

37
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA TOXINA CRUDA DE
Corynebacterium ovis EN ANIMALES DE
LABORATORIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N :

ALEJANDRO GOMEZ DE LA ROSA

JOSE LUIS ALCALA GONZALEZ

ASESORA: M.V.Z. SUSANA GARCIA VAZQUEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

| | PAGINA |
|-------------------------------|--------|
| RESUMEN | |
| I.- INTRODUCCION | 1 |
| II.- OBJETIVOS..... | 21 |
| III.- MATERIAL Y METODOS..... | 22 |
| IV.- RESULTADOS..... | 29 |
| V.- DISCUSION..... | 34 |
| VI.- CONCLUSIONES..... | 37 |
| VII.- BIBLIOGRAFIA..... | 38 |

R E S U M E N .

La Linfadenitis Caseosa producida por Corynebacterium ovis, es una enfermedad común entre ovinos y caprinos de muchos países, ésta enfermedad puede disminuir la producción y ocasionar emaciación y muerte.

Siendo ésta, una enfermedad crónica representa particular importancia debido a que las manifestaciones clínicas pueden pasar desapercibidas sobre todo en donde existen grandes explotaciones de animales, a nivel de rastro es una de las principales causas de decomiso llegando a representar hasta el 60 % del decomiso total en el Rastro Frigorífico de Ferrería.

Algunos reportes indican que los animales que son sometidos a necropsia en otros países, el 20% independientemente de la enfermedad que sea objeto de necropsia están condenados a presentar lesiones causadas por Linfadenitis Caseosa.

Considerando lo anterior se realizó el presente estudio para evaluar el efecto de la toxina cruda y ultrafiltrada de C. ovis en diferentes pruebas biológicas tales como: Dermonecrosis en cuyes, Letalidad en ratón adulto y Letalidad en ratón lactante.

1. INTRODUCCION

La cría de ovinos y caprinos se ha limitado en la economía pecuaria nacional a una forma de explotación extensiva y rudimentaria, adoleciendo de las mínimas condiciones de alimentación y manejo. La explotación de ovinos y caprinos en México es un renglón de la administración rural que en la actualidad no se aprovecha debidamente, pues el desarrollo que ha tenido no corresponde a la importancia que merece (Pérez,1979; Arbiza,1984).

Se debe reconocer como un hecho real que el 90% de los 6'400,000 ovinos y 9'638,000 de cabras existentes en México están en manos de personas de escasos recursos manejados con un nivel de tecnología sumamente pobre, sufriendo todo género de deficiencias (Alarcón,1984). Este porcentaje de ovinos y caprinos ocupa de una manera u otra una superficie considerable y consumen pastos y alimentos que no son correctamente aprovechables. El problema presenta facetas técnicas, sociales, educativas, económicas y políticas; dado que la estructura de la población ovina nacional ha estado constituida en 10% por ganado fino, 18% por ganado cruzado y 72% por ganado corriente, si a ésto agregamos la escasa atención en lo referente a la prevención y control de enfermedades, la deficiente alimentación del ganado en épocas críticas, la falta de programas de mejoramiento genético y de manejo en general, podemos deducir fácilmente que la eficiencia de la productividad en éste ramo deja mucho que desear (Casas,1973; Lezama,1976; Lazo,1976).

Dentro de la producción ovina y caprina existen enfermedades muy importantes de las que se pueden citar: gastrointestinales, neumonías, linfadenitis caseosa, que tienen una repercusión económica considerable debido a la reglamentación concerniente al comercio de canales que manifiestan estas enfermedades (Rodríguez, 1969).

De acuerdo a la información obtenida del Libro de Registros de Matanza y Decomiso en el Rastro de Ferrería en el período de Enero a Septiembre de 1987 (cuadro N° 1). La matanza registrada fue de 188,008 ovinos y caprinos nacionales con un total de 14,849 decomisos es decir el 7.9%, el cual corresponde al decomiso por linfadenitis.

Cuadro N° 1.

PORCENTAJE DE LAS PARTES DECOMISADAS EN LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES OVINAS Y CAPRINAS.

| ORGANOS DECOMISADOS | N° | % | ENFERMEDAD |
|---------------------|---------------|-----|--------------------------------------|
| Visceras Torácicas | 9,128 | 61 | Linfadenitis Caseosa |
| Hígados | 4,761 | 33 | Fascioliasis |
| Cabezas | 735 | 5 | Linfadenitis Caseosa |
| Canales | 225 | 1 | Linfadenitis Septicemia Traumatismos |
| Decomisos | TOTAL: 14,899 | 100 | |

Linfadenitis Caseosa

Es una de las enfermedades importantes en borregos y cabras. Es una enfermedad crónica causada por Corynebacterium ovis (sinonimia C.pseudotuberculosis) está caracterizada por necrosis caseosa de los ganglios linfáticos.

El agente causal es una bacteria cocoide o un bastón pequeño que muestra tendencia a formar grupos en una disposición en empalizada. Es inmóvil, carece de cápsula y es Gram (+). Es aerobio y anaerobio facultativo, crece a 37°C a un pH de 7.0 a 7.2 se obtiene un mejor crecimiento si se adiciona suero al medio de cultivo; en agar sangre las colonias son muy características, al tocarlas con el asa de platino se fragmentan con facilidad, se desarrollan lentamente y su tamaño máximo lo alcanzan días después de su incubación (Hagan y Bruner, 1983; Carter, 1985).

C. ovis produce una exotoxina filtrable que es letal para algunos animales domésticos y de experimentación. Se ha reportado que la exotoxina es producida por todas las cepas del microorganismo y que la toxina producida por todas las cepas es la misma, sin embargo existe una variación sustancial en la toxigenicidad de diferentes cepas, sugiriendo diferencias en la cantidad de toxina producida por las mismas (Doty, 1964; Hsu, 1985).

Las propiedades físicas de la toxina se han estudiado pero existen controversias acerca de su peso molecular y su punto isoeléctrico. Hsu y colaboradores (1985) reportan que la exotoxina de C. ovis tiene actividad de fosfolipasa D, con un peso molecular de 31,000 Daltons y un punto isoeléctrico de 9.6 aproximadamente. Esta toxina es respon-

sable de diferentes actividades biológicas que pueden ser encontradas en sobrenadantes de cultivo ; letalidad en algunos animales incluyendo pequeños ruminantes gnotobióticos, actividad parcial de hemolisina "in vitro" y hemólisis "in vivo" inhibición de la hemolisina Beta - estafilococal, factor promotor de la permeabilidad vascular y necrosis de algunos tejidos. Estas actividades se comportan idénticamente cuando se emplea la precipitación con sulfato de amonio, inactivación con formaldehído y calentamiento, neutralización con antitoxina y fraccionamiento Sephadex G-100 (Lovell,1966;Goel,1972; Burrell,1981).

La filtración en gel de la exotoxina demuestra que ésta tiene 2 componentes: una, denominada fracción T1 y otra, fracción T2, siendo en ésta última en donde encontramos mayor contenido de proteína. La actividad tóxica más importante está presente en la fracción T1 que tiene elevado peso molecular y la fracción T2 se encontró que es de bajo peso molecular (Goel,1972).

Se han realizado otros estudios sobre la toxina producida por Corynebacterium ovis así como su acción letal en ratones blancos. Con éste fin se utilizaron 73 de 75 cepas de C. ovis las cuales produjeron una toxina letal que provocó la muerte de los ratones en 4 días, una cepa no tóxica se aisló de un venado y otra, de una vaca. Toxinas de cepas de borrego, caballo y búfalo fueron relacionadas entre sí a través de la prueba de protección en ratón. El sobrenadante de cultivos de Corynebacterium ovis mata a ratones de 24 a 36 horas con cambios post-mortem de intoxicación, mientras que otros ratones mueren de 5 a 10 días mostrando lesiones piogénicas. Algunos autores reportan que el ratón es refractario a la toxina de C. ovis y una dosis de 5 ml no es efectiva por inyección subcutánea (Lovell y Zaki,1966)

Se ha detectado además que la toxina tiene actividad dermonecrótica en conejos y cuyes (Shigidi, 1978).

Carne (1956) encontró que al remover los lípidos no afecta la viabilidad de la bacteria. El lípido es una sustancia grasosa, no tóxica para cuyes, conteniendo ácido Corynemicólico, el cual es similar a la cera D de Micobacterias. Jolly (1966) demostró que la presencia de lípidos está ligada con la virulencia y la disponibilidad de C. ovis para crecer en medio líquido y el lípido juega un papel importante en la patogénesis de la infección. Las células bacterianas libres de lípidos por remoción con formalina retardan la habilidad de producir abscesos en cuyes infectados con cantidad suficiente. La célula bacteriana contiene un factor piogénico como toxina protoplasmática independiente del lípido tóxico. Se ha evidenciado que ésta sustancia piogénica es estable al calor y puede jugar un papel sinérgico con el lípido de superficie en el desarrollo de lesiones caseosas (Lovell, 1966; Cameron, 1970).

Se ha mostrado también que sólo las bacterias que crecen bajo condiciones favorables de cultivo, poseen el factor piogénico en la toxina protoplasmática y que la presencia de éstas sustancias está condicionada con su habilidad para inducir una inmunidad protectora (Cameron, 1966).

Se han efectuado estudios sobre la relación de la producción de exotoxina y el contenido del lípido para la virulencia de Corynebacterium ovis en ratones. De 25 casos de Linfadenitis Caseosa en cabras se aisló C. ovis de las lesiones; se examinaron las paredes celulares para medir la producción de exotoxina, contenido lipídico y la virulencia en ratones. La exotoxina en caldo de cultivos filtrados

de los 25 casos se midió por la prueba de inhibición de la hemolisina Beta - estafilococal (BHI) y radioensayo de fosfolipasa D . Todos los casos fueron positivos para exotoxina en ambas pruebas y un caso tuvo una respuesta mayor que los otros ya que la correlación entre la prueba BHI y radioensayo fue pobre, pudiendo ser que el radioensayo sólo detecta enzimáticamente a la exotoxina activa , mientras que la prueba BHI detecta actividad en la exotoxina inactiva . En todos los casos existió virulencia en ratones a 2 dosis iguales produciendoles una enfermedad aguda, subaguda y crónica . Existe una relación directa entre el porcentaje del lípido y la inducción de abscesación crónica en ratones, pero no entre el contenido del lípido y la mortalidad . Aunque la producción de exotoxina in vitro puede no estar relacionada cuantitativamente a la virulencia, los resultados de la inoculación de ratones con células bacterianas y sobrenadantes de medios de cultivo son compatibles con el papel que desempeña la exotoxina en la enfermedad . La exotoxina y lípidos de la pared celular de C. ovis son considerados los principales factores de virulencia (Muckle,1983).

Corynebacterium ovis inyectado por vía intravenosa en borregos produce también una hemolisina la cual es capaz de dar origen a hemoglobinuria e ictericia . La hemolisina no está correlacionada con la exotoxina y no es antigénica, es termolábil, sensible al oxígeno y ésta asociada a las células bacterianas (Shigidi,1978; Alarcón,1984).

Corynebacterium ovis ocasiona infecciones supurativas en ovejas, cabras y caballos . Los animales de laboratorio también son susceptibles a la enfermedad . Aunque la Linfadenitis Caseosa ocurre en todas las razas y sexos, los Merinos por su tipo de piel arrugada sufren más heridas en la trasquila y por ésta razón son más susceptibles, aún

cuando también se ha reportado susceptibilidad genética (Nelson,1970; Frappe,1981; Jensen,1982;Jubb y Kennedy,1975).

Se ha determinado como una de las principales vías de infección las heridas producidas en la esquila, el descole y la castración. Muchos autores coinciden en que el material purulento de abscesos abiertos es el principal origen de la infección en borregos. Réportes de la infección en ovejas enfatizan que la esquila es el principal factor precipitante para que el microorganismo penetre al cuerpo, como resultado de esto los ganglios linfáticos superficiales se abscedan. La inhalación e ingestión de C. ovis se han sugerido también como rutas de entrada (Ashfaq,1980).

Actualmente se ha demostrado que hay otra fuente más importante de infección: el líquido desinfectante aplicado a las ovejas poco antes de trasquillarlas. La bacteria puede sobrevivir en los líquidos comerciales elaborados para éstos fines por lo menos durante 24 horas y la infección se propaga por la piel aunque esté intácta. La oveja lavada con el líquido contaminado, todavía 2 semanas después de haber sido trasquilada está muy susceptible a la infección por la facilidad de contacto entre la bacteria y la piel (Blood y Henderson,1985).

En las cabras la vía de transmisión no es muy conocida sin embargo se atribuye al contacto cercano entre animales. En producciones intensivas de cabras son importantes las instalaciones contaminadas con el microorganismo, se ha sugerido la trasmisión por vía oral; las cabras de Angora son especialmente susceptibles a éstas infecciones. Al igual que las ovejas, las cabras también están expuestas a éstos agentes que llegan a través de infecciones por heridas, lesiones por penetración de simientes de hierbas, castración y mordeduras de garrapatas (Williams,1980).

Se consideran como vías de transmisión secundarias: la digestiva, respiratoria y umbilical (Nairn,1974; Ayers,1977; Blood y Henderson,1985).

Existen antecedentes sobre la inducción experimental de Linfadenitis Caseosa en cabras. A éste respecto Ashfaq y Campbell inocularon 1×10^6 de Corynebacterium ovis por 3 vías; subcutánea, intradérmica y submucosa. El período de incubación para el desarrollo de abscesos en dicho experimento tuvo un rango de 41 a 147 días, el promedio existente fué de 95.2 días, el período de maduración de los abscesos de C. ovis en un rango de 9 a 37 días con un promedio de 20.3 días. La infección se extendió a ganglios linfáticos mediastínicos en una cabra y a ganglios linfáticos lumbares en 5 cabras. Ninguna de las cabras tuvo abscesos en ganglios linfáticos mesentéricos. Corynebacterium ovis fué recuperado de ganglios linfáticos abscedados pero no de heces o secreciones nasales. Las tres vías de inoculación no tuvieron una marcada diferencia en el desarrollo de la enfermedad, porque todos los ganglios linfáticos regionales drenaron puesto que los sitios de inoculación ya sea subcutánea, intradérmica o submucosa se abscedaron. Esto da un claro indicio de que las lesiones de piel expuestas a infección pueden llevar a la abscepción de los ganglios linfáticos regionales y también que la dosis de 1×10^6 CFU (Unidades Formadoras de Colonias) de C. ovis puede ser usada para reproducir la enfermedad. Es también evidente que la ingestión de material purulento conteniendo gran número de microorganismos puede llevar a la formación de abscesos mandibulares. Abscesos en los ganglios mediastínicos fueron observados solamente en 2 cabras (Ashfaq y Campbell,1980).

La incidencia de la enfermedad se incrementa conforme a la edad, ya que las infecciones producidas por el constante trasquilado se van acumulando hasta los 4 años. La enfermedad tiene baja prevalencia en

cabras menores de 6 meses, se reporta que es raro observarla en corderos y se define como una enfermedad que afecta comunmente a ovinos y caprinos adultos (Nelson,1970; Jensen,1982; Alarcón,1984).

Durante la época de esquila los ganglios afectados pueden romperse y contaminar las pequeñas lesiones cutáneas que a su vez infectan otras heridas de la piel. El C. ovis es capaz de sobrevivir prolongadamente en heces de animales infectados, así como en suelos húmedos ricos en materia orgánica (Nelson,1970; Jubb y Kennedy,1985).

Una vez que el Corynebacterium ovis ha ganado la entrada al cuerpo es transportado por la linfa aferente a los ganglios linfáticos regionales en los cuales se producen abscesos característicos. A partir de los nódulos linfáticos puede ocurrir diseminación sistémica. Se ha demostrado que C. ovis es una bacteria intracelular facultativa de monocitos y macrófagos, el papel de éstas células en el proceso de diseminación no ha sido aclarado. Estudios sobre la patogénesis de la enfermedad han considerado primariamente las propiedades patogénicas de la exotoxina de C. ovis y el material de la pared celular (Ashfaq,1979; Brogden, 1984 B).

Aunque se pueden producir abscesos en la enfermedad subaguda en ratones por varias vías y dosis de inoculación de C. ovis, la utilidad de éste modelo de laboratorio para examinar los efectos de la exotoxina y su relación con la enfermedad natural en ovejas se ha cuestionado (Jolly,1965 B).

El papel de la exotoxina es probablemente el de facilitar la presentación de lesiones caseosas. En la infección natural parece ser que facilita la difusión de la bacteria, actuando como un factor que aumente la permeabilidad, siendo la evidencia experimental que la toxina de C. ovis es una fosfolipasa D que ataca a la esfingomielina de la membrana de células endoteliales. Es así como se

consideran dos formas de acción de la toxina. La primera sería un efecto indirecto en el que actúa la toxina sobre los mastocitos asociados estructuralmente con vasos sanguíneos provocando la liberación de histamina y de 5- hidroxitriptamina que luego actúa sobre membranas de revestimiento de los endotelios adyacentes de vasos sanguíneos aumentando su permeabilidad. La segunda acción se trata de un efecto directo de la molécula de la toxina sobre las células endoteliales . Debido a ésto se origina una desconexión parcial entre éstas células a lo largo de las conexiones intercelulares formando así aberturas continuas que provocan la salida de plasma. Probablemente ésto es ocasionado por la debilidad química de la unión específica de los componentes. La esfingomiélin que es desdoblada por C. ovis forma parte de una importante lipoproteína estructural de la membrana celular. Es interesante que la alfa toxina de Clostridium perfringens , otro agente activo de la permeabilidad es una lipasa C y ataca a la lecitina el componente fosfolípido de otras importantes lipoproteínas estructurales de membrana celular (Carne,1978; Ellis,1983; Hagan,1983).

La exotoxina contiene un factor de permeabilidad el cual le permite una difusión local del organismo y a la vez incrementa la oportunidad de que la bacteria sea transportada a sitios distantes y éste efecto puede ser neutralizado con antitoxina. A ratones protegidos con antitoxina no se les previene la formación de pus después de la inoculación con suspensiones bacterianas lavadas. Sin embargo la antitoxina es capaz de prevenir la difusión de la infección desde la lesión pustular hacia otros sitios. Se ha mencionado que la inmunidad producida depende de la inhibición de la multiplicación secundaria de la bacteria y no de la actividad antitóxica (Zaki,1976; Corrie,1986).

Los anticuerpos que se desarrollan contra la exotoxina posiblemente origina una reacción local de Arthus que se incrementa y resulta en trombosis, infarto e infiltración de neutrófilos. La trombosis puede atribuirse a la acción directa de la exotoxina la cual causa lisis a las células in vitro, sin embargo calentando la toxina y aplicandola en la prueba reactiva de piel a 100°C durante 15 minutos, se destruye la actividad de la exotoxina (Corrie,1985).

La exposición del lípido de superficie de C. ovis a macrófagos peritoneales reduce la viabilidad celular y la actividad glicolítica e induce signos ultraestructurales que consisten en daño letal agudo. Los neutrófilos y macrófagos de conejo y cuye son más resistentes a los efectos de ingestión de C. ovis, ésta variación en la respuesta en diferentes especies está asociada a la presencia de un lípido de superficie intacto, solamente en C. ovis ingerido por macrófagos de ratón; sugiriendo que el lípido no solamente tiene un efecto toxico degenerativo en células del hospedero, sino que también protege contra la destrucción lisosomal intracelular del microorganismo. Muchas cepas virulentas de C. ovis poseen cuantitativamente más lípido extraíble que cepas atenuadas.

La respuesta de macrófagos de ovino a C. ovis no ha sido examinada completamente, se supone que la capa lipídica está involucrada en forma similar en la expresión de la patogenicidad de los microorganismos en casos naturales de Linfadenitis Caseosa ovina (Jolly,1966;Muckle,1983).

Corynebacterium ovis puede producir leucostasis pulmonar en trombos capilares activando el sistema de Complemento generando C 5a y aumentando adherencia granulocítica como son sugeridas en otras infecciones por bacterias Gram positivas (Brogden,1984 A; Corrie,1985).

Se realizó una investigación sobre la acción patógena de la exotoxina de *C. ovis* inyectada por vía intradérmica en muchas especies animales y se observó que puede ser letal o causar área local de inflamación y necrosis. La muerte por infección aguda no es característica de la afécción, sin embargo el efecto local de la toxina es muy interesante. La inyección intradérmica de la toxina muy diluida provoca área local de inflamación intensa y necrosis, mientras que la inyección subcutánea causa acumulación de fluido gelatinoso en el sitio de inoculación, así como dilatación de vasos sanguíneos o pequeñas hemorragias. Los cambios histopatológicos muestran que a los 30 minutos de la inyección es notoria la presencia de neutrófilos en vasos sanguíneos, las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos se dilatan notablemente, pocos vasos linfáticos se ven con trombosis. La naturaleza de las inyecciones intradérmicas y subcutáneas de la toxina sugieren que la acción primaria de ésta es sobre los vasos sanguíneos. Las dosis altas de toxina pueden causar espasmo arteriolar similar al que provocan concentraciones altas de histamina. A dosis bajas ambas sustancias causan aún mayor incremento en la permeabilidad vascular. A dosis más concentradas el daño vascular resulta en trombosis. Así como los efectos directos de la toxina, los factores endógenos de permeabilidad liberados por los tejidos o leucocitos son capaces de estimular un segundo cambio en la permeabilidad de los vasos involucrados. Comparada con la piel la córnea es marcadamente resistente a la acción de la toxina, el efecto inocuo de la toxina en el tejido avascular apoya la hipótesis que la respuesta inflamatoria aguda a la inyección intradérmica de la toxina es iniciada por éste efecto en la capa vascular, no

obstante un efecto citotóxico o quimiotáctico puede o no estar presente (Jolly, 1965 A; Remshaw, 1979).

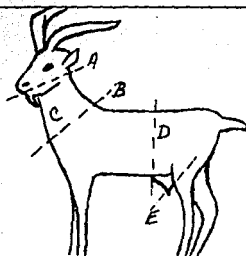
Se reporta que la propagación de la enfermedad a partir de las heridas cutáneas infectadas da origen a la inflamación de los ganglios linfáticos regionales y a la formación de abscesos que son producidos por el transporte y migración del microorganismo por vía hematogena. Estos ganglios linfáticos se dilatan con abscesos que contienen pus caseosa, verdoso y sin olor, éste pus se convierte en una masa firme bastante seca, que se presenta generalmente en capas concéntricas dentro de una cápsula fibrosa. En ovejas los ganglios linfáticos preescapulares son los ganglios periféricos más frecuentemente afectados, cuando la enfermedad se generaliza se forman abscesos en muchos órganos incluyendo otros ganglios linfáticos, hígado, bazo, riñones, pulmón, cerebro y médula espinal (Hagan y Brunner, 1983; Blood y Henderson, 1985).

En un estudio realizado en ovejas afectadas con Linfadenitis Caseosa se observó que los ganglios linfáticos más afectados fueron en porcentaje los siguientes:

Cuadro N° 2

GANGLIOS LINFATICOS MAS AFECTADOS EN UN ESTUDIO EN OVEJAS

| GANGLIOS AFECTADOS | % |
|--------------------|-----|
| A) Submaxilares | 30 |
| B) Preescapulares | 30 |
| C) Parotídeos | 25 |
| D) Precurrales | 10 |
| E) Retromamarios | 5 |
| | 100 |



(Alarcón, 1984).

Las características clínico patológicas de la Linfadenitis Caseosa no son específicas y son reflejo de una infección crónica. Se ha reportado leucocitosis con mantenimiento normal de linfocitos y neutrófilos. La anemia presente en la enfermedad y la hipoproteïnemia se traduce en la reducción del apetito con la subsecuente malnutrición en animales afectados. Hay presencia de abscesos con localizaciones variadas que suelen romperse expulsando pus verde espesa. Con cierta frecuencia puede presentarse artritis y onfalitis agudas (Hiepe,1974; Runells,1976; Jensen,1982).

A la necropsia la mayoría de las lesiones se localizan sobre la canal donde encontramos un gran número de ganglios linfáticos afectados con exudado purulento y diferentes capas de tejido necrosado (Brandly,1971; Jubb y Kennedy,1985).

Las ovejas adultas a menudo tienen un valor económico limitado a la necropsia. Estudios disponibles indican que Linfadenitis Caseosa es un problema significativo en ovejas seleccionadas, ya que la enfermedad puede ser responsable de la disminución en la fertilidad y eficiencia reproductiva, la cual puede ser medida en base a kilogramos de cordero destetado por hembra de crianza (Ashfaq,1979; Brogden,1984 A).

En corderos se llevó a cabo un experimento el cual consistió en infección artificial con Corynebacterium ovis . Estos fueron inoculados por vía intravenosa con 3.2×10^3 CFU (Unidades Formadoras de Colonias) a 3.2×10^6 CFU de C. ovis. Después de 28 días los abscesos se multiplicaron y fueron observados en pulmón y ganglios linfáticos. El número de abscesos en el pulmón se relaciona con la dosis de inoculación. Dos corderos murieron con una dosis de 10^5 Y 10^6 CFU Múltiples abscesos se formaron en otro cordero dando una dosis de 10^3 CFU. (Brogden,1984 A).

La inyección intravenosa de los cultivos en caldo de C. ovis en borregos resulta en una toxemia o una completa recuperación para la enfermedad. Once corderos de 5 semanas de edad, desprovistos de calostro y alojados en un corral separado fueron inoculados en la vena yugular izquierda y observados diariamente durante 28 días, fueron sacrificados posteriormente con pentobarbital observándose a la necropsia múltiples abscesos en pulmón, los inoculados con mayores dosis presentaron una marcada toxemia (Brogden, 1984 A).

Histológicamente los abscesos consisten de una masa de restos celulares necróticos, rodeada de una pared de tejido conjuntivo fibroso (Ashfaq, 1979).

Tanto en corderos, como en borregos adultos los casos generalizados de la enfermedad son menos frecuentes pero cuando se presentan, los abscesos están distribuidos en hígado, riñón y bazo. Cuando llega a afectar los ganglios linfáticos supramamarios puede observarse mastitis aguda, difusa y supurativa; en mastitis crónica se localizan abscesos encapsulados. La caída consecutiva en la producción de leche origina desnutrición, crecimiento inadecuado e incluso muerte de crías (Mc Allister, 1971; Jensen, 1982).

Recientemente se ha descrito que C. ovis produce lesiones escrotales palpables en carneros, las cuales pueden ser confundidas con infecciones que causan epididimitis o algunas otras condiciones que afectan la fertilidad (Ashfaq, 1980).

Algunas lesiones encontradas en borregos Merinos adultos que fueron unoculados con C. ovis por vía intralinfática son las siguientes: edema sanguíneo e inflamación de tejido subcutáneo alrededor del punto de inoculación, los ganglios poplíteos desafiados se alargaron en compa

ración con los normales, después de la incisión se encontraron edematosos y hemorrágicos. Los cadáveres se encontraban extremadamente ictéricos, los hígados y bazo se alargaron y los riñones se ennegrecieron. La ictericia no fue observada en ningún borrego sacrificado tres semanas después de la infección, encontrándose fibrosis difusa del tejido subcutáneo en un área equivalente a la zona de inflamación sanguínea observada en ovejas que murieron de crisis hemolítica. El examen histológico de los ganglios linfáticos afectados sugiere que la exotoxina está involucrada en el establecimiento, desarrollo progresivo y persistencia de las lesiones de Linfadenitis Caseosa a través de citotoxicidad localizada (Burrell, 1978).

En otro experimento utilizando preparaciones de exotoxina bajo administración parenteral se indujo una anemia hemolítica fatal en pequeños rumiantes neonatos gnotobióticos ocasionando la muerte en 48 horas. Las evidencias histopatológicas indican que la exotoxina causa cambios necróticos en los túbulos contorneados proximales de los riñones, ganglios linfáticos hemorrágicos y hemorragias equimóticas en el abomaso e intestino delgado, las membranas de los intestinos se encuentran congestionadas. La inoculación en organismos vivos causa múltiples focos de inflamación supurativa en músculo esquelético y tejido adiposo y cambios histológicos después de la inyección intradérmica de la toxina (Hsu, 1985).

Se realizó un estudio sobre eventos inmunológicos en el ganglio linfático poplíteo de borregos adultos aplicando una inyección de C. ovis vivo o muerto en el vaso linfático eferente poplíteo. Se recolectó linfa eferente poplíteo y sangre de borregos diariamente durante 3 semanas después de la inyección del microorganismo. La producción

total de linfocitos, la proporción de linfoblastos y clase de especificidad de inmunoglobulinas fueron determinadas en linfa de dos grupos de animales así como títulos de anticuerpos y concentraciones de IgG₁, IgG₂, IgM e Ig A las cuales fueron medidas en linfa y suero sanguíneo. Dentro de la patología de éste experimento se observó que 3 días después de la infección, en los ganglios obtenidos de un borrego se presentó hipertrofia, congestión, inflamación y desarrollo de abscesos notorios con un contenido de pus verde amarillenta. Estos cambios impiden la recirculación de linfocitos T, por lo que es probable que la inmunidad a Corynebacterium ovis sea un fenómeno de inmunidad celular, ésta obstrucción en la recirculación evita la interacción con macrófagos impidiendo el combate de la infección (Hard,1970; Husband,1977).

Se han empleado varias pruebas serológicas para el diagnóstico de ésta enfermedad, dentro de las que se incluyen: aglutinación bacteriana, neutralización de toxina en el ratón y en conejo, y una prueba de inhibición de antihemolisina. Esta hemólisis puede ser inhibida por la exotoxina de C. ovis y ésta inhibición de la hemolisina a su vez puede ser bloqueada por anticuerpos contra la exotoxina, proporcionando una manera específica de identificar éstos anticuerpos (Arve Lund,1982 A ; Hagan y Bruner,1983).

Abdel Hamid (1975) reporta una prueba de protección desarrollada en ratón llamada "MP" (Mouse Protection) que fué encontrada de valor para la detección de Linfadenitis Caseosa especialmente cuando no se observan lesiones externas.

Se han realizado estudios de la actividad hemolítica y hemoaglutinante de la exotoxina de Corynebacterium ovis con el desarrollo de 4 tipos de pruebas diagnósticas llamadas: Prueba de Inhibición de la hemólisis, Prueba de inhibición de la hemoaglutinación, Prueba de inhibición de la hemólisis en gel. Una prueba de inmunodifusión radial simple y una prueba de inmunodifusión doble han sido también adaptadas para detección de antitoxinas (Burrell,1980 A).

Se ha descrito el uso de fracciones purificadas de sobrenadante de cultivo de C. ovis para obtener líneas de precipitación en gel de complejos formados entre la exotoxina y antitoxina específica de antisero de conejo. Los resultados indican que el sobrenadante con un título hemolítico o un título de dermonecrosis en conejo de 1: 16,384 se requiere para producir fácilmente líneas de precipitación detectables con la antitoxina específica a concentraciones entre el rango comunmente encontrado en sueros de casos con infecciones naturales de Corynebacterium ovis (Renshaw,1979; Burrell,1980 B).

El tratamiento individual en animales con abscesos periféricos por un lado, no es factible económicamente y por otro, los animales afectados sirven como reservorios para la difusión de la enfermedad entre el rebaño. En la afección de los ganglios linfáticos superficiales está indicado el tratamiento quirúrgico y antiséptico. Las ovejas con dificultades respiratorias intensas deben ser sacrificadas (Glimp,1970; Hiepe,1974).

El microorganismo es sensible a Penicilina y muchos otros antibióticos in vitro (cuadro N° 3). Sin embargo la terapia con Peni-

lina a fracasado en el tratamiento de animales afectados en el campo. Existen diversas razones posibles para explicar la ineficacia antibiótica in vivo. Primero, puede ser resultado del bajo nivel de difusión de Penicilina dentro del absceso en el nódulo linfático a causa de la cápsula fibrosa o a la presencia del espeso exudado caseoso. Segundo, algunos factores presentes en el exudado purulento pueden neutralizar el efecto bactericida del antibiótico. Finalmente, Corynebacterium ovis es una bacteria intracelular que reside en las células fagocíticas, dentro de éstas no puede tener contacto con cantidades sustanciales del antibiótico (Ashfaq, 1979).

Cuadro N° 3

RESULTADOS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS
REALIZADAS EN 71 AISLAMIENTOS DE C. ovis.

| ANTIBIOTICO | SENSIBILIDAD | INTERMEDIO | RESISTENCIA |
|----------------|--------------|------------|-------------|
| AMPICILINA | 71 | - | - |
| CLORANFENICOL | 71 | - | - |
| COLIMICINA | - | 5 | 66 |
| ERITROMICINA | 71 | - | - |
| GENTAMICINA | 71 | - | - |
| NEOMICINA | 61 | 5 | 5 |
| NITROFURANOS | - | - | 71 |
| PENICILINA | 71 | - | - |
| ESTREPTOMICINA | - | - | 71 |
| TETRACICLINA | 71 | - | - |

(Ashfaq, 1979).

El control de Linfadenitis Caseosa mediante la inmunoprofilaxis es paralelo al desarrollo de una vacuna eficaz. Un conocimiento incompleto sobre la respuesta inmune a C. ovis en ovinos impide éste esfuerzo. La respuesta inmune específica de tipo humoral a C. ovis puede ser obtenida en el laboratorio a partir de roedores y ovejas usando vacunas inactivadas. La respuesta de anticuerpos en ovejas Merino a la vacunación con C. ovis es pobre y la respuesta generalmente sólo da resultado por un período de 3 a 4 meses después de la administración constante de grandes dosis repetidas (Arve Lund, 1982 B; Ellis, 1983).

Se ha estudiado el efecto del Levamisole (compuesto utilizado como antihelmíntico) sobre la inmunidad a C. ovis en ratones y borregos. Irwing y Knight (1975) reportaron que el Levamisole suministrado con una inyección subletal de C. ovis aumentaba la resistencia de ratones al desafío con C. ovis, a pesar de los niveles bajos de seroglobulinas. En éste experimento se utilizó una vacuna adicionada con Levamisole y fue probada en ratones y borregos (Cameron, 1977).

II. OBJETIVOS

- 1) Realizar pruebas biológicas en animales de laboratorio inoculando filtrados de 10,000 daltons, 100,000 daltons, así como toxina cruda de C. ovis. Con el fin de determinar el efecto de los mismos a través de las siguientes pruebas:
 - a) Dermonecrosis en cuyes
 - b) Letalidad en ratón adulto
 - c) Letalidad en ratones lactantes.

Llevarse a cabo pruebas de histopatología en el caso de los ratones adultos.

III. MATERIAL Y METODOS.

I. MATERIAL

- 1) Cepa de C. ovis (origen Rastro de Ferrería).
- 2) Medios de Cultivo
 - a) Base para agar sangre
 - b) BHI (Infusión de Cerebro y Corazón) Difco Lab. 662071
 - c) HLA (Hidrolizado de Lactoalbúmina)_
- 3) Animales de Laboratorio
 - a) 25 cuyes variedad inglesa cepa albina (de 300-400 grs)
 - b) 28 ratones adultos albinos (25-30 grs.)
 - c) 20 ratones lactantes (1 semana de edad)
- 4) Implementos Científicos
 - a) Agitador orbital (NB-Scientific Co. USA)
 - b) Cámara de Liofilización (Labconco Freeze Drv-5 USA).
 - c) Centrifuga (Damon/IEC-DPR-600 USA)
 - d) Compresora de aire
 - e) Estufa bacteriológica (Scientific M-3151 USA)
 - f) Filtros (Millipore Corp, B-M USA).
 - g) Microscopio compuesto
 - h) Refrigerador (Ultra- Low Revco Freezer USA)
 - i) Sistema de microfiltración (Mic Systems-D Court USA)

2) METODOS

1) Proceso para la obtención de la toxina.

a) Crecimiento masivo.- Teniendo en cultivo puro la cepa de Corynebacterium ovis fué tomada una asada de colonias y se inocularon en 100 ml de caldo BHI (Infusión de Cerebro y Corazón) contenidos en un matraz de 250 ml, el cual fué incubado 48 horas a 37°C. La suspensión de los microorganismos desarrollados en el caldo, fué vertido en un matraz conteniendo 4 litros de medio de HLA (Hidrolizado de lactoalbúmina). A continuación el matraz fué colocado en un agitador orbital a 37°C durante 48 horas con agitación constante de 130 rpm. , para evitar la formación de una película de conglomerados bacterianos, ya que el microorganismo en medios artificiales es muy propenso a formar aglutinaciones o escamas suspendidas que se separan con dificultad. Posteriormente se realizaron frotis que fueron teñidos por la técnica de Gram para confirmar la presencia de la bacteria (Hsu,1985).

b) Filtración.- El cultivo en medio líquido fué tratado por centrifugación a 2500 rpm. durante 30 minutos y a continuación se procedió a separar el paquete celular y el líquido sobrenadante, éste último se sometió a una filtración continua a través del filtro Millipore (Membrana con poro de 0.22 μ m.). El líquido sobrenadante estéril constituyó el extracto crudo de la toxina. El paquete celular fué colectado y almacenado en congelación sin conservador.

c) Microfiltración .- Se tienen reportes que la exotoxina de C. ovis tiene un peso molecular de 31,000 daltons (Hsu,1985), por lo que fué necesario concentrar el sobrenadante filtrado, para ésto se empleó un sistema de microfiltración utilizando membranas de exclusión tipo F (Microf. Systems) que retienen pesos moleculares de

100,000 y 10,000 daltons, aplicándoles una presión positiva de 4 kg/cm^2 generada por una compresora de aire. Una parte del sobrenadante se pasó por la membrana de 100,000 daltons de peso molecular. Otra parte se pasó por la membrana de 10,000 daltons; obteniéndose volúmenes finales de 150 ml. Este proceso se llevó a cabo dializando durante 24 horas en un cuarto frío a 4°C .

d) Liofilización.- Finalizada la microfiltración se procedió a liofilizar, para conseguir concentrar más los solutos presentes en los 150 ml de los frascos con tapón de rosca que contenían las tres diferentes preparaciones.

El extracto crudo, filtrado de 100,000 y 10,000 fueron congelados a -70°C y los recipientes destapados fueron colocados en una cámara de liofilización, se le aplicó vacío a una temperatura aparente de -50°C durante 8 horas aproximadamente para deshidratar su contenido llevándolo cerca del secado, logrando así un medio más concentrado. Se sellaron los recipientes y fueron almacenados a -20°C y -70°C .

Las diferentes muestras requeridas para inoculación fueron extraídas de los recipientes previamente descongelados y con pipetas estériles.

2. Bioensayo.

a) Prueba de Dermonecrosis.

Técnica de De Jong (1980).- para realizar ésta prueba se emplearon 25 cuyes variedad inglesa con un peso promedio de 300 a 400 gr. éstos animales fueron obtenidos del bioterio de la ENEP Iztacala y se mantuvieron en observación durante 5 días antes de la inoculación. A éstos animales posteriormente se les cortó el pelo del costado derecho abarcando desde la región torácica hasta la región lumbar, se les rasuró y se lavó el área con agua y jabón aplicándose un antiséptico. Se realizaron una serie de divisiones en el costado de cada uno de los cuyes: fueron 9 divisiones que se identificaron con marcador color negro, se dividieron en grupos de 5 y se trabajaron de la siguiente manera: en cada uno de los cuyes rasurados se inoculó el sobrenadante o toxina cruda, filtrado de 10,000 y 100,000 daltons y un grupo control donde se aplicó solución salina fisiológica estéril. Para la inoculación se utilizaron jeringas insulínicas estériles con agujas de calibre 25 administrándose la dosis de 0.2 ml por vía intradérmica. (ver cuadro siguiente)

Cuadro N° 4

PRUEBA DE DERMONECROSIS

| GRUPO | N° ANIMALES | DOSIS | MARCA | VIA | INOCULACION |
|-------|--------------|----------------|----------------------|-----|---|
| I | 5 | 0.2 ml | S/m (control) | ID | SSF. Estéril |
| II | 5 | 0.2 ml | cabeza | ID | Filtrado de 10,000 y 100,000 daltons y toxina cruda. |
| III | 5 | 0.2 ml | lateral izquierda | ID | Filtrado de 100,000 daltons |
| IV | 5 | 0.2 ml | lateral d. | ID | Filtrado de 10,000 |
| V | 5 | 0.2 ml | lomo | ID | Toxina cruda |
| ID. | INTRADERMICA | S/M. SIN MARCA | | | |

Se mantuvieron en observación los cuyes inoculados durante 7 días anotando los cambios que fueron mostrando las zonas inoculadas. Una reacción positiva se observará como un halo de induración y necrosis de aproximadamente 1 cm en un lapso de 72 horas.

b) Prueba de Letalidad.- Para ésta prueba se utilizaron 28 ratones albinos adultos con un peso promedio de 25 a 30 gr , éstos animales procedían del bioterio de la ENEP Iztacala, observándose durante cinco días antes de proceder a trabajar con ellos. Estos fueron identificados coloreándose con las siguientes marcas: cabeza, lomo, cola y sin marca. Siendo inoculados con jeringas insulínicas estériles con agujas de calibre 25 y administrándose 0.2 ml de toxina cruda, filtrado de 10,000 y 100,000 daltons además solución salina fisiológica estéril, todo esto por vía intraperitoneal.

Cuadro N° 5

PRUEBA DE LETALIDAD

| GRUPO | Nº ANIMALES | DOSIS | MARCA | VIA | INOCULACION |
|-------|-------------|--------|--------|-----|-----------------------------|
| I | 7 | 0.2 ml | cabeza | IP | toxina cruda |
| II | 7 | 0.2 ml | lomo | IP | filtrado de 100,000 daltons |
| III | 7 | 0.2 ml | cola | IP | filtrado de 10,000 daltons |
| IV | 7 | 0.2 ml | s/m | IP | SS Fisiológica |

IP. Intraperitoneal
s/m . Sin marca

Una vez realizada la inoculación los animales fueron observados durante 7 días anotando los cambios y respuestas que podrían presentarse.

c) Inoculación a ratones lactantes.- Se adquirieron 4 hembras gestantes de la misma edad y fecha próxima al parto (con un rango de diferencia de 1 a 2 días) del bioterio de la ENEP Iztacala, se colocaron cada una de las hembras en su jaula esperando el parto respectivamente, recién paridas permanecieron en observación y se tomaron 5 crías de cada una de las hembras, los lactantes fueron identificados con las siguientes marcas:

Cuadro N° 6

| GRUPO | Nº ANIMALES | DOSIS | MARCA | VIA | INOCULACION |
|-------|-------------|--------|--------|-----|---------------------|
| I | 5 | 0.2 ml | cabeza | IC | toxina cruda |
| II | 5 | 0.2 ml | lomo | IC | Filtrado de 100,000 |
| III | 5 | 0.2 ml | cola | IC | Filtrado de 10,000 |
| IV | 5 | 0.2 ml | s/m | IC | SSF. Estéril |

IC. Intracerebral

s/m . Sin marca

A cada uno de los ratones lactantes se les aplicó un antiséptico antes de ser inoculados, procediendo de la misma forma que en las pruebas anteriores. Los animales fueron colocados con sus nodrizas una vez inoculados y se observaron durante 7 días de igual manera que los ratones adultos y los cuyes, observando cualquier tipo de cambio.

Una vez inoculados todos los grupos de cuyes y ratones, previamente identificados, se procedía a realizarles la necropsia al igual que los animales que morían antes del tiempo esperado (7 días) y se observaban las lesiones macroscópicas, se tomaban muestras de bazo, riñón y ganglios linfáticos para estudio de histopatología, utilizando

la tinción de H.E (Hematoxilina- Eosina).

Los animales que cubrían el lapso señalado de observación eran sacrificados con éter y se realizaba el mismo procedimiento de necropsia y recolección de muestras necesarias fijandose éstas en formol al 10%.

IV. R E S U L T A D O S

En los resultados obtenidos en la Prueba de Dermonecrosis en cuyes (Cuadro N° 7) se observó que al inocular los diferentes tipos de filtrado de la toxina , en las primeras 24 horas no hubo un cambio muy marcado; en el punto de inoculación sólo hubo eritema y cianosis en orejas. En el transcurso de las siguientes 48 y 72 horas se presentó induración del tejido de 1 cm . Siendo que en el grupo control sólo hubo eritema en las primeras 24 horas para desaparecer posteriormente. Los 25 cuyes fueron sacrificados ya que no hubo ninguna otra reacción después de las 72 horas. (Ver cuadro N° 7)

En la prueba de Letalidad en ratones adultos vía intraperitoneal, se observó que los ratones del grupo II al ser inoculados, en las primeras 24 horas se veían deprimidos, ojos cerrados, pelo hirsuto, falta de movimiento, para posteriormente recuperarse; en tanto que los grupos I, III, IV no presentaron ningún cambio post- inoculación, se mantuvieron normales durante 7 días los cuatro grupos, sacrificandolos posteriormente en su totalidad y realizandoles la necropsia, en ésta se encontraron lesiones macroscópicas como: ascitis e ictericia, ésta en el grupo II y aplicandoles toxina cruda ; los grupos restantes no mostraron ningún cambio macroscópico patológico aparente. El estudio histopatológico de ésta prueba nos muestra que los órganos recolectados riñón y bazo presentaron congestión, hipertrofia glomerular, infiltración leucocitaria, hemocitoblastosis; el ganglio linfático no mostró ningún cambio patológico aparente. (Cuadro N° 8).

En la inoculación intracerebral a ratones lactantes los resultados obtenidos se conformaron de la siguiente manera: En el grupo II el 80% de los ratones murieron con la aplicación de la toxina cruda. En el grupo III murió el 40 % (los ratones de los dos grupos murieron en un lapso de 24 horas), en el grupo IV, no hubo mortalidad (Cuadro N° 9).

CUADRO N° 7

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DERMONECROSIS DE LA INOCULACION
DE TOXINA DE C. ovis EN 25 CUYES.

| <u>GRUPO</u> | <u>MARCA</u> | <u>MUESTRA INOCULADA</u> | <u>CANTIDAD INOCULADA</u> | <u>24 HORAS</u> | <u>48 HORAS</u> | <u>72 HORAS</u> |
|--------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| I | S/M | S S F | 0.2 ML | ERITEMA | - o - | - o - |
| II | CABEZA | TOXINA CRUDA | 0.2 ML | ERITEMA | INDURACION | INDURACION |
| | | FILTRADO 10,000 DALTONS | 0.2 ML | CIANOSIS EN | NECROSIS | NECROSIS |
| | | FILTRADO 100,000 DALTONS | 0.2 ML | OREJAS | | |
| III | LATERAL IZQUIERDO | FILTRADO 100,000 DALTONS | 0.2 ML | ERITEMA CIANOSIS EN OREJAS | INDURACION | INDURACION |
| IV | LATERAL DERECHO | FILTRADO 10,000 DALTONS | 0.2 ML | ERITEMA CIANOSIS EN OREJAS | INDURACION | INDURACION |
| V | LOMO | TOXINA CRUDA | 0.2 ML | ERITEMA CIANOSIS EN OREJAS | INDURACION | INDURACION |

S/M = Sin Marca

S S F = Solución Salina Fisiológica

CUADRO N° 8

RESULTADOS A LA PRUEBA DE LETALIDAD DE LA INOCULACION INTRAPERITONEAL
DE TOXINA DE C. ovis EN 28 RATONES ADULTOS.

| GRUPO | MUESTRA INOCULADA | VIA DE INOCULACION | CANTIDAD INOCULADA | LESIONES MACROSCOPICAS | LESIONES MICROSCOPICAS |
|-------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|--|
| I | S S F ESTERIL | IP | 0.2 ML | S C P A | S C P A |
| II | TOXINA CRUDA | IP | 0.2 ML | ASCITIS E ICTERICIA | RIÑON - CONGESTION - DILATAACION GLOMERULAR - INFILTRACION LEUCOCITARIA BAZO - CONGESTION - HEMOCITOBLASTOS (ERITROPOYESIS EXTRAMEDULAR) GANGLIO LINFATICO - S C P A |
| III | FILTRADO DE 100,000 DALTONS | IP | 0.2 ML | S C P A | RIÑON - CONGESTION BAZO - CONGESTION - HEMOCITOBLASTOS (ERITROPOYESIS EXTRAMEDULAR) GANGLIO LINFATICO - S C P A |
| IV | FILTRADO DE 10,000 DALTONS | IP | 0.2 ML | S C P A | RIÑON - S C P A BAZO - HEMOCITOBLASTOS - (ERITROPOYESIS EXTRAMEDULAR) GANGLIO LINFATICO - S C P A |

S S F = Solución Salina Fisiológica
I P = Intraperitoneal
S C P A = Sin Cambio Patológico Aparente

CUADRO N° 9

RESULTADOS DE LA INOCULACION DE TOXINA
DE C. ovís EN 20 RATONES LACTANTES.

| GRUPO | MUESTRA INOCULADA | VIA DE INOCULACION | CANTIDAD INOCULADA | SIGNOS CLINICOS |
|-------|------------------------------------|--------------------|--------------------|---|
| I | S S F | INTRACEREBRAL | 0.2 ML | SOBREVIVIERON TODOS, NO PRESENTARON CAMBIO |
| II | TOXINA CRUDA | INTRACEREBRAL | 0.2 ML | MURIERON 4 RATONES 1 RATON DE ESTE GRUPO SOBREVIVIO MANIFESTANDO DEPRESION, LA CUAL FINALMENTE DESAPARECIO. |
| III | TOXINA FILTRADA 100,000 DALTONS | INTRACEREBRAL | 0.2 ML | MURIERON 2 RATONES LOS 3 RATONES SOBREVIVIENTES MANIFESTARON DEPRESION DURANTE LAS 24 HORAS. POST- INOCULACION |
| IV | FILTRADO 10,000 DALTONS | INTRACEREBRAL | 0.2 ML | LOS 5 SOBREVIVIERON SOLO HUBO DEPRESION QUE DESAPARECIO GRADUALMENTE |

V. D I S C U S I O N

A la prueba de Dermonecrosis en éste estudio realizado en cuyes variedad inglesa, se pudo observar que a través de la inoculación intradérmica de los diferentes filtrados de toxina de C. ovis se obtuvo en un lapso de tiempo de 24, 48 y 72 horas respectivamente, zona de eritema, induración y necrosis tisular. Quedando como reacción positiva un halo de necrosis del tejido . De Jong (1980) realiza ésta misma prueba sólo que utilizando la toxina de Pasteurella multocida dando como resultado positivo la necrosis y un halo de induración en piel.

Jolly (1965 A) realizó una investigación sobre la acción patógena de la exotoxina de C. ovis inyectada por vía intradérmica en diferentes animales y se observó que puede ser letal o causar área local de inflamación y necrosis. La lesión causada por la lesión del fluido o toxina desaparece varias horas después y es acompañada de la acción inflamatoria. A las 24 horas las lesiones presentan necrosis en el área de inoculación, éste aspecto continúa hasta después de 48 horas.

En cuanto a la Prueba de Letalidad en ratón adulto inoculado por vía intraperitoneal, los ratones inmediatamente presentaron signos de depresión durante las primeras 24 horas, logrando una recuperación en todos los grupos posteriormente sin llegar a presentar abscesos corporales externos a la necropsia ; sólo la toxina cruda

provocó ascitis e ictericia, los demás filtrados no provocaron nada a nivel macroscópico. Muckle (1983) reporta que los ratones inoculados por vía intraperitoneal con CFU (Unidades Formadoras de Colonias) revelaron lesiones que consistieron en abscesos subcutáneos en el sitio de inoculación y una abscedación extensiva en órganos internos o una peritonitis fibrino purulenta. A éste respecto Jubb y Kennedy (1985), así como Burrell (1978) mencionan que la inyección por vía intravenosa en muchas especies incluyendo borregos en el caso de Burrell, causa hemoglobinuria e ictericia.

En el estudio microscópico de ésta investigación en la Prueba de Letalidad en ratones adultos, se observó que la toxina cruda a nivel de riñón fué la que causó más lesiones (congestión, dilatación glomerular, infiltración leucocitaria), no sucediendo así con los otros filtrados sobre bazo y ganglio linfático. Histológicamente en un estudio realizado por Lovell (1966) se observaron cambios degenerativos en los hepatocitos así como en las células epiteliales de los túbulos contorneados de los riñones. Asimismo Lovell reporta que la toxina de C. ovis, es fatal para cuyes y conejos y su efecto en ratones blancos es incierto. Algunos autores mencionan que el ratón es refractario a la toxina de C. ovis y una dosis de 5 ml no es efectiva en inyección subcutánea. Con esto podemos decir, que en el presente trabajo se obtuvieron resultados parciales en ésta prueba.

En la Prueba de Letalidad en ratones lactantes se pudo observar que a través de la inoculación intracerebral de 0.2 ml de la toxina en sus diferentes filtrados, la toxina cruda provocó la muerte (en el grupo II) del 80% de los ratones en las primeras 24 horas; no sucediendo así en el grupo III, en donde se inoculó el filtrado

de 100,000 daltons obteniéndose una mortalidad del 40%. En el grupo IV en donde se inoculó el filtrado de 10,000 daltons a la misma dosis, no se obtuvo ninguna muerte. Teniendo un grupo control al cual sólo se inoculó SSF. Nakai (1984) considera la muerte del ratón como una prueba positiva.

V I . C O N C L U S I O N E S

1) En la Prueba de Dermonecrosis aplicada en cuyes empleando las fracciones de la toxina a dosis de 0.2 ml por vía intradérmica se obtuvieron los resultados esperados como son el eritema y la inducción del tejido en el lapso de 24, 48 y 72 horas.

2) Para la Prueba de Letalidad en ratones adultos, la aplicación de toxina cruda, filtrado de 10,000 y 100,000 daltons a través de la vía intraperitoneal no resultó ser efectiva ya que no causó la muerte de los ratones.

3) En la Prueba Letal en ratón lactante el único filtrado efectivo fué el de la fracción cruda de la toxina.

4) De ésta forma podemos decir que las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas y la literatura referida pueden atribuirse a diversos factores como son: vía de inoculación, tipo de material inoculado (paquete celular y/o toxina), dosis de inoculación, concentración de la toxina, tipo de cepa, sinergismo entre bacteria y toxina y que por sí sólo ésta no es capaz de producir la enfermedad.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Abdel Hamid, Y. M. (1975). The Use of Mouse Protection Test in the Diagnosis of Caseous Lymphadenitis in Sheep. Res. Vet. Sci. 18 pp. 223-224.
- 2) Alarcón, S, B, F. (1984). Frecuencia de Linfadenitis Caseosa en Ovinos y Caprinos Sacrificados en el Rastro Municipal de Cd. Nezahualcoyotl, Edo. de Méx. Tesis Profesional, F.M.V.Z. U.N.A.M.
- 3) Arbiza, A. S. (1984) Estado Actual de la Ovinocultura en México. F.M.V.Z. U.N.A.M. Memorias.
- 4) Arve Lund and Torstein, S. (1982 A). Antibodies to Corynebacterium pseudotuberculosis in Adult Goats from a Naturally Infected Herd. Acta Vet. Scand. 23, pp.473-482.
- 5) Arve Lund and Hans, J. (1982 B). Calostrual Transfer in the Goat of Antibodies Against Corynebacterium pseudotuberculosis and the Antibody Status of Kids during the First 10 Months of Life. Acta Vet. Scand. 23, pp.483-489.
- 6) Ashfaq, M. K. and Campbell, S. G. (1979). A Survey of Caseous Lymphadenitis and its Etiology in Goats in the United States. Agr. Pract., Vet. Med/Sm Cl. 14853: pp. 1161-1165.
- 7) Ashfaq, M. K. and D.V.M.; Campbell. (1980). Experimentally Induced Caseous Lymphadenitis in Goats. Am. J. Vet. Res. Vol. 41 No. 11 pp. 1789-1792.
- 8) Ayers, J. L. (1977). Caseous Lymphadenitis in Goats and Sheep a Review of Diagnosis Pathogenesis and Immunity. JAVMA 12: pp.1251-1254.
- 9) Blood, D. C. and Henderson, J. A. (1985). Linfadenitis Caseosa en Medicina Veterinaria. Editorial Interamericana 5ta. ed. pp. 439-440.

- ESTADO DE CONSERVACION
SALA DE LA BIBLIOTECA
- 10) Brandly, P. J. (1971). Linfadenitis Caseosa en Higiene de la Carne. Editorial Continental. pp. 126-128.
 - 11) Brogden, K. A. (1984 A). Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis Infection in Lambs. Am. J. Vet. Res. Vol. 45 No. 8 pp. 1532-1534.
 - 12) Brogden, K. A. (1984 B). Comparison of Protection Induced in Lambs by Corynebacterium pseudotuberculosis Whole Cell and Cell Wall Vaccines. Am. J. Vet. Res. Vol. 45 No. 11; pp. 2393-2395.
 - 13) Burrel, D. H. (1978). Experimental Induction of Caseous Lymphadenitis in Sheep by Intralymphatic Inoculation of Corynebacterium ovis. Res. Vet. Sci. 24; pp. 269-276.
 - 14) Burrel, D. H. (1980 A). In Vitro Direct Haemagglutination by Corynebacterium ovis Exotoxin. Res. Vet. Sci. 28; pp. 51-54.
 - 15) Burrel, D. H. (1980 B). A Haemolysis Inhibition Test for Detection of Antibody to Corynebacterium ovis Exotoxin. Res. Vet. Sci. 28; pp. 190-194.
 - 16) Burrel, D.H. (1981). Caseous Lymphadenitis in Goats. Australian Veterinary Journal Vol. 57; pp. 105-110.
 - 17) Cameron, C. M. and Buchan, L. (1966). Identification of the Protective and Toxic Antigens of Corynebacterium pseudotuberculosis. Onderstepoort, J. Vet. Res. 36; pp. 39-40.
 - 18) Cameron, C. M. and Smith, M. (1970). Relationship of Corynebacterium pseudotuberculosis Protoplasmic Toxins to the Endotoxin. Onderstepoort J. Vet. Res. 37; pp. 97-104.
 - 19) Cameron, C. M. (1977). Effect of Levamisole on Immunity to Corynebacterium pseudotuberculosis in Mice and Sheep. Veterinary Research Institute, Onderstepoort. 44 (1); pp. 47-48.

- 20) Carne, H. R. and Kater, J. C. (1956). A Toxic lipid from the Surface of Corynebacterium ovis. Nature Lond. 178; pp. 701-702.
- 21) Carne, H. R. and Onon, E. O. (1978). Action of Corynebacterium ovis on Endothelial Cells of Blood Vessels Nature 271; pp.246-248.
- 22) Carter, G. R. (1985). Corynebacterium ovis en: Bacteriología y Micología Veterinaria. Edit. El Manual Moderno. 2da. Edición: pp.127-130.
- 23) Casas, P. (1973) Linfadenitis Caseosa en: La importancia de la Dvinocultura en México. F.M.V.Z. U.N.A.M.
- 24) Corrie, C. Brown (1985). Serologic response and lesions in Goats' experimentally infected with Corynebacterium pseudotuberculosis of Caprine and Equine origins. Australian Veterinary Journal of Experimental Biology and Medical Science. Vol. 46 No. 11; pp. 2322-2326.
- 25) Corrie, C. Brown (1986). Use of a Toxoid vaccine to Protect Goats against Intradermal Challenge exposure to Corynebacterium pseudotuberculosis. Am. J. Vet. Res. Vol. 47: No. 5; pp. 1116-1119.
- 26) De Jong, M. F. (1980). Pathogenicity Test for Pasteurella multocida Isolates. Proc. Int. Píg. Vet. Sec. Cong. Copenhagen. pp. 211.
- 27) Doty, R. B. (1964). A Comparison of Toxins Produced by Various Isolates of Corynebacterium pseudotuberculosis and the Developmet of a Diagnostic Test for Caseous Lymphadenitis in Sheep and Goats. Am. J. Vet. Res. 25; pp. 1679.
- 28) Ellis, J. A. (1983). Ovine Caseous Lymphadenitis. Cont. Edu. Art. 10: 5 pp. 504-510.
- 29) Frappe, M. R. (1981). Linfadenitis Caseosa en: Manual de Infectología Veterinaria. Enfermedades Bacterianas y Micóticas. Edit. Francisco Méndez Oteo. Méx. D. F. pp. 65-67.
- 30) Glimp, A. H. (1970). Caseous Lymphadenitis in the Sheepman'S Production Handbook; Edition, pp. 104-105.

- 31) Goel, M. C. and Singh, I. P. (1972). Purification and Characterization of Corynebacterium ovis Exotoxin. J. Comp. Pathol. 82: pp. 345-353.
- 32) Hagan y Bruner (1983). Linfadenitis Caseosa en: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. Edit. Científica. La Prensa Médica Mexicana. 4ta. Edición: pp. 213-215.
- 33) Hard, G. C. (1970). Adoptive Transfer of Immunity in Experimental Corynebacterium ovis Infection. J. Comp. Pathol. 80: pp 329-334.
- 34) Hiepe, T.H. (1974). Linfadenitis Caseosa en: Enfermedades de la Oveja. Edit. Acribia: pp. 160-162.
- 35) Hsu, T. Y. (1985). Corynebacterium pseudotuberculosis Exotoxin. Fatal Hemolytic Anemia Induced in Gnotobiotic Neonatal Small Ruminants by Parenteral Administration of Preparations Containing Exotoxin. Am. J. Vet. Res. 46: pp. 1206-1211.
- 36) Husband, A. J. and Watson, D. L. (1977). Immunological Events in the Popliteal Lymph Node of Sheep Following Injection of Live or Killed Corynebacterium ovis into an Afferent Popliteal Lymphatic Duct. Res. Vet. Sci.; pp. 105-112.
- 37) Irwin, M. and Knight, H. D. (1975). Enhanced resistance to Corynebacterium pseudotuberculosis infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in Levamisole treated mice. Infection and Immunity 12: pp. 1098- 1103.
- 38) Jensen, R. (1982). Caseous Lymphadenitis in: Diseases of Sheep. 2da. Edition, Edit. Lea and Febiger, Philadelphia U.S.A. pp. 313-315.
- 39) Jolly, R. D. (1965 A). The Pathogenic action of the Exotoxin of Corynebacterium ovis. J. Comp. Pathol. 75 pp. 417-431.
- 40) Jolly, R. D. (1965 B). Pathogenesis of Experimental Corynebacterium ovis infection in Mice. N. Z. Vet. J. 13: pp. 141-147.

- 41) Jolly, R. D. (1966). Some observations on Surface Lipids of virulent and attenuated strains of Corynebacterium ovis.
J. Appl. Bact. 29: pp. 189-196.
- 42) Jubb, K.V. F. and Kennedy, C. P. (1985). Caseous Lymphadenitis in: Pathology of Domestic Animals. 3ra. Edition. Vol.3
Academic Press. Florida U. S. A. pp. 201-203.
- 43) Lazo, M. R. (1976). Linfadenitis Caseosa en: Determinación de los tipos de Lana más usados en la industria textil de México y su proyección dentro de la producción nacional.
Tesis Profesional, F.M.V.Z. U.N.A.M.
- 44) Lezama, H. A. (1976). Linfadenitis Caseosa en Cría y Engorda de ganado ovino por un grupo de pequeños productores en Crédito de la Banca Privada y Apoyo del FIRA y FEGA en Xatatlco México,
Tesis Profesional, F.M.V.Z. U.N.A.M.
- 45) Libro de Registro de Matanza y Decomiso en el Rastro de Ferrería 1987.
- 46) Lovell, R. and Zaki, M. M. (1966). Studies on Growth Products of Corynebacterium ovis. Res. Vet. Sci. 7 pp. 302-306.
- 47) Mc Allister, H. A., Keahey, K. K. (1971). Infection of a Hedgehog by Corynebacterium pseudotuberculosis. Vet.Rec. 89: (10) pp. 280.
- 48) Muckle, C. A. (1983). Relation of Lipid, Content and Exotoxin production to Virulence of Corynebacterium pseudotuberculosis in Mice,
Am. J. Vet. Res. 44: pp. 1149-1153.
- 49) Nairn, M. E. (1974). Corynebacterium pseudotuberculosis. Infection of sheep: Role of skin lesions and dipping fluids.
Australian Veterinary Journal Vol. 50 pp. 535-542.
- 50) Nakai, T Sawata, A. and Kume, K. (1984). Characterization of Dermonecrotic Toxin Produced by Serotype D. strains of Pasteurella multocida.
Am. J. Vet. Res. 45: pp. 2410-2413.
- 51) Nelson, A. Marquez (1970). Estudio Clínico de la Linfadenitis Caseosa en Caprinos de Venezuela Criollos e Importados. Rev. Med. Vet. y Parasit. Vol. XXI11 No. 18 pp. 245-284.

- 52) Pérez, I. A. (1979). Linfadenitis Caseosa en: Situación Actual de la Ovinocultura en México. Memorias F.M.V.Z. U.N.A.M.
- 53) Renshaw, H.W. Graft, V. P. (1979). Visceral Caseous Lymphadenitis in the thin ewe syndrome isolation of Corynebacterium, Staphylococcus and Moraxella spp. from internal abscesses in emaciated ewes. Am. J. Vet. Res. 40 pp. 1110-1114.
- 54) Rodríguez, M. R. (1969). Linfadenitis Caseosa en: Contribución al estudio de las enfermedades de la especie caprina en México. Tesis Profesional F.M.V.Z. U.N.A.M. Memorias.
- 55) Runells, R. A. (1976). Linfadenitis Caseosa en: Principios de Patología Veterinaria. Edit. C.E.C.S.A.; pp. 427-428.
- 56) Shigidi, M. T. A. (1978). An Indirect Haemagglutination test for the sero-diagnosis of Corynebacterium ovis infection in sheep. Research in Veterinary Science, 24 pp. 57-60.
- 57) Williams, C. S. F. (1980). Differential Diagnosis of Caseous Lymphadenitis in the Goat. Agri. Pract. Vet. Med./SM. 48824; pp. 1165-1170.
- 58) Zaki, M. M. (1976). Relation between The Toxogenicity and Pyogenicity of Corynebacterium ovis in Experimentally Infected Mice. Research in Veterinary Science 20; pp. 197-200.