynck y Avrameas, 1989).

La prueba de ELISA tiene un campo muy amplio en la investigación, el diagnóstico y en la terapéutica médica, sin embargo, es necesario conocer que tipo de análisis es el más acorde con las necesidades de las que se quiere cuantificar, cuál va a ser el uso potencial que se le puede dar y establecer el criterio para que su uso sea más útil que otro método previamente establecido; esto es, si el método anterior no brinda la posibilidad de determinar animales positivos o portadores con bajos títulos de anticuerpos se puede usar ELISA (Ternynck y Avrameas, 1989).

Aunque en México se encuentra presente de manera muy diseminada en los hatos nacionales la linfadenitis caseosa es una enfermedad a la que poco estudio se le a dedicado (Ramírez *et al*, 1992), no existe una técnica inmunológica que permita detectar la infección por *C. pseudotuberculosis* en animales que aún no presentan las alteraciones características de LC, el interés es utilizar una prueba serológica (ELISA Indirecta) como técnica rutinaria de diagnóstico, ya que es una enfermedad con alta prevalencia e importancia económica en cabras (Ramírez *et al*, 1992; Espinoza y Tórtora 1992).

## a) TRATAMIENTO

La linfadenitis caseosa es una enfermedad de presentación endémica, difícil de erradicar debido a la escasa respuesta terapéutica, a su elevada capacidad de resistencia en el medio ambiente y las limitaciones para detectar infecciones subclínicas (Cubero *et al*, 2002).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* es sensible a prácticamente todos los antibióticos *in vitro* (ampicilina, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina G, trimetoprim, sulfametazol, etc), habiéndose encontrado solamente la estreptomina como antibiótico frente al que presenta resistencia (Judson y Songer, 1991).

No obstante el tratamiento quimioterápico es ineficaz en esta enfermedad por diversas razones:

- Baja dosis de antibiótico que puede difundirse por el absceso, ya que no hay irrigación en él.
- Tanta masa de material purulento podría neutralizar cualquier dosis de antibiótico por elevada que sea.
- Como bacteria intracelular, es difícil que llegue a estar en contacto con el antibiótico en cantidades mínimas.

La mayoría de los autores coinciden que el tratamiento quirúrgico se puede practicar adecuadamente en el caso de abscesos superficiales permitiendo una disminución en la transmisión de la enfermedad. Para la extirpación quirúrgica de los abscesos superficiales primeramente se deben aislar a los animales infectados del resto del rebaño, se debe rasurar la zona, hacer una incisión perpendicular al cuerpo de la cabra, presionar el absceso hasta que todo el contenido pastoso salga fuera y empiece a brotar un líquido con sangre, teniendo la precaución de recolectar el exudado para su destrucción posterior, impregnar bien el interior y el exterior de la incisión con yodo al 7% repitiendo las curaciones diariamente hasta que sanen y cicatricen completamente antes de reinstalar los animales al rebaño. (Navarrete, 1988)

## a) PREVENCIÓN.

Un método relativamente común para controlar las enfermedades infecciosas es el proveer protección mediante la inmunización conseguida a través de la vacunación. No es posible controlar todas las enfermedades con el uso de vacunas, ya que no existen disponibles contra todos los agentes infecciosos.

La vacunación y el adecuado tratamiento de los abscesos reducen el número de infectados cuando la presentación de la linfadenitis caseosa es endémica. El programa de vacunación no elimina totalmente la infección del rebaño, y la venta de portadores asintomáticos es una reserva que hace que se mantenga un problema potencial (Cubero *et al*, 2002).

En deferentes países europeos se han estudiado diferentes tipos de vacunas (con resultados variables) para el control de la linfadenitis caseosa:

Cuadro 2. TIPOS DE VACUNAS

TIPO DE VACUNA	CARACTERÍSTICAS	
Viva con cepas mutantes atenuadas	“ Toxminus “	- Expresa la exotoxina Fosfolipasa D.
	“ AroQ “	- Inactivada enzimáticamente
Inactivadas	Químicamente	- Inactivación con formalina del sobrenadante de un cultivo de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> rica en fosfolipasa D. - Células totales lisadas.
	Genéticamente	- Fosfolipasa D detoxicada (Delta PLD) resulta parcialmente efectiva.

Modificado de Cubero *et al*, 2002.

Sin embargo, en nuestro país no se encuentran disponibles vacunas para prevenir o disminuir el porcentaje de animales infectados.

#### o) CONTROL.

Con la finalidad de impedir la exposición a una enfermedad los animales recién adquiridos e introducidos a la explotación deberán mantenerse aislados y ser sometidos a un periodo de observación llamado CUARENTENA. La cuarentena consiste en el aislamiento de los animales infectados o sospechosos de estarlo, o bien de aquellos no infectados pero que corren riesgo de infectarse. También se utiliza para aislar a los animales sospechosos de estar infectados hasta que dicha infección sea confirmada o descartada. El periodo de cuarentena depende del periodo de incubación del agente, del tiempo necesario para confirmar la presencia de la infección y del tiempo que precisa un animal infectado para ser o no infeccioso (con o sin tratamiento). La cuarentena de 30 a 60 días da la oportunidad de observar si el animal muestra algún signo asociado con alguna enfermedad. Los chequeos serológicos pueden determinar si el animal posee anticuerpos contra cualquier agente infeccioso indicándonos al mismo tiempo si la exposición al agente ha sido presente o pasada. La cuarentena debe ser implantada necesariamente en la granja con cierta flexibilidad dependiendo del origen de los animales que se vayan a introducir (Cubero *et al*, 2002).

#### p) ERRADICACIÓN.

Con la finalidad de poder mantener la producción y los niveles genéticos deseados, durante el periodo de transición hasta conseguir la erradicación de la enfermedad, se aconseja a los productores el manejo de dos rebaños independientes. Un rebaño estará integrado por los animales infectados y otro rebaño contiene a los animales sanos (Cubero *et al*, 2002).

En nuestro país no se cuenta con un programa de erradicación para éste padecimiento, lo que se lleva a cabo es el tratamiento quirúrgico de las lesiones para evitar en lo más posible la diseminación de la enfermedad en el hato (Navarrete, 1988).

Schreuder *et al.* (1994) desarrollaron un programa de erradicación de la linfadenitis caseosa en explotaciones endémicas, el cual consistió en:

- Se utilizó la técnica ELISA sándwich para detección de seroreaccionantes
- Los animales seropositivos y dudosos se sacrificaron
- Las ovejas gestantes seropositivas se mantienen en cuarentena y se sacrifican después del parto.
- Las crías se alimentan artificialmente y permanecen en la explotación
- Se acompaña de medidas higiénicas.

Este programa, sin embargo, no parece ser del todo factible en nuestro país puesto que resultaría muy costoso para los productores.

Nord *et al.* (1998) llevaron a cabo durante tres años un programa de erradicación de la linfadenitis caseosa y de artritis-encefalitis en 100 explotaciones de cabras de leche en Noruega infectadas endémicamente, con una prevalencia del 94%.

Trascurridos los tres años del programa todos los animales resultaron seronegativos y no se registró ningún signo clínico de linfadenitis caseosa ni de artritis-encefalitis. Las medidas adoptadas en el programa consistían en:

- ❖ Separación de las crías inmediatamente después de nacer para evitar el contacto con las madres y se alimentan con calostro y leche de vaca.
- ❖ Las crías se manejan en un rebaño independiente, en locales diferentes, para disponer de animales de reposición seronegativos.
- ❖ Las hembras de reposición seronegativas parirán y amamantarán a sus crías.
- ❖ El rebaño seropositivo se sacrifica durante el segundo año del programa de control.
- ❖ Se realiza el vacío sanitario, limpieza y desinfección de los locales ocupados por el rebaño infectado y posteriormente permanecen vacíos durante 3 meses.
- ❖ Chequeo serológico del rebaño durante los 3 años del programa de control, sacrificando inmediatamente a los animales seropositivos y los dudosos.

Los programas pueden ser simples o complejos dependiendo del nivel económico de la explotación y de la incidencia de enfermedades. Aunque determinadas recomendaciones de manejo pueden aplicarse a todas las granjas cada explotación requiere una adaptación particular con recomendaciones específicas.

## II. OBJETIVOS

### GENERAL:

- Establecer la eficiencia de ELISA como prueba serológica para el diagnóstico de la Linfadenitis Caseosa en cabras.

### PARTICULARES:

- Aislar e identificar *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- Obtención del antígeno bacteriano.
- Utilización de la prueba de ELISA.

### **III. HIPÓTESIS**

La utilización de un método diagnóstico de tipo inmunológico (ELISA) en forma rutinaria para Linfadenitis Caseosa, ayudará al posible control y erradicación de la enfermedad en los rebaños caprinos.

#### IV. MATERIAL

##### A) Biológico:

- Cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (obtenida a partir de muestras clínicas de un rebaño de Celaya, Gto.).
- 2 cuyes blancos, machos.
- 1 cabra para la preparación de un suero hiperinmune (módulo caprino de la FES Cuautitlán)

##### B) Medios de Cultivo:

- ◆ Aislamiento:
  - Agar Sangre
  - Medio PPLO (Organismos Parecidos a Pleuroneumonía)
- ◆ Caracterización Bioquímica:
  - (O-F) Oxidación - -fermentación
  - Caldo Urea
  - (MR- VP) Rojo de Metilo-Voges Proskaver
  - Nitratos
  - (SIM) Sulfhídrico-Indol-Motilidad
- ◆ Azúcares con base de agua peptonada:
  - Glucosa
  - Lactosa
  - Maltosa
  - Trehalosa
  - Xilosa
  - Dextrosa
  - Manitol
  - Ramnosa
  - Manosa
  - Arabinosa
  - Rafinosa

##### C) Tren de tinción de Gram:

- Cristal Violeta
- Lugol
- Acetona
- Safranina

#### D) Misceláneos:

- Cajas de Petri de 10 ml, estériles
- Tubos de ensaye de 5 y 10 ml, estériles
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml, estériles
- Viales estériles
- Mecheros Bunsen
- Estufa bacteriológica
- Agitador
- Centrífuga
- Microscopio compuesto
- Compresora de aire
- Sistema de ultrafiltración (Amicon)
- Autoclave
- Espectrofotómetro (Multiskan Ascent)
- Filtros millipore
- Jeringas insulínicas
- Jeringas de 3 ml
- Espátula
- Asa bacteriológica
- Placas de poliestireno (Nunc)
- Pipeta (200µl)
- Pipeta multicanal
- Puntas para pipeta

## V. MÉTODO

### a) Recolección de Muestras

**Animales:** En una explotación caprina localizada en el Municipio de Celaya, Guanajuato, el cual se encuentra situado a los 101°48' de longitud oeste y a 20°31' de latitud norte, su altura sobre el nivel del mar es de 1,752 metros. La temperatura máxima es de 25.5°C y la mínima de 16°C con una media anual de 20.86°C, su clima oscila entre semiseco y semicálido con una precipitación pluvial promedio de 575.3mm anuales. El tipo de suelo es arcilla limosa.



Se tomaron 10 muestras de diferentes animales por medio de punciones en el absceso observado en linfonodos, principalmente parotídeos, para realizar aislamientos y de ésta forma obtener la cepa que se utilizó en el presente trabajo. Este rancho cuenta con aproximadamente 100 animales, siendo éstos hembras reproductoras, raza saennen, con edades que fluctuaban entre 2 y 5 años, con un peso promedio de 25 Kg, la alimentación que se les proporciona es básicamente concentrado. El propietario lleva a cabo un programa de desparasitación regular.

## b) Preparación de Medios

### 1. Medios de Cultivo para Aislamiento (Agar Sangre).

Los medios de cultivo empleados se prepararon a partir de los medios basales comerciales de acuerdo a las especificaciones dadas por el laboratorio que los fabrica, se esterizaron en autoclave a 121° y 15 libras de presión durante 15 minutos. Se adicionó después sangre de rumiante desfibrinada en una proporción del 5% y se distribuyeron en cajas de petri de 10 cm de diámetro se incubaron en una estufa bacteriológica a 37° por 24 horas para la prueba de esterilidad de éstos medios y al comprobar que no había contaminación se procedió a su utilización.

### 2. Medios de Caracterización Bioquímica.

Estos medios comerciales se prepararon de acuerdo a las especificaciones del laboratorio que los fabrica, los cuales se mezclan y se distribuyen en tubos de 13 x 100 ml con tapón de baquelita para luego esterilizarse (de la forma anteriormente descrita) y almacenarse para ser utilizados.

### 3. Medios de Azúcares con Base de Agua Peptonada.

A cada tubo con agua peptonada se le adiciona 0.5 ml del azúcar correspondiente que debe estar a una concentración del 1%.

### 4. Medio PPLO para Crecimiento Bacteriano.

Se preparó de acuerdo con las especificaciones del laboratorio que los produce, se esterilizó en autoclave a 121° y 15 libras de presión durante 15 minutos, se incubó en una estufa bacteriológica a 37° por 24 horas para la prueba de esterilidad.

c) Procedimiento de Cultivo.

En el laboratorio, de los linfonodos se seleccionó un área que presentaba abscesos quemando la superficie para eliminar contaminantes indeseables con una espátula al rojo vivo, en seguida, con el asa bacteriológica se sembró de las porciones internas en Agar Sangre, utilizando la técnica americana para la dilución de colonias, las cajas fueron incubadas a 37° durante 48 horas, a cada caja se le realizaron improntas las cuales fueron teñidas por el método de Gram. Posterior a la incubación se seleccionaron las colonias de acuerdo a su morfología y algunas fueron resembradas para su purificación.

d) Identificación.

La identificación del género y especie de cada muestra se hizo siguiendo la metodología descrita por García, 1980.

e) Obtención de la Exotoxina.

e.1 Crecimiento masivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Una vez identificadas las cepas del microorganismo se eligió sólo una cepa por ser la que mostraba mayor índice de beta-hemólisis y mayor crecimiento, de ésta con el asa bacteriológica se tomó una asada de colonias las cuales se inocularon en tubos de ensaye que contenían 5 ml de caldo PPLO (Organismos Parecidos a Pleuroneumonía) incubándose por agitación a 37° por 48 horas. Pasado el tiempo el contenido de los tubos se vertió en un matríz que contenía 500 ml del caldo PPLO y colocado en un agitador e incubado a 37° durante 48 horas en agitación constante. Posteriormente se realizaron frotis que se tiñeron por el método Gram para confirmar la presencia de la bacteria.

El cultivo en medio líquido fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos para separar el paquete celular y el sobrenadante puesto que éste último contiene a la exotoxina.

e.2 Ultrafiltración.

Para concentrar el sobrenadante obtenido se empleó un sistema de ultrafiltración (Amicon) utilizando membranas de exclusión millipore de 10.000 mil daltons de peso molecular. El concentrado constituyó el extracto crudo de la fosfolipasa D. El volumen final que se obtuvo fue de 50 ml, el cual fue colocado en viales estériles y almacenados a -20°. El paquete celular fue colectado y almacenado en congelación a 4° sin conservador.

Para evaluar la toxicidad y cantidad de antígeno bacteriano para su posterior uso en la realización de la prueba de ELISA el concentrado tuvo que ser sometido a las siguientes pruebas:

- a) Dermonecrosis en cuyes.
- b) Determinación de proteína.
- c) Electroforesis.

a) Dermonecrosis.

Para comprobar que en el concentrado obtenido había toxina y observar su capacidad necrótica se emplearon 2 cuyes (por ser los animales que ofrecen mayor sensibilidad a ésta prueba) machos albinos, a estos animales se les rasuró el costado derecho desde la región torácica hasta la región lumbar, se lavó con agua y jabón y se aplicó un antiséptico. En el costado de cada animal se dibujaron cuadros de 1 centímetro cuadrado identificándolos con números progresivos del 1 al 5, cada cuadro se inoculó de la siguiente manera:

Cuadro 3. PRUEBA DE DERMONECROSIS.

Dosis	Cuadro	Vía	Inóculo
0.3ml	1	Intradérmica	Toxina cruda
0.3ml	2	Intradérmica	Filtrado diluido 1:10
0.3ml	3	Intradérmica	Filtrado diluido 1:100
0.3ml	4	Intradérmica	Filtrado diluido 1:1000
0.3ml	5	Intradérmica	Solución Salina Fisiológica estéril

Modificado de De Jong, 1980.

Se realizaron observaciones a las 24, 48 y 72 horas post inoculación. La prueba se dio como positiva cuando se observó necrosis (De Jong, 1980; Batey, 1980; Medrano, 2003).

b) Determinación de proteína.

La determinación de proteína se realiza con la finalidad de conocer la cantidad de proteína que posee el concentrado ya que para realizar una prueba inmunológica (en éste caso ELISA) se requiere de un mínimo de proteína para poder realizarla en cuyo caso sería de 5 microgramos por mililitro.

La realización de ésta prueba se hizo siguiendo el método de Bradford (1976):

Preparación de los Reactivos: 100mg de Azul Brillante de Commasie G-25 (Sigma) se disolvieron en 50ml de etanol al 95%. A ésta solución se le adicionaron 100ml de ácido fosfórico al 85%; la solución resultante fue diluida en un volumen final de 1 litro; la concentración final en el reactivo fue de 0.01% de Azul Brillante de Commasie G-25, 4.7% de etanol y 8.5% de ácido fosfórico.

Prueba para la Proteína (método estándar): la solución de proteínas que contenía de 10 a 100mg de proteína en un volumen dispuesto para 0.1ml fue pipeteado dentro de 12 tubos de 100mm. El volumen de los tubos se ajustó a 0.1ml con una solución buffer. 5ml de los reactivos para la proteína se adicionaron en los tubos y el contenido se mezcló por inversión. La absorbancia a 595nm se midió después de 2 minutos y antes de 1 hora en 3ml de buffer y 5ml de reactivos para la proteína. El peso de la proteína se trazó con la correspondiente absorbancia resultando en una curva estándar usada para determinar la proteína de la exotoxina.

c) Electroforesis.

La electroforesis se realizó para conocer el peso molecular del concentrado y comprobar que en éste estaba presente la exotoxina ya que la literatura nos refiere que la fosfolipasa D tiene un peso de 31.5 kD.

La exotoxina se separó en geles de poliacrilamida con las siguientes características: el gel separador de aproximadamente 50 mm fue preparado a una concentración de acrilamida del 12% 0.375 M tris y pH de 8.8; se utilizó como gel concentrador uno de 10 mm, preparado con 4% de acrilamida 0.125 M Tris y pH de 6.8. El antígeno fue corrido siempre con un carril de comparación con marcadores de peso molecular (MPM) preteñidos, a 150V con 120mA para el gel concentrador por 10 minutos y a 85mA para el gel separador por 90 minutos. Una vez terminado el corrimiento se realizó la tinción de nitrato de plata. Los PM de los antígenos obtenidos fueron determinados por medio de una curva patrón, realizada graficando el logaritmo del PM de los marcadores preteñidos, contra su migración a través del gel expresada en centímetros. Los MPM fueron Miosina 203 kD, beta-galactosidasa 118 kD, albúmina sérica bovina 86 kD, ovalbúmina 51kD, anhidrasa carbónica 34 kD, inhibidor de la tripsina 29 kD, lisosima 19 kD y aprotinina 7.5 kD. (Muñoz, 1997)

La concentración apropiada del antígeno se determinó por titulación en placa usándose diferentes diluciones para establecer la concentración óptima, se realizó la lectura de la placa en un Multiskan Ascent a 450 nm. A partir de la absorbancia se determinó utilizar la dilución 1:150.

Obtención de Sueros Testigo.

Los sueros testigo fueron utilizados para tenerlos como valores de referencia entre animales positivos y negativos, obteniéndose de la siguiente manera:

a) Suero positivo.- Este se obtuvo por medio de la producción de un suero hiperinmune, inoculándose la fosfolipasa D a una cabra, propiedad de FES Cuautitlán, siguiendo un protocolo preestablecido: (cuadro 4)

Cuadro 4. PRODUCCIÓN DE UN SUERO HIPERINMUNE

Día	Inóculo	Vía
0	1ml de Ag + 1ml Adyuvante completo de Freud	Subcutánea
5	1ml de Ag + 1ml Adyuvante incompleto	1ml Intramuscular y 1ml Subcutánea
15	1ml de Ag sin adyuvante	Intramuscular
30	1ml de Ag sin adyuvante	Intramuscular
31	Sangrado	Vena yugular

Ag= Antígeno

ml= mililitro

Modificado de Morilla, 1978.

La sangre obtenida el día 31 se centrifugo a 3,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos. El sobrenadante se recolectó y se congeló a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de empleo.

b) Suero negativo.- Este fue extraído de un feto caprino proveniente de un rastro.

Sueros Problema:

La sangre para la obtención de los sueros problema fue tomada a 57 hembras caprinas seleccionadas al azar del mismo rancho localizado en Celaya, Guanajuato el cual presenta un historial de linfadenitis caseosa recurrente y otros 33 sueros fueron tomados al azar tanto de hembras como de machos en un rancho ubicado también en Guanajuato, los cuales no presentan historia de éste problema y no se observan lesiones aparentes. Uno de los ranchos se encuentra localizado en el municipio de Cortázar el cual está a  $100^{\circ}52'$  de latitud oeste y a  $20^{\circ}28'$  de longitud norte, tiene una altura de 1,730m sobre el nivel del mar, el clima es semiárido semihúmedo con lluvias en verano, la temperatura media anual es de  $19.3^{\circ}\text{C}$  con mínima de  $1.1^{\circ}\text{C}$  y una máxima de  $36^{\circ}\text{C}$ . La precipitación pluvial promedio es de 630mm anuales. El tipo de suelo es arcilloso. El otro rancho está ubicado en el municipio de El Jaral localizado a  $100^{\circ}59'$  y  $101^{\circ}07'$  de longitud oeste y a  $20^{\circ}15'$  y  $20^{\circ}26'$  de latitud norte, su altura promedio es de 1,730m sobre el nivel del mar. La temperatura promedio anual es de  $18.5^{\circ}\text{C}$  con una máxima de  $35^{\circ}\text{C}$  y una mínima de  $15^{\circ}\text{C}$ , el clima es templado subhúmedo durante casi todo el año, posee una precipitación pluvial total anual de 647.9mm promedio con vientos de norte a suroeste. El tipo de suelo es limoso a arcilloarenosa.

En ambos ranchos no se observaron lesiones aparentes en los linfonodos superficiales ni se reporta la presencia de LC. Por lo que los sueros provenientes de Celaya fueron designados como grupo 1 o experimental y los sueros de Cortazar y el Jaral se designaron grupo 2 o control.

### Procedimiento de ELISA Indirecta.

Se colocaron 200 microlitros del antígeno (concentrado de fosfolipasa D) a una dilución 1:100 disuelta en un amortiguador carbonato- bicarbonato (0.1 molar y pH 9.6)\*, en cada una de las 96 cavidades de la placa de poliestireno (Nunc), dejándose durante 24 horas a 4° C para que se adsorba el antígeno a las paredes de los pozos de la placa.

Al día siguiente se eliminaron las soluciones por inversión de la placa y se desechó el líquido sacudiéndose la placa fuertemente sobre papel absorbente. Se lavaron los pozos con 150 microlitros de la solución de lavado PBS (Phosphate Buffer Saline), conteniendo 0.1 % de Tween 20 y un pH de 7.2. Dejando los pozos con el amortiguador de lavado en reposo durante 3 minutos. Al cabo de éste tiempo se eliminó la solución de la manera descrita anteriormente, repitiendo este proceso dos veces más, con el fin de eliminar el antígeno que no se adsorbió.

Se colocaron 100 microlitros de PBS Tween 20 mas leche "Svelty "al 3% a todos los pozos para permitir que la caseína recubra los sitios a los que no se adsorbió el antígeno, y se incubó a 37° C por una hora. Nuevamente se lavó la placa 3 veces como se mencionó previamente.

Se colocó en cada serie de 8 pozos 200 microlitros de las diluciones dobles seriadas de cada suero, iniciando con los sueros control positivo y negativo, seguidos de los sueros problema, diluidos en amortiguador PBS Tween 20 + leche " Svelty " y se incubó a 37° C por una hora en cama húmeda.

Se lavó 3 veces la placa, de la manera antes citada.

Se colocaron 100 microlitros de conjugado anti-inmunoglobulina IgG de rumiante, en cada uno de los pozos, proveniente de un kit de diagnóstico del Instituto Pourquier, Francia, empleándose una dilución 1:100, disuelta en un amortiguador del mismo kit. Incubándose a 37° C por una hora.

Se lavó la placa 3 veces, de la misma forma mencionada anteriormente.

Se depositaron 100 microlitros de la solución de revelado, proveniente del kit, incubándose a 21° C por 5 minutos en un lugar oscuro.

Para detener la reacción se agregaron 100 microlitros de la solución de paro.

---

\* Ver apéndice I.

Se realizó la lectura en un Espectrofotómetro a una densidad óptica (DO) de 450 nanómetros (nm)

En todas las placas se obtuvieron 2 columnas de pozos para el sustrato testigo, en el cual se omite el paso de la adición del conjugado; el conjugado testigo en el cual se omite la adición del suero problema para verificar los cambios de coloración de la solución de sustrato o de la adsorción inespecífica del conjugado.

Los resultados generados por ELISA se convertirán en unidades de actividad de anticuerpos. Basándonos en Sutherland *et al*, 1987, el número de unidades de actividad de anticuerpos por cada suero será determinado por la fórmula:

$$\frac{A2 \quad (\text{suero de prueba a 450 nm})}{A1 \quad (\text{absorbancia de 450 nm del control positivo})} \times 100$$

La interpretación de los resultados se basó en la sugerida por el Instituto Pourquier, Francia:

El suero problema que dió menor o igual a 110 % unidades de actividad de anticuerpos fué considerado como negativo.

El suero problema que dió entre 110 % y 120 % unidades de actividad de anticuerpos se consideró sospechoso.

El suero problema que dió mayor o igual a 120 % unidades de actividad de anticuerpos fué considerado positivo.

El análisis estadístico se realizará a través de estadística descriptiva auxiliándose del paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) The Apache Software Foundation. Wes 1999-2003 USA.

## VI. RESULTADOS

### a) Aislamiento.

1. Morfología colonial: se observaron colonias pequeñas, redondas, color blanco cremoso que al ser tocadas con el asa de platino se desplazaban con facilidad por la superficie del agar.

2. Identificación: se realizaron frotis tiñéndolos por el método Gram y al observarlos en el microscopio revelaron una gran cantidad de bacilos Gram positivos puros agrupados en forma de "letras chinas". Para la identificación del género y especie se llevaron a cabo pruebas bioquímicas; al comparar los resultados obtenidos con los descritos en la literatura para *C. pseudotuberculosis*, éstos coincidían. (cuadro5).

Cuadro 5. PRUEBAS EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *C. pseudotuberculosis*.

PRUEBA	INTERPRETACIÓN	
Tinción de Gram	Bacilos Gram (+), pequeños, pleomórficos.	
Hemólisis	β	
Ureasa	(+)	
Nitratos	(-)	
Catalasa	(+)	
MR	(-)	
VP	(-)	
O/F	F	
SIM {	Motilidad	(-)
	H <sub>2</sub> S	(-)
	Indol	(-)
Glucosa	(+)	
Lactosa	(-)	
Maltosa	(+)	
Manitol	(-)	
Trehalosa	(-)	
Xilosa	(-)	
Mannosa	(-)	
Arabinosa	(-)	
Rafinosa	(-)	
Ramnosa	(-)	



**b) Prueba de dermonecrosis.**

En los resultados obtenidos en la prueba de dermonecrosis (cuadro 6) durante las primeras 24 horas no se observó un cambio significativo en los animales, en el punto de inoculación, sólo enrojecimiento. A las 48 horas se les presentó cianosis en las orejas y signos leves de necrosis y a las 72 horas, la cianosis de las orejas y la necrosis eran muy marcadas, con la formación de una costra. Estos resultados fueron iguales en ambos animales.

**Cuadro 6. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DERMONECROSIS**

# Animal	Marca del cuadro	Muestra inoculada	Cantidad inoculada	24 horas	48 horas	72 horas
1	1	Toxina cruda	0.3ml	Enrojecimiento	Cianosis orejas	Necrosis
1	2	Filtrado diluido 1:10	0.3ml	Enrojecimiento	Cianosis orejas	Cianosis orejas
1	3	Filtrado diluido 1:100	0.3ml	Enrojecimiento	Cianosis orejas	Cianosis orejas
1	4	Filtrado diluido 1:1000	0.3ml	Enrojecimiento	Cianosis orejas	Cianosis orejas
1	5	SSF, estéril	0.3ml	Enrojecimiento	s/c	s/c
2	1	Toxina cruda	0.3ml	Enrojecimiento	Cianosis orejas	Necrosis
2	2	Filtrado diluido 1:10	0.3ml	Enrojecimiento	Cianosis orejas	Cianosis orejas
2	3	Filtrado diluido 1:100	0.3ml	Enrojecimiento	Cianosis orejas	Cianosis orejas
2	4	Filtrado diluido 1:1000	0.3ml	Enrojecimiento	Cianosis orejas	Cianosis orejas
2	5	SSF, estéril	0.3ml	Enrojecimiento	s/c	s/c

SSF= Solución Salina Fisiológica

s/c=sin cambio

**c) Determinación de proteína.**

La cantidad de proteína contenida en el concentrado se obtuvo por medio de la prueba de Bradford encontrándose lo siguiente: (cuadro 7)

**Cuadro 7. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE BRADFORD**

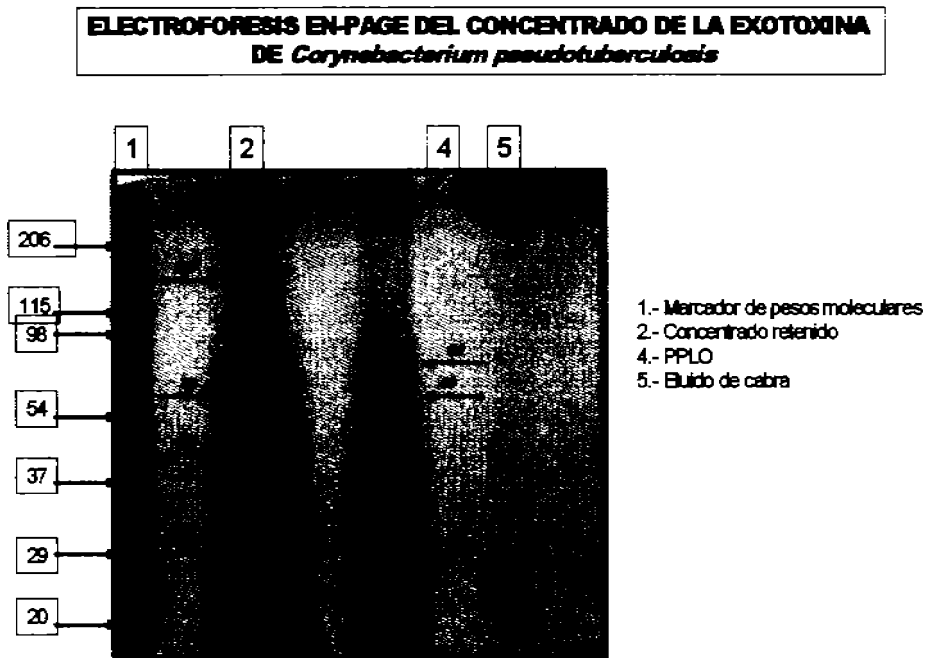
	mcg/ml
Concentrado retenido	8822
Eluido cabra	59.8
Medio PPLO	69.9

mcg/ml= microgramos por mililitro.

d) **Electroforesis.**

A la electroforesis se lograron identificar diferentes bandas de proteínas de componentes estructurales de la Fosfolipasa D: en el filtrado se lograron observar estas bandas p29, p31.5, p35, p45, p60 y p190 kD, el medio de cultivo bacteriano (PPLO) y el eluido (proteína de menor peso molecular diferente a la exotoxina fosfolipasa D y que no es retenido por la membrana) no presentaron bandas. (Figura 1)

Figura 1.



## Prueba de ELISA Indirecta.

En el apéndice II, se pueden observar los resultados en términos de unidades de actividad de anticuerpos de cada uno de los 88 animales en estudio indicándose el grupo experimental y el grupo control.

De los 57 animales del grupo experimental, 6 animales (1.05%) fueron positivos a ELISA Indirecta, 2 (3.5%) resultaron sospechosos y 49 animales (85.96%) dieron negativo. (cuadro 8).

En el grupo control de los 33 animales sometidos a estudio encontramos que 1 (3.22%) resultó positivo, el número de animales sospechoso resultó en 1 (3.22%) mientras que 29 animales (93.54%) dieron negativos a la prueba de ELISA Indirecta. (cuadro 8).

Cuadro 8. RESULTADOS DE ELISA INDIRECTA

	No. de animales	ELISA Indirecta					
		Positivos		Sospechosos		Negativos	
		# +	%	# s	%	# -	%
Grupo 1 Experimental	57	6	1.05	2	3.5	49	85.96
Grupo 2 Control	33	1	3.22	1	3.22	29	93.54

+ = positivos      - = negativos      s = sospechosos

## Análisis estadístico

Se realizó la comparación de datos entre los grupos, por medio de un análisis de estadística descriptiva al azar usando el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). En donde los resultados de la ELISA-Indirecta muestran una diferencia de dos desviaciones estándar entre las medias de ambos grupos, sin embargo hay que tomar en cuenta que la cantidad de animales entre un grupo y otro no era del todo homogénea por lo que la diferencia se hace más notoria.

## Estadística Descriptiva

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar	Varianza
Control	57	495	23	518	62.36	73.415	5389.811
Experimental	33	150	44	195	83.46	33.140	1098.235
N número de muestras	88						

## VII. DISCUSIÓN.

La obtención de las muestras necesarias para el aislamiento de la cepa productora del antígeno bacteriano (exotoxina) el cual se utilizó para realizar la prueba de ELISA resultó fácil ya que el rebaño mostraba presencia de LC, pudiendo observarse las lesiones características como lo son la formación de absceso en alguno de los nódulos linfáticos superficiales, por lo que de ésta lesión resultó muy fácil extraer el material patológico, en las 10 muestras tomadas, en donde pudo observarse microscópicamente gran abundancia de corinebacterias y cuyas colonias fueron características (pequeñas, redondas, color blanco cremoso y sobre todo se fragmentaban con gran facilidad) tal y como lo han mencionado autores como Smith y Sherman, 1994; Yeruham *et al*, 1997; Cowan y Steel, 1974. Lo que significa que *C. pseudotuberculosis* se aísla de manera sencilla de las lesiones producidas en linfonodos superficiales y cuyo material purulento contiene gran cantidad de ésta bacteria y cuyo crecimiento no presenta mayores problemas utilizando los medios de cultivo y temperatura adecuados.

La identificación final realizada con una serie de pruebas bioquímicas no presentó problema alguno con lo que podemos decir que ésta identificación puede llevarse a cabo de forma sencilla y utilizando un mínimo de pruebas bioquímicas como lo son: catalasa, urea, nitratos, glucosa, maltosa y manitol tal y como lo describió García, 1980.

La prueba biológica de dermonecrosis (DN) realizada en cuyes albinos, demostró su efecto necrotizante en el sitio de inoculación, éste principio fue utilizado para la evaluación de otras toxinas bacterianas como lo mostró inicialmente De Jong en 1980, quien utilizó la exotoxina de *Pasteurella multocida* (tipo D) observando éstos efectos necrotizantes, esto es semejante a lo hecho por Baley, 1986, quien realizó también ésta prueba pero usando ratones en donde al igual que en el presente trabajo se produjo eritema en el sitio de inoculación durante las primeras 12 horas y posteriormente la necrosis tisular, así mismo, Medrano *et al*, 2003 utilizó ratones albinos inoculando 0.2 ml de PLD de manera subcutánea proveniente del cultivo en caldo tripticosa soya de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislada de una alpaca y cuyos resultados posteriores a 24 horas post inoculación mostraron necrosis en el sitio de aplicación, aunque en éste caso la reacción no fue tan severa como lo observado por éste y otros trabajos donde los cuyes se muestran más sensibles a la reacción necrótica que los ratones; podemos notar que el efecto tóxico de la PLD es semejante entre los trabajos anteriormente citados y lo realizado en el presente estudio, aunque existan variantes en el tipo de animales usados aunado al origen biológico de la cepa y la cantidad de inóculo aplicado el efecto DN se pone de manifiesto, con diversas reacciones de severidad.

Durante la obtención de la exotoxina se tuvieron presentes aquellos aspectos que Mendoza, 1986, consideró en su trabajo, al mencionar que todas las exotoxinas bacterianas encontradas han resultado ser proteínas que son excretadas por los microorganismos que las producen al medio en que se desarrollan y su concentración en la mayoría de los casos parece ser paralela al crecimiento bacteriano y a la cantidad y tipo de medio utilizado, ya que cada medio contiene cantidades diferentes de proteína que pueda ser aprovechada para el crecimiento del microorganismo, en éste trabajo el medio utilizado para el crecimiento bacteriano y por lo tanto la cantidad de proteína obtenida fue el medio PPLO el cual está constituido en su mayoría por extracto de carne la cual le proporciona al medio una gran cantidad de proteína la que fué aprovechada para el crecimiento de *C. pseudotuberculosis*.

Los resultados obtenidos en el análisis de las proteínas por electroforesis provenientes del concentrado de *Corynebacterium pseudotuberculosis* fueron en base al reconocimiento de varias bandas cuyos pesos moleculares fluctuaron entre 29, 31.5, 35, 45, 60 y 90 kD lo cual es semejante a lo reportado en trabajos realizados anteriormente por autores como Muckle, 1992 quien en su investigación encontró las mismas bandas de 29, 31.5 y 45 kD que las obtenidas en el presente trabajo, sin embargo, éste autor utilizó una cepa de referencia para la obtención del extracto y en éste estudio la cepa provenía de un caso clínico lo cual podría explicar que el autor encontrara bandas adicionales de 22, 43, 64, 68 y 120 kD y en éste trabajo no, estas diferencias podrían estar influidas por el medio de cultivo usado puesto que la cepa utilizada por Muckle se cultivó en infusión cerebro-corazón mientras que en el presente trabajo el medio fue PPLO; sin embargo éste autor al igual que Brown y Olander, 1987 dicen que la proteína de 31.5 kD es el componente mayormente encontrado en el suero de cabras infectadas y que presenta actividad de PLD.

Existen investigaciones realizadas por autores como Egen *et al*, 1989 quien al purificar la exotoxina, proveniente del cultivo de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislada de un caballo encontró proteínas de 14, 21 y 31.7 kD de las cuales solo la de 31.7 reaccionó con una muestra de suero de una cabra infectada; Hodgson *et al*, 1990, Songer *et al*, 1990, Hsu *et al*, 1985 y Jolly en el año 1965a en sus investigaciones encontraron una proteína con un peso molecular de 31 kD, podemos notar que existen diferencias entre lo encontrado por los autores antes mencionados y lo obtenido en el presente trabajo, sin embargo, todas las bandas se encuentran alrededor de los 31 kD.

Otra proteína reconocida en éste trabajo y por autores como Muckle *et al*, 1992 y Ter Laak *et al*, 1992 fue la de 29 kD provenientes del cultivo de cepas de referencia, una de ellas obtenida del primer episodio de LC de cabras en Holanda, mientras que la del presente estudio provenía del rebaño utilizado en la obtención de las muestras, el cual presenta un historial de enfermedad recurrente.

Autores como Carne, 1982 y Wong, 1984 mencionan que la PLD tiene un peso molecular entre 13.5 y 40 kD por lo que Muckle y Gyles, 1986 sugieren la posibilidad de que *Corynebacterium pseudotuberculosis* produzca toxinas adicionales que puedan participar en la patogénesis de la enfermedad, por lo que se acentúa la necesidad de evaluar cada una de las fracciones obtenidas para conocer su valor patogénico.

No se encontraron trabajos que describan proteínas similares a las de 35, 60 y 190 kD reconocidas en éste estudio, podemos sugerir que quizá después de la centrifugación y al momento de decantar para separar el sobrenadante del paquete celular algunas bacterias pudieron ser arrastradas en el líquido y que éstas bandas encontradas provengan de esas bacterias.

Los resultados obtenidos en éste estudio relacionados con la utilización de la técnica de ELISA Indirecta usando como antígeno la PLD de *C. pseudotuberculosis* mostraron un elevado porcentaje de sueros negativos en ambos grupos, el elevado número de negativos del grupo experimental no muestra correlación con las observaciones clínicas ni con la historia del rebaño en donde algunos animales mostraban signos claros de enfermedad, los resultados de ésta ELISA pueden compararse en términos de sensibilidad con lo reportado por Sutherland *et al*, 1987 quien al usar la PLD como antígeno en una ELISA encontró varios animales negativos de entre aquellos que presentaban signos evidentes de la enfermedad y que a la necropsia mostraban lesiones, ésta baja sensibilidad podría sugerir una respuesta sostenida de anticuerpos a pesar de la eliminación del microorganismo o a una falta de estimulación para producir anticuerpos detectables para la exotoxina, esto aunado a que la respuesta inmune contra microorganismos intracelulares, como *C. pseudotuberculosis*, está mediada más que nada por células T del tipo Th 1 que actúan en primer término como células auxiliares promoviendo la proliferación de células B y la secreción de inmunoglobulinas aunque no estimulan la formación de anticuerpos la cual está dada principalmente por células T tipo Th 2 las que estimulan a las células B aumentando la producción de IgG, sin embargo la respuesta de Th 2 está vinculada mayormente a la inmunidad contra helmintos y en menor grado a microorganismos intracelulares como lo es *C. pseudotuberculosis* utilizado en el presente estudio. Simmons *et al*, 1988 comentan que los animales infectados naturalmente desarrollan anticuerpos IgG a PLD sin embargo existen diferencias significativas en la magnitud de las respuestas por lo que su identificación en pruebas serológicas, en éste caso ELISA, puede variar. La inmunidad mediada por células juega un papel importante en la protección contra la infección intracelular de *C. pseudotuberculosis*. La ausencia de una correlación directa entre los títulos de anticuerpos al antígeno y el estado de enfermedad indica que cualquier anticuerpo para el antígeno está involucrado en la protección a través de los mecanismos más directos, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o que el anticuerpo esté involucrado en la protección o quizá a la pérdida de efectividad debido a que ésta exotoxina como lo refiere Mendoza, 1986 es poco estable, pierde rápidamente toxicidad por calor a 60° C y de forma similar se altera con temperatura ambiente lo cual pudo haber sucedido en el presente estudio. Además algunos autores como Ellis *et al*, 1990 cuestionaron el uso de antígenos crudos en el campo para ELISA y otros como Brown y Olander, 1986 y Maki *et al*, 1985

cuestionan la pureza del antígeno ya que al realizar un análisis del sobrenadante proveniente del cultivo de *C. pseudotuberculosis* encontraron numerosas moléculas solubles sumadas a la exotoxina lo que puede provocar la inducción de anticuerpos semejantes que reaccionen cruzadamente con *C. pseudotuberculosis* por lo que se enfatiza la necesidad de mejorar la definición y purificación de los antígenos de ésta bacteria con el fin de obtener resultados más "reales" acerca del estado de salud de los animales, o bien, se puede utilizar una prueba de Western blot para confirmación de seropositividad, lo que en éste trabajo no se realizó.

Autores como Pépin *et al*, 1991 sugieren que la exotoxina no interviene de manera decisiva en la fase crónica de la enfermedad por lo que posiblemente no pueda ser fácilmente identificable así como la capacidad del organismo para estimular la producción de anticuerpos detectables para la PLD de aquí podría derivarse el elevado número de sueros negativos observados en éste estudio.

Se han realizado investigaciones utilizando la prueba de ELISA para el diagnóstico, con otros componentes además de la PLD, usada en éste estudio, como bacteria completa, pared celular y exotoxina recombinante, Maki *et al*, 1985 compararon la exotoxina cruda y diferentes lisados celulares observando que la primera fue mas sensible como antígeno de fase sólida que el mejor sonificado celular, en éste caso las condiciones en las cuales se llevó a cabo el estudio fueron controladas, inoculando borregos con suspensiones de bacteria viva, lo cual indicaría que los animales se encontraban en proceso agudo de infección por lo que los niveles de toxina eran elevados y su detección era mas fácil lo que en éste estudio no sucedió ya que los animales muestreados fueron infectados naturalmente y posiblemente la estimulación de los anticuerpos no fuera suficiente para ser detectados.

En un estudio de ELISA realizado por Kaba *et al*, 2001 usando un lisado celular de bacterias enteras como antígeno de fase sólida proveniente de un absceso de una cabra, se encontró una sensibilidad de 85% y una especificidad del 96% lo cual no puede compararse con los resultados del presente estudio puesto que éste trabajo buscaba detectar anticuerpos contra solo un componente antigénico de la bacteria (PLD) por lo que al presente estudio se le puede dar validez ya que solo se evaluó la exotoxina y no la bacteria completa por lo que los anticuerpos eran específicos para la exotoxina; en el caso de Ellis *et al*, 1990 usó tanto la pared celular como la toxina probando sueros de borregos adultos con LC adquirida naturalmente encontrando un 96% para la pared y un 84% para la exotoxina, en borregos positivos del mismo grupo la diferencia entre éstos resultados con los reportados en el presente trabajo son significativos, pero en éste estudio se probaron sueros de cabra por lo que es necesario evaluar la producción y comportamiento de los niveles de anticuerpos entre ambas especies.

También se ha utilizado como antígeno una Fosfolipasa D recombinante con *E. coli* encontrando una sensibilidad del 86.3% y una especificidad de 82.1%, usando cabras infectadas artificialmente y donde los niveles de anticuerpos para la PLD eran elevados por lo que podemos compararlo con éste estudio ya que

las cabras utilizadas estaban infectadas naturalmente, sin embargo su uso podría ayudar a la detección de pequeños rumiantes potencialmente infectados con propósitos de erradicación en rebaños de baja prevalencia y para examinar animales nuevos a introducir en rebaños libres de LC (Merzies *et al*, 1994), en otro estudio realizado por los mismos autores pero en el año 2004 evaluaron un interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) bovino y una PLD recombinante para diagnosticar cabras infectadas experimentalmente encontrando que la PLD-ELISA parece ser más sensible que la IFN- $\gamma$ -ELISA en cabras con infección activa, la ventaja de ésta última es que es más sensible en detectar evidencia de infección anterior o latente.

En adición con ELISA numerosos métodos diagnósticos pueden ser utilizados para detectar infecciones por *C. pseudotuberculosis* en pequeños rumiantes como Aglutinación en Tubo, Fijación de Complemento y Pruebas de Inmunodifusión en Gel (Shigidi, 1979; Burrell, 1980) con resultados variables siendo ELISA la que al parecer tiene mejor aplicación y resultado.



## VIII. CONCLUSIONES

- El aislamiento e identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* puede realizarse de manera rápida y sencilla.
- Se obtuvo el antígeno bacteriano (fosfolipasa D) a partir de la cepa aislada de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- La prueba de ELISA Indirecta puede ser utilizada no solo para diagnóstico e investigación sino también para estudios seroepidemiológicos tomando en cuenta el tipo de antígeno que se vaya a utilizar.
- Los resultados obtenidos en la presente investigación producto de la utilización de la toxina cruda mostraron un elevado porcentaje de negativos, lo cual acentúa la necesidad de purificar, identificar y evaluar los componentes de la toxina para conocer su valor patogénico así como determinar la sensibilidad y especificidad de diferentes antígenos en pruebas de diagnóstico en México lo que ayude al control y erradicación de la enfermedad. Además de tomar en cuenta diversos factores que puedan influir en los resultados como son las condiciones dentro de la explotación y el estado de los animales.
- Se requieren de más estudios para que esta prueba pueda ser estandarizada y así determinar su factibilidad, así como las condiciones de su uso en nuestro país como una prueba diagnóstica rutinaria en pequeños rumiantes.

## IX. APÉNDICE

### Apéndice I. Preparación de reactivos de ELISA.

#### Amortiguador carbonato-bicarbonato, pH 9.6, 0.1 M.

- a) Agregar 0.91 gramos de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 50 mililitros de agua destilada.
- b) Agregar 2.265 gramos de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 50 mililitros de agua destilada.
- c) Verter la solución  $\text{NaCO}_3$  a la solución  $\text{NaHCO}_3$ .

#### Solución de lavado.

- a) Disolver 1.29 gramos de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 3.99 gramos de fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 2.125 gramos de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) y 0.1 % de Tween 20 a 500 mililitros de agua destilada y desmineralizada.

#### Buffer de bloqueo.

A la solución de lavado se le agrega 3 % de leche "Svelty".

#### Solución de paro.

Agregar 3.3 mililitros de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado en agua destilada hasta completar 20 mililitros.

Apéndice II.

RESULTADOS EN TÉRMINOS DE UNIDADES DE ACTIVIDAD DE ANTICUERPOS

Grupo Experimental                      Grupo Control

No. individuos	Unidad de Actividad de Anticuerpos (Experimental)	No. individuos	Unidad de Actividad de Anticuerpos (Experimental)
1	56	45	55.513
2	78.749	46	53.534
3	64.299	47	58.435
4	85.59	48	67.26
5	159.365	49	137.04
6	55.331	50	63.43
7	34.438	51	49.821
8	53.89	52	55.23
9	55.987	53	42.587
10	65.417	54	33.176
11	77.523	55	45.711
12	77.040	56	79.17
13	51.296	57	73.227
14	89.337	No. individuos	Unidad de Actividad de Anticuerpos (Control)
15	139.195	58	67.486
16	50.288	59	39.114
17	58.645	60	37.417
18	94.812	61	48.81
19	87.175	62	49.186
20	67.902	63	68.226
21	91.498	64	36.006
22	96.38	65	58.706
23	53.925	66	52.591
24	84.728	67	47.996
25	39.221	68	51.817
26	92.651	69	47.313
27	58	70	48.727
28	65.129	71	48.867
29	57.723	72	30.424
30	112.68	73	113.572
31	44.236	74	46.359
32	74.639	75	81.903
33	64.841	76	32.514
34	135.59	77	49.858
35	803.746	78	32.785
36	82.564	79	44.189
37	53.17	80	47.783
38	63.172	81	518.19
39	91.93	82	34.967
40	73.342	83	34.967
41	83.582	84	38.725
42	172.68	85	23.891
43	194.664	86	26.861
44	74.927	87	28.886
Suero positivo	0.3470	88	55.325
Suero negativo	0.1215	Suero positivo	0.5385
		Suero negativo	0.2432

## X. BIBLIOGRAFÍA

- ADDO, P. B., and Dennis, S. M. (1977). Corynebacteria associated with diseases of cattle, sheep and goats in northern Nigeria. *Brit. Vet. J.* **135**:334-339.
- ALVES, F. S. F., and Olander, H. (1999). Uso de vaccina toxoide no controlado da linfadenite caseosa em camprinos. *Vet. Noticias.* **5**:69-75.
- ASHFAQ, M. K., and Campbell, S. G. (1980). Experimentally induced caseous lymphadenitis in goats. *Am. J. Vet. Res.* **41**:1789-1792.
- BAIRD, G. (1997). Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Vet. Rec.* **140**:611.
- BATEY, R.G. (1986). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.* **63**:269-272.
- BENHAM, C. L., Seaman, A., and Woodnine, M. (1962). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in disease of animal. *Vet. Bull.* **32**:645-657.
- BLOOD, D. C., Henderson, J. A., and Radostits, O. M. (1979). Caseous lymphadenitis in sheep. In "Veterinary Medicine". 5<sup>th</sup> ed. Bailliere Tindall, Londres. 420-421.
- BRADFORD, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* **72**:248-254.
- BRODGEN, K. A., Cutlip, R. C., Lehmkuhl, H. D. (1985). Immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the effect of adjuvants in mice. *J. of Comp. Pathol.* **95**:167-173.
- 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**:2322-2326.
- BROWN, C. C., Olander, H. J., Biberstein, E. L., and Morse, S. M. (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goat against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* **47**:1116-1119.
- BROWN, C. C., and Olander, H. J. (1987). Caseous lymphadenitis in goat and sheep. A review. *Vet. Bull.* **57**: 1-12.

- BUDDLE, B. M., De Lisle, G. W., Pfeffer, A., and Aldwell, F. E. (1995). Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with allow desa of VCG. *Vaccine* 13:1123-1130.
- BURRELL, D. H. (1978). Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. *Res. Vet. Sci.* 24:269-270.
- BURRELL, D. H. (1980). A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. *Res. Vet. Sci.* 28:234-237.
- BURRELL, D. H. (1981). Caseous lymphadenitis in goats. *Aust. Vet. J.* 57:105-110.
- CAMERON, C. M., and Fuls, W. J. (1973). Studies on the enhancement of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 40:103-114.
- CARNE, H. R., and Onon, E. O. (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature.* 271:246-248.
- CARNE, H. R., and Onon, E. O. (1982). The exotoxins of *Corynebacterium ulcerans*. *J. Hyg. (Camb).* 88:173-191.
- CETINCAYA, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., Debaere, T., and Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiol.* 88:75-83.
- COLL, M. J. (1993). Técnicas de Diagnóstico en Virología. Ediciones Díaz de Santos. 239-278.
- COUTERAU, P. H., and Laval, A. (1974). La linphadenie caséuse: maladie des abcès du mouton. *Rév. Méd. Vét.* 125:637-646.
- COWAN, S. T. and Steel, K. J. (1974). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, second edition. Cambridge University Press, Cambridge. 217-220.
- CUBERO, P. M. J., Real, F., González, M., y León-Vizcaino, L. (2002). Epidemiología de la Pseudotuberculosis. Enfermedades Infecciosas. Universidad de Murcia y Universidad de Las Palmas.

- DAINES, L. L., and Austin, H. (1932). A study of so-called skin lesion and nonvisible-lesion tuberculin-reacting cattle. *JAVMA*. **80**:414-436.
- DE JONG, M. F. (1980). Pathogenicity test for *Pasteurella multocida* isolates. *Proc. Int. Pig. Vet. Sec. Cong. Copenhagen*. 211.
- EGEN, B., Cuevas, A. W., Macnamara, P., Sammons, D. W., Humphreys, R., and Songer, J. G. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.* **50**(8):1319-1322.
- ELLIS, T. M., Sutherland, S. S., Wilkinson, F. L., Mercy, A. R., and Paton, M. W. (1987). The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions and the transmission of this bacterium to other sheep. *Aust. Vet. J.* **64**:261-263.
- ELLIS, J. A., Hawk, D. A., Holler, L. D., Mills, K. W., and Pratt, D. L. (1990). Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**:1609-1613.
- ELLIS, J. A., Hawk, D. A., Mills, K. W. And Pratt, D. L. (1991). Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep whit caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **28**:289-301.
- ESPINOZA, C. R. y Tórtora, P. J. (1992). Abscesos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en cabras lecheras. *Memorias VIII Reunión Nacional de Caprinocultura. Oaxaca México*. 110-114.
- EGGLETON, D. G., Middleton, H. D., Doidge, D. G., and Minty, D. W. (1991). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison with of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J.* **68**:317-319.
- GARCÍA, S. E. (1980). Aislamiento y caracterización de corinebacterias de muestras de ovinos y caprinos en México. Tesis de Licenciatura. ENEP-Cuautitlán. UNAM.
- HARD, G. C. (1969). Immunity to experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the mouse peritoneal cavity. *Res. Vet. Sci.* **10**:547-554.
- HARD, G. C. (1972). Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. *J. Med. Microbiol.* **5**:483-490.

- HARD, G.C. (1975). Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 12:1439-1449.
- HELLMANN, E., Hartwig, H., Marx, M., and Lübke, A. (1995). *Corynebacterium*-Infektionen. In "Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren" (H. Blöbel und Th. Schliebs eds.). Band II, teil 3. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 155-195.
- HENDERSON, A. (1979). Pseudotuberculosis adenitis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*. *J. Med. Microbiol.* 12:147-149.
- HODGSON, A. L., Tachedjian, M., Corner, L. A., and Radford, A. J. (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity.* 62(12):5275-80.
- HOLSTAD, G. (1986). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. II. The prevalence of caseous lymphadenitis in 36 goats herds in northern Norway. *Acta. Vet. Scand.* 27:584-597.
- HSU, T. Y., Renshaw, H. W., Livingston, C. W., Augustine, J. L., Zink, D. L., and Gauer, B. B. (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.
- INSTITUTO Pourquier, Francia (Kit de Diagnóstico para MAEDI-VISNA)
- JOLLY, R. D. (1965a). The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. *NZ. Vet. J.* 13:141-147.
- JOLLY, R. D. (1965b). Experimental infection of convalescent mice with *Corynebacterium ovis* infection in mice. *NZ. Vet. J.* 13:147-153.
- JOLLY, R. D. (1965c). The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. *J. Comp. Pathol.* 75:417-431.
- JOLLY, R. D. (1966). Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. *J. Appl. Bacteriol.* 29:189-196.

- JUDSON, R., and Songer, J. G. (1991). *Corynebacterium pseudotuberculosis* : *in vitro* susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Vet. Microbiol.* 27:145-150.
- KABA, J., Kutschke, L., and Gerlach, G-F. (2001). Development of an ELISA for the diagnosis *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Vet. Microbiol.* 78:155-163.
- KNIGHT, H. D. (1978). A serologic method for detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Vet. Cornell.* 68:220-237.
- KURIA, J. K., Mbutia, P. G., Kangethe, E. K., and Wahome, R. G. (2001). Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Vet. Res.* 25:89-97.
- LAN, D. T. V., Tanigushi, S., Makino, S., Shirahata, T., and Nakane, A. (1998). Role of endogenous tumour necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 42:863-870.
- LEÓN, L. (1985). Patología y control de las infecciones animales por *Corynebacterias*. En *Microbiología 83. IX Congreso Nacional de Microbiología*. Ed. Sociedad Española de Microbiología. 2:411-416.
- LÓPEZ, J. F., Wong, F. M., and Quesada, J. (1966). *Corynebacterium pseudotuberculosis* first case of human infection. *Am. J. Clinl. Pathol.* 46:562-567.
- MAKI, L. R., Shen, S. H., Bergstrom, R. C., and Stetzenbach, L. B. (1985). Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep, using an enzyme- linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 46:212-214.
- MIERS, K. C. and Ley, W. B. (1980). *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in the Horse. *J. of Am. Vet. Med. Assoc.* 177 (3).
- MILLOT, P. (1989). Sheep major histocompatibility (OLA) complex: apparent involvement in a flock endemic infection by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Exp. Clin. Immunogenet.* 6:225-235.
- MEDRANO, G. G., Hung, Ch. A., Alvarado, S. A., and Li, E. O. (2003). Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 14(1):61-67.



- 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.
- MENZIES, P. I., and Muckle, C. A. (1989). The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. *Can. J. Vet. Res.* 53:313-318.
- MENZIES, P. I., Muckle, C. A., Hwang, Y. T., and Songer, G. J. (1994). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Small Rumin. Res.* 13:193-198.
- MENZIES, P. I., Hwang, Y-T., and Prescott, J. F. (2004). Comparison of and interferon- $\gamma$  to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 100(1-2):129-137.
- MORILLA, G. A. (1978). *Inmunología Veterinaria. Manual de Laboratorio.* Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México A. C. 15pp.
- MUCKLE, C. A. (1983). Exotoxic activities of to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Ph D. Diss., University of Guelph, Ontario.
- MUCKLE, C. A., Menzies, P. I., Li, Y. T., Hwang, Y., and Van Wesenbeeck, M. (1992). Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 30:47-58.
- MUÑOZ, G. M. A. (1997). Determinación por Western Blot de los Antígenos de Excreción-Secreción de la Larva 2 de *Toxocara canis* que son Reconocidos por Sueros de Cachorros Infectados Naturalmente. Tesis de Licenciatura, FES-Cuautitlán. UNAM.
- NAIRN, M. E., and Robertson, J. P. (1974). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep: role of skin lesions and dipping fluids. *Aust. Vet. J.* 50:537-542.
- NAIRN, M. E., Robertson, J. P., and McQuade, C. C. (1977). The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination. *Proce. 54<sup>th</sup> Ann. Conf. Austr. Vet. Ass.* 54:159-161.
- NAKAMURA, K., Momotani, E., Yokomizo, Y., Yugi, H., and Shoya, S. (1981). Pathological changes in sheep infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* 21:150-151.

- NAVARRETE, G. S. M. (1988). Obtención de Toxina a partir del Aislamiento de *Corynebacterium ovis*. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM.
- NORD, K., Holstad, G., Eik, L. O., and Grfnstfl, H. (1998). Control of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus and *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a Norwegian goat herd. *Acta. Vet. Scand.* **39**:109-117.
- PATON, M. W., Rose, I. R., Hart, R. A., Sutherland, S. S., Mercy, A. R., Ellis, T. M., and Dhaliwal, J. A. (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust. Vet. J.* **71** (2): 47-49.
- PAULE, B. J. A., Azevedo, V., Regis, L. F., Carminati, R., Bahía, C. R., Vale, V. L. C., Moura-Costa, L. F., Freire, S. M., Nacimiento, I., Schaer, R., Goes, A. M., and Meyer, R. (2003). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in gotas: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* **96**:129-139.
- PÉPIN, M., Pardon, P., Lantier, F., Marley, J., Levieus, D., and Lamand, M. (1991). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet. Microbiol.* **26**:381-392.
- PÉPIN, M., Seow, H. F., Corner, L., Rothe, J. S., Hodgson, A. L. M., and Wood, P. R. (1997). Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various estrains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.* **28**:149-163.
- PIJOAN, P., y Tórtora, J. (1985). Linfadenitis Caseosa. Principales Enfermedades de los Ovinos y Caprinos. 235-239.
- PRESCOTT, J. F., Menzies, P. J., and Hwang, Y.-T. (2002). An interferon- $\gamma$  assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. *Vet. Microbiol.* **88**:287-297.
- RADOSTITS, O. M.; Gay, C. C.; Blood, D. C. and Hinchcliff, K. W. (2001). Medicina Veterinaria: Tratado de las Enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª Edición Vol. I McGraw-Hill. Madrid, España.

- RAMÍREZ, C. I. C., Valero, E. G., y Pijoan, A. C. (1992). Infección experimental de Linfadenitis Caseosa en ovinos. *Téc. Pec. Méx.* **30**(2):100-108.
- RICHARD, Y., Fontaine, M., Oudart, J., and Fontaine. M.P (1979). Contribution a l'étude de l'épidémiologie et de la pathogenie de la maladie des abcès du mouton. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.*, **2**:125-148.
- RIZVI, S., Green, L. E., and Glover, M. J. (1997). Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Vet. Rec.* **140**:586-587.
- SCHREUDER, B. E., Ter Laak, E. A., and Griesen, H. W. (1986). An outbreak of caseous lymphadenitis in dairy goats: first report of the disease in the Netherlands. *Vet. Q.* **81**:61-67.
- SCHREUDER, B. E., Ter Laak, E. A., and Dercksen, D. P. (1994). Eradication of caseous lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed ELISA technique. *Vet. Rec.* **135**:174-176.
- SCHUMMER, A., Wilkens, H., Vollmerhaus, B.; and Habermehl, K-H. (1981). The circulatory system, the skin and the cutaneous organs of the domestic mammals. En "The anatomy of the domestic animals" (R. Nickel, A. Schummer, E. Seiferle, ed.). *Verlag. Paul. Parey*, Berlin. 3:269-440.
- SHIGIDI, M. T. A. (1978). An Indirect Haemagglutination test for the sero-diagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Res. Vet. Sci.* **24**:67-60.
- SHIGIDI, M. T. A. (1979). A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Br. Vet. J.* **135**:172-177.
- SIMMONS, C. P., Dunstan, S. J., Tachedjian, M., Krywult, J., Hodgson, A. L. M., and Strugnell, R. A. (1998). Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun.* **66**.
- SKALKKA, B., Literak, I., Michalik, I., and Skrivanek, M. (1998). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats in the Czech Republic. *Zentralbl Veterinarmed (B)*. **45**:31-35.
- SIMMONS, C. P., Dunstan, S. J., Tachedjian, M., Krywult, J., Hodgson, A. L. M., and Strugnell, R. A. (1998). Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* **66**:474-479.

- SMITH, J. E. (1966). *Corynebacterium* species as animal pathogenesis. *J. Appl. Bacteriol.* **29**:119-130.
- SMITH, M. C., and Sherman, D. M. (1994). *Goat Medicine*. Lea & Febiger, USA. 46-61.
- SMITH, I. J., Squires, M. B., and McGregor, H. (1997). Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Vet. Rec.* **140**:635.
- SONGER, J. G., Libby, S. J., Iandolo, J. J., and Cuevas, W. A. (1990). Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **58**:131-136.
- SOUCEK, A., Michalec, C., and Souckova, A. (1967). Enzymic hydrolysis of sphingomyelins by a toxin of *Corynebacterium ovis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **144**:180-186.
- SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) The Apache Software Foundation. Wes 1999-2003 USA.
- STANFORD, K., Brogden, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C., and Audibert, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. of Vet. Res.* **62**(1):38-43.
- STING, R., Steng, G., and Spengler, D. (1998). Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. *Zentralb. Veterinarmed.* **45**:209-216.
- STOOPS, S. G., Renshaw, H. W., and Thilsted, J. P. (1984). Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesions distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from Western United States. *Am. J. Vet. Res.* **43**:557-561.
- SUTHERLAND, S. S., Ellis, T. M., Mercy, A. R., Paton, M., and Middleton, H. (1987). Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in sheep. *Vet. Microbiol.* 263-266.
- TER LAAK, E. A., Bosch, J., Bijl, G. C., and Schreuder, B. E. C. (1992). Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.* **53**(7):1125-1132.
- TERNYNCK, Th., and Avrameas, S. (1989). *Técnicas Inmunoenzimáticas*. Grupo Editorial Iberoamérica, 128-138.

TIZARD, I. R. (1995). *Inmunología Veterinaria*, Quinta edición. McGraw Hill Interamericana. 313-321.

UNANIAN, M. M., Feliciano, A. E., and Pant, K. P. (1985). Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north east Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 17:57-62.

WALKER, J., Jackson, H., Brandon, M. R., Meeusen, E. (1990). Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. *Clin Exp Immunol*, 86: 13-18.

WALKER, J., Jackson, H. J., Eggleton, D. G., Meeusen, E. M. T., Wilson, M. J., and Brandon, M. R. (1994). Identification of a Novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Am. Soc. for Microbiol.* 62(6):2562-2567.

WELSH, R. D. (1990). *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the Horse. *Equine Practice*. 12(2).

WILLIAMS, C. S. F. (1981). Diagnostic différentiel e la lymphadenie caseuse chez le chèvre. *Le Point Vet.* 12:51-56.

WINTER, A. C. (1997). Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Vet. Rec.* 140:611.

WONG, J. P., and Groman, N. (1984). Production of diphtheria toxin by selected isolates of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 43:1114-1116.

[www.fortdodge.com.mx](http://www.fortdodge.com.mx)

YERUHAM, I., Elad, D., Van-Ham, M., Shpigel, N. Y., and Perl, S. (1997). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. *Am. J. Vet. Res.* 140:423-427.