



67  
Del

# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



" EVALUACION DE UNA BACTERINA DE CORYNEBACTERIUM  
PSEUDOTUBERCULOSIS EN CUYOS "

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

Abel Morales Estrada

Directora de Tesis: M.V.Z. Susana E. García Vázquez  
Asesor de Tesis: M.V.Z. Silvano Trejo Núñez

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1991.



## **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.

## INDICE

|                        |    |
|------------------------|----|
| RESUMEN.....           | 1  |
| INTRODUCCION.....      | 3  |
| OBJETIVOS.....         | 16 |
| MATERIAL Y METODO..... | 17 |
| RESULTADOS.....        | 24 |
| DISCUSION.....         | 28 |
| CONCLUSIONES.....      | 31 |
| LITERATURA CITADA..... | 32 |

## RESUMEN

Se inocularon cuyes blancos (*Cavia porcellus*) tipo Hartley con una bacterina experimental de *Corynebacterium pseudotuberculosis* adsorbida en gel de hidróxido de aluminio ajustada a  $3 \times 10^9$  bacterias/ml y una parte diluida 1:10 con el objeto de conocer su capacidad inmunogénica.

Los cuyes se dividieron en tres grupos. Al grupo A se le inoculó la bacterina sin diluir; al grupo B se le inoculó la diluida 1:10 y al grupo C se le administró agua destilada y se consideró como grupo testigo. Todos los animales recibieron 1.0 ml por vía subcutánea (SC) al día 0 y al día 21 post-inoculación (PI) se repitió el procedimiento. La bacterina se evaluó mediante una prueba de intradermorreacción (IDR) y pruebas serológicas de aglutinación lenta en tubo (ALT) e inhibición de la hemólisis (IHL). Las pruebas de IDR se llevaron a cabo con toxina cruda (TC) y con un antígeno de células completas (ACC) los cuales se inocularon por vía intradérmica a los 34 días PI; al día 37 PI se hizo la lectura de las reacciones inflamatorias ( $p < .05$  para la inflamación contra TC y  $p < .05$  contra ACC) y al día 42 PI los cuyes fueron sangrados a blanco. Los animales del grupo A no presentaron dermonecrosis ni tuvieron casos de morbilidad ni de mortalidad por efecto de la TC o del ACC. En los grupos B y C la TC provocó un área de dermonecrosis ( $p = .002$ ). En el grupo B esta dermonecrosis tuvo un promedio de 3.7 mm de diámetro y provocó un 10% de mortalidad. En el grupo C se observaron reacciones más severas con una mortalidad de 40%. El grupo A fue el que presentó mayores títulos de anticuerpos tanto en la prueba de ALT como en la de IHL.

En México hay pocos reportes de investigación acerca de Linfadenitis Caseosa y se puede decir que la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán es pionera en nuestro país en esta línea de investigación. Este trabajo pretende continuar con -

estos estudios acerca de esta enfermedad y su agente causal y contribuir en el desarrollo de tecnología propia en este terreno de la investigación científica.

## INTRODUCCION

Bajo las condiciones en que se explotan las especies ovina y caprina de nuestro país, éstas son altamente propensas a adquirir diversas enfermedades parasitarias y bacterianas lo cual conduce a pérdidas económicas por el bajo rendimiento de los animales en más del 50 % sobre el esperado (Tórtora, 1989; Williams, 1984).

La Linfadenitis Caseosa es una enfermedad infecciosa caracterizada por una inflamación necrótica supurativa de uno o más ganglios linfáticos causada por Corynebacterium pseudotuberculosis y fué la principal bacteria aislada a partir de decomisos de carne de borrego y cabra en un 46 % en el rastro de Ferrería (García, 1980). Esta bacteria también es conocida como Corynebacterium ovis aunque el nombre correcto es el primero e incluso algunos autores consideran que se subdivide en dos variedades: C. ovis y C. equi (Brown & Olander, 1987; Egen et.al., 1989; Favier et.al., 1990).

Esta enfermedad se presenta en forma de abscesos superficiales o viscerales y es la principal enfermedad de los ovinos y caprinos que presenta un cuadro piogénico aunque hay otras infecciones que producen abscesos viscerales causados por C. pyogenes, Staphylococcus epidermidis, S. aureus, Pseudomonas aeruginosa y algunas más por los géneros Mycobacterium y Moraxella. En un trabajo se encontró el 14 % de casos clínicos de los que se aislaron una o varias de las bacterias mencionadas y en el 86 % estaban asociadas con C. pseudotuberculosis (Mohan & Uzouku, 1980; Renshaw et.al., 1979; Williams, 1980).

C. pseudotuberculosis es una bacteria resistente y es capaz de sobrevivir en el ambiente durante varios años y solamente se ha podido recuperar del suelo, material y equipo contaminados en forma experimental (Augustune & Renshaw, 1986).

La enfermedad es enzoótica en los países donde se practica la cría ovina y caprina y es de curso crónico. Los animales generalmente no mueren pero si caen en un cuadro de emaciación. También afecta a los caballos, camellos, venados y mulas y rara vez a los bovinos y al hombre (Blood et.al., 1982, Brown et.al., 1986; Gillespie & Timoney, 1984).

C. pseudotuberculosis es un bastón gram positivo recto o ligeramente curvado, no forma esporas y no es móvil. Presenta gránulos metacromáticos que se tiñen irregularmente. Bajo el microscopio esta bacteria tiene una agrupación característica en forma de "empalizada" o de "letras chinas". La pared celular está constituida por un alto porcentaje de lípidos -- siendo el más importante el ácido corine-micólico además -- del ácido meso-diaminopimélico como ácido diamino del peptidoglicano y un polisacárido conformado en parte por arabinosa galactosa y algunas veces por manosa. Estos compuestos se encuentran también en la pared celular de los géneros Mycobacterium, Nocardia y Rhodococcus los cuales por compartir ciertas características entre sí se les llama grupo CMNR (Brown & Olander, 1987; Garg et.al., 1984a).

C. pseudotuberculosis es un microorganismo anaerobio facultativo que crece fácilmente en agar sangre a 37°C formando pequeñas colonias blanquecinas con apariencia de gotas de parafina a las 48 horas de incubación, rodeadas de una zona de beta-hemólisis. Bioquímicamente es catalasa positivo y fermenta fácilmente la glucosa, galactosa, maltosa y manosa. Los biotipos aislados a partir de ovinos y caprinos no tienen la capacidad de reducir los nitratos a nitritos mientras que los obtenidos a partir de equinos sí lo hacen (Brown et.al., 1985; Favier et.al., 1990; Sutherland et.al., 1989).

La bacteria es altamente susceptible a la acción de la penicilina, ampicilina, cloramfenicol, lincomicina, gentamicina

na, sulfametoxazol-trimetropin entre otros antibióticos en condiciones "in vitro". Los dos factores de virulencia más importantes son su pared celular con alto contenido lipídico y su poderosa exotoxina que es una esfingomielinasa de naturaleza glicoprotéica mejor conocida como Fosfolipasa D (Ashfaq & Campbell, 1979, Brown & Olander, 1987; Ellis, 1983; Jolly, -- 1965; Lovell & Zaki, 1966).

En esta enfermedad generalmente son los ganglios linfáticos superficiales los que se ven afectados aunque la forma -- más severa de la enfermedad es la presentación visceral en la que hay formación de abscesos pulmonares, hepáticos y en ganglios mediastínicos y algunas veces en otros órganos como corazón, cerebro, epidídimo, etcétera (Adeyeke et. al., 1980; Ajai, et. al., 1980; Bandopathsay et. al., 1972; Hamir, 1981; Renshaw et. al. 1979; Stoops et. al. 1984; Williamson & Nairn, 1980).

Existen diferencias en la presentación de abscesos entre los ovinos y caprinos. En los primeros los abscesos se ven -- principalmente en los ganglios linfáticos preescapulares y p<sub>o</sub> plíteos mientras que en los segundos las lesiones se desarrollan en las proximidades de la cabeza generalmente. Una segunda diferencia es la apariencia morfológica de los abscesos: -- en los borregos se presentan en una forma característica semejante a una cebolla mientras que en las cabras el exudado -- es uniformemente pastoso debido tal vez a la diferencia de las enzimas hidrolíticas de los macrófagos de ambas especies --- (Ashfaq & Campbell, 1980; Ayers, 1977).

La enfermedad tiende a la cronicidad por lo que los animales bajan de peso y consecuentemente hay pérdidas económicas importantes para el productor debido al bajo rendimiento, menor al 45 % de los animales afectados (Nakamura et. al. 1981).



## PATOGENIA.

Los mecanismos de patogénesis no están claramente definidos pero sin duda la toxina, el lípido de superficie y un factor -- plogénico termoestable juegan un papel importante en estos meca nismos. La bacteria penetra a través de heridas provocadas por la trasquila, partos, peleas, lesiones por el equipo o instala ciones en mal estado, etcétera. Una vez dentro del organismo, - los macrófagos fagocitan a la bacteria, sin embargo debido a la pared lipídica las enzimas hidrolíticas son incapaces de destru ir al microorganismo y éste sobrevive y se reproduce dentro de los macrófagos. Es por la presencia de un factor citotóxico en la pared lipídica bacteriana que actúa directamente sobre las - membranas celulares de los macrófagos, especialmente en reticu lo endoplásmico rugoso, Aparato de Golgi y membrana nuclear pro duciéndose la muerte de los macrófagos. Durante el transcurso de estos eventos, la bacteria es transportada a los ganglios -- linfáticos y mediante el mecanismo ya descrito prolifera tanto que llega a formar abscesos. La acción de la exotoxina es la de aumentar la permeabilidad vascular por la destrucción de endote lios facilitando de esta forma la migración de la bacteria a -- otros lugares produciéndose así nuevos abscesos en otros gan -- glios linfáticos o en vísceras. El mecanismo de acción de la -- exotoxina se lleva a cabo en la esfingomielina de las membranas celulares desdoblando ésta en fosfoceramida y colina, de esta manera los endotelios pierden su integridad y la migración de la bacteria se facilita. Se ha visto que animales con antitoxi na a los cuales se les inocula bacteria viva, los abscesos apa recen en el sitio de inoculación y no se detecta migración a - otros sitios (Brogden et. al., 1984a; Burrel, 1978; Hsu et. al. 1985; Jolly, 1965; Muckle & Giles, 1983; Pepin et. al., 1988; - Sutherland et. al., 1987). A medida que pasa el tiempo, la pro babilidad de formación de nuevos abscesos aumenta (Brown & --- Olander, 1987).

Los principales compuestos que estimulan la respuesta in- mune contra esta bacteria se encuentran principalmente en la --

pared celular. La presencia de estos compuestos en la pared de los géneros incluidos en el grupo CMNR puede ser la explicación de porqué al realizar las pruebas de Johnina o al tuberculinizar se obtienen resultados falsos positivos (Garg et.al., 1984; Pepin et.al., 1987).

La fosfolipasa D es muy similar a la toxina encontrada en la araña reclusa Loxosceles reclusa. Debido a su naturaleza glicoprotéica, resulta ser altamente antigénica y se encuentra en el citoplasma y sobre la pared celular de la bacteria. Es estable en el medio líquido pero puede ser inactivada por el calor, almacenamiento prolongado o por la adición de formalina o bien a un pH menor a 5.0. Estas propiedades pueden ser aprovechadas para la elaboración de un toxoide (Cameron & Buchan, 1966; Cameron & Smit, 1970; Gómez y Alcalá, 1988; Navarrete, 1988).

En diversos trabajos se ha intentado la inmunización con citoplasma y con pared celular fraccionada y se ha visto que la producción de anticuerpos es mayor que en los casos en que se sensibiliza con células completas ya sean vivas o muertas (Brogden et.al., 1984b).

La protección contra la Linfadenitis Caseosa aún es discutida pues no se ha logrado entender completamente y hasta la fecha no se ha logrado establecer una inmunidad sólida que evite la formación de lesiones después de un desafío o contacto con el microorganismo. A pesar de que no se comprenden bien los mecanismos de defensa contra esta bacteria se sabe que en estos participan los macrófagos, los linfocitos B y probablemente los linfocitos T (Ayers, 1977; Brogden et. al., 1984b).

Los macrófagos se comportan como la primer barrera de defensa ante una infección por C. pseudotuberculosis junto con

los diferentes granulocitos. Se ha estudiado el comportamiento de los macrófagos en infecciones experimentales en ratones, conejos, cuyes, borregos y cabras y todos siguen un mismo patrón de respuesta. Al inicio de la infección los macrófagos son altamente susceptibles al efecto tóxico de la superficie lipídica de la bacteria, sin embargo después de algún tiempo aparece una nueva generación de macrófagos mostrando en su citoplasma un número mayor de lisosomas con enzimas hidrolíticas más potentes capaces de neutralizar a la bacteria. Solamente los macrófagos de ratón siguen siendo susceptibles aún cuando estos elaboran también más lisosomas.

Estos estudios se han hecho bajo microscopía electrónica siguiendo la secuencia de sucesos entre los lisosomas y los fagosomas tanto en animales susceptibles como en animales vacunados. Del mismo modo se han detectado polimorfonucleares aunque no se menciona en ninguno de estos estudios cual es el papel que desempeñan en el control de la enfermedad (Ellis, 1988; Hard, 1975; Husband & Watson, 1977; Tashjian & Campbell, 1983).

La mayoría de los trabajos de investigación están encaminados a detectar la producción de anticuerpos contra la pared celular, contra la exotoxina y el papel que tienen en la protección contra Linfadenitis Caseosa. Se sabe que el nivel de gammaglobulinas aumenta en cabras que padecen la enfermedad y que el de otras proteínas séricas disminuye (Desiderio et al., 1979). A través de diversos estudios se han detectado anticuerpos contra la pared celular y contra la exotoxina. Jolly en 1965 contrarrestó el efecto patógeno de la exotoxina de C. pseudotuberculosis mediante la utilización de antitoxina obtenida a partir de un caballo que había sido inoculado varias veces con dosis subletales de la toxina pero sin determinar que tipo de anticuerpos se encontraban en

esa antitoxina. Igualmente en otros trabajos se han detectado anticuerpos contra toxina, cuerpos celulares o contra antígeno preparado a partir de células sonicadas o sometidas a algún otro procedimiento para exponer determinantes antigénicos internos. Se sabe que los tipos de anticuerpos producidos son IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM e IgA (Cameron et.al., 1972; Husband & Watson, 1977; Jolly, 1965; Lund et.al., 1982a).

En cabritos se han detectado anticuerpos contra toxina - adquiridos por la ingestión de calostro y se observó como los títulos fueron cambiando a lo largo de los diez primeros meses de vida. Gracias a la ingestión de calostro los cabritos permanecen libres de la infección pero esta inmunidad pasiva dura menos de 2.5 meses. El 50% de los animales muestran títulos de anticuerpos a los 7 meses de edad y a los diez, más del 90% ya han tenido contacto con el antígeno (Lund et.al., 1982b).

Al observar las células infiltradas en los abscesos de pulmones afectados con Linfadenitis Caseosa además de linfocitos B y macrófagos, se encontraron células de tipo T<sub>4</sub> y T<sub>8</sub> lo cual sugiere que también hay participación de una inmunidad mediada por células. En el suero de cabras afectadas y comparándolo con el de cabras sanas se vió que el número de células T es mayor cuando el animal está enfermo (Ellis, 1988 ; Hard, 1970; Hedden et.al., 1986).

Se ha experimentado con diferentes tipos de bacterina y toxoide para estimular la respuesta inmunológica y así mismo - proteger contra la Linfadenitis Caseosa. Estas evaluaciones - se han hecho tanto en ovinos y caprinos como en animales de laboratorio. Cameron y colaboradores en 1972 midieron la respuesta de anticuerpos mediante pruebas de aglutinación después de inocular varias bacterinas de C. pseudotuberculosis combinadas con adyuvante oleoso de Claassen, adyuvante completo e

incompleto de Freund, gel de hidróxido de aluminio, aluminio potásico, gel de fosfato tricálcico, gel de fosfato de aluminio y tres adyuvantes comerciales: Alhidrogel, Alugel y Adyuvante Wellcome. Los mejores resultados los obtuvieron después de dos inyecciones subcutáneas de 5 ml de bacterina inactivada con 0.5 de formalina. Al incluir adyuvante a la bacterina no se vió aumento en la respuesta de anticuerpos pero al prolongar el intervalo de inoculación de dos o cuatro semanas a seis el nivel de anticuerpos aglutinantes se vió incrementado aunque se mantuvo no más allá de tres o cuatro meses. Al usar vacunas frescas se vió que eran altamente tóxicas probablemente debido a que la toxina contenida no fué suficientemente inactivada, en cambio las bacterinas preparadas con más tiempo mostraron ser muy seguras (Cameron et al., 1972).

Otro inmunógeno probado es a base de cuerpos celulares completos comparado con una vacuna de pared celular. A corderos que se les había privado de la ingestión de calostro se les vacunó con estos dos inmunógenos y se desafiaron posteriormente con bacterias vivas. Los títulos de anticuerpos aumentaron en ambos grupos experimentales con respecto a un grupo testigo que no fué inoculado. La protección contra la formación de abscesos fué evidente en los animales sensibilizados pues se encontró un número menor de lesiones en éstos que en los que no fueron vacunados. A su vez, los animales que recibieron pared celular presentaron menor cantidad de abscesos que a los que se les inoculó células completas (Brogden et al., 1984b).

Se ha detectado que el número de lesiones disminuye en medida que se incrementa el número de dosis aplicadas administrando 2 ml de bacterias por vía subcutánea con un intervalo de 4 semanas. Desafortunadamente todos los intentos de

protección mediante bacterinas no han mostrado desarrollar una inmunidad total y en todos los casos solamente se ha logrado disminuir el número de lesiones desarrolladas después de un desafío (Brogden et.al., 1984a; Cameron & Fuls, 1973; Cameron, 1975; Cameron & Bester, 1984; Lea Master et.al., 1987).

Otra opción para proteger contra esta enfermedad es el uso de toxoide combinado con adyuvante incompleto de Freund. En un intervalo de dos semanas se inocularon cabras con 1 ml de toxoide. Después de cada inoculación, estos animales desarrollaron un cuadro clínico de depresión y/o cojera y se presentaron algunos casos de fiebre o diarrea. Estos signos desaparecieron pronto. Cuando se desafiaron, todos los animales presentaron un cuadro febril durante 24 a 48 horas y a las 4 semanas después se desarrollaron ulceraciones supurativas en el sitio de inoculación e inflamación de los ganglios linfáticos cercanos. Cinco de diez cabras vacunadas no presentaron lesiones típicas de Linfadenitis Caseosa; otras tres tenían un absceso en el sitio de inoculación y a las otras dos se les encontraron lesiones diseminadas mientras que en cuatro de cinco animales no sensibilizados se encontraron abscesos superficiales y viscerales y uno con lesiones en el sitio de inoculación (Brown et.al., 1986).

El uso de bacterinas inactivadas en formalina, vacunas vivas heterólogas o vacunas cultivadas en medios especiales tratadas con éter, etanol o sodio-lauril-sulfato no aumenta la respuesta de anticuerpos ya sean solas o combinadas entre sí. Tampoco se ha detectado algún efecto estimulante con el levamisol al menos en borregos. En ratones este efecto es marginal (Cameron & Fuls, 1973; Cameron, 1975).

El diagnóstico de la Linfadenitis Caseosa es posible -- realizarlo clínicamente mediante la observación directa de --

los abscesos en el animal vivo o en la canal; pero por las mismas características de la enfermedad se presenta una gran desventaja pues al momento en que se realiza este diagnóstico, el animal ya ha perdido peso por una parte y por otra es muy probable que haya contaminando el ambiente y --- transmitido la enfermedad a otros animales.

Se han desarrollado numerosas pruebas serológicas para el diagnóstico de la Linfadenitis Caseosa. La mayoría de estas pruebas miden la respuesta humoral contra la exotoxina, de las primeras pruebas que se han realizado están la de --- inhibición de la dermonecrosis, inhibición de la anti-beta-hemolisina estafilocócica , prueba de protección al ratón, - prueba de hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia y recientemente se han desarrollado nuevas técnicas como la de inhibición de la hemaglutinación, inhibición de la hemólisis sinérgica, inhibición de la hemólisis, ELISA e inmunodifusión doble y simple las cuales son más fáciles de realizar o son más confiables (Ajai et.al., 1980; Ayers, 1977; Brown & Olander, 1987; Garg & Chandiramani, 1984; Shigidi, 1978).

En Australia se estudió la efectividad de la prueba de inmunodifusión doble simplificada en donde se describe un método para la obtención de cantidades suficientes de exotoxina que permite el uso de un sobrenadante no concentrado con un suero para llevar a cabo esta prueba. El sobrenadante del cultivo de C. pseudotuberculosis con un título hemolítico o dermonecrótico en el conejo de 1:16 384 produjo líneas de -- precipitación con una antitoxina específica dentro de un rango de concentraciones comunmente encontradas en sueros de casos naturales de Linfadenitis Caseosa. Cuando se hizo esta prueba con fines de diagnóstico de casos de campo, los sueros de 32 animales confirmados positivos a la enfermedad dieron resultados igualmente positivos mientras que los sueros

ESTA TESTS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

de 16 ovinos libres fueron negativos. También los sueros de diez cabritos de un total de 16 que habían sido amamantados por madres provenientes de un hato afectado resultaron positivos (Burrel, 1980b).

Otra prueba que han evaluado es la de inhibición de la hemólisis. Cuando esta prueba se aplicó en sueros de ovinos que habían sido vacunados con células muertas de C. pseudotuberculosis y con exotoxina, la media del título aumentó de 2 a 37 mientras que los borregos vacunados únicamente con bacterias muertas el título medio permaneció 2. Esta prueba tuvo éxito al diagnosticar 24 de 30 borregos con Linfadenitis Caseosa. Los anticuerpos contra la exotoxina también fueron detectados en seis de siete corderos criados por borregas -- las cuales tenían títulos altos (Burrel, 1980a).

En Japón, país que se consideró libre de Linfadenitis Caseosa hasta hace poco tiempo, detectaron animales positivos utilizando la prueba de ELISA e incluso compararon los resultados de esta prueba con los de inmunodifusión. Los resultados positivos fueron 39.9% en la prueba de ELISA mientras -- que con la prueba de inmunodifusión los positivos fueron -- 27.8%. Aunque la prueba de inmunodifusión resultó menos sensible que la de ELISA para detectar anticuerpos contra C. pseudotuberculosis no dió ninguna reacción inespecífica. A partir de estos resultados y en vista de la simplicidad del procedimiento se determinó que la prueba de inmunodifusión -- resulta de gran valor diagnóstico (Chicamatsu et.al., 1989).

En Noruega también se ha comparado la prueba de ELISA con la de inhibición de la hemólisis. Al examinar 52 sueros de ovinos, 42 fueron positivos a esta prueba y 48 con la de ELISA. También concluyen que debido a la sencillez de la -- prueba de inhibición de la hemólisis, resulta más práctico utilizarla para fines de diagnóstico (Kuria & Holstad, 1989a; Kuria & Holstad, 1989b).



La prueba de hemaglutinación indirecta también ha sido ensayada. la prueba utiliza toxina de C. pseudotuberculosis purificada para sensibilizar eritrocitos de ovino tratados -- con bis-diazobenzidina. Los sueros con títulos de 1:16 o -- más se consideraron positivos. El exámen de los sueros de -- casos probados de Linfadenitis Caseosa mediante la prueba -- de inhibición de la hemaglutinación y con la prueba de inhi -- bición de la antihemolisina mostró que la primera es más -- sensible (Renshaw et.al., 1979).

En cuanto a la detección de anticuerpos contra la pa -- red celular se ha utilizado ampliamente la prueba de agluti -- nación en tubo en la que se muestra la capacidad de aglu -- tinación de los anticuerpos sobre las células bacterianas a las cuales se les ha dado un tratamiento previo con Tween - 60 o Tween 80 para evitar que autoaglutinen. Los títulos de 1:64 o más son considerados positivos; 1:32 como dudosos y menores a ese título se dan como negativos (Garg et.al., -- 1984; Lund et.al., 1982a).

Para la prevención de esta enfermedad es primordial de -- tectar las zonas enzoóticas y las zonas libres para así de -- terminar los movimientos de animales. Hay que evitar intro -- ducir animales provenientes de hatos afectados. En el caso -- de existir Linfadenitis Caseosa hay que observar buena hi -- giene de las instalaciones y del equipo, no privar de calos -- tro a las crías y atender los partos en un lugar diseñado -- especialmente para ello. Es recomendable trasquilarse primero a los animales jóvenes y sanos y terminar por los más vie -- jos y enfermos y desechar aquellos que tengan abscesos de -- bidadándose. Debido a que C. pseudotuberculosis es un pará -- sito intracelular, se protege de esta forma contra el efec -- to de antibióticos además del pus y el encapsulamiento cuan -- do se presenta la enfermedad, por lo que no es posible esta -- blecer una terapia efectiva basada en quimioterápicos no --

obstante que el microorganismo es muy susceptible a una gran cantidad de éstos "in vitro". Es posible dar un tratamiento quirúrgico extirpando los abscesos superficiales, sin embargo este procedimiento habrá de hacerse en los estadios tempranos de la enfermedad. Aún así existe la posibilidad de la presencia de abscesos internos y si ese es el caso, se encontrarán cuando el animal sea sacrificado (Ayers, 1977; Blood et.al., 1982; Brown & Olander, 1987; Ellis 1983; Ellis et. al., 1987; Nairn & Robertson, 1974; Tórtora, 1989).

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el de evaluar la capacidad protectora de una bacterina de Corynebacterium pseudotuberculosis. Las metas para alcanzar este objetivo son:

a) Inocular la bacterina diluida 1:10 y sin diluir en dos grupos experimentales de cuyes.

b) Evaluar los efectos de una prueba de intradermo ---  
reacción con toxina cruda y con antígeno preparado a base de células completas de C. pseudotuberculosis después de la vacunación.

c) Detectar los niveles de anticuerpos contra toxina -  
cruda y contra la bacteria producidos por efecto de la vacunación mediante pruebas de aglutinación lenta en tubo e inhibición de la hemólisis.

## MATERIAL Y METODO

### MATERIAL

#### I.- CRISTALERIA:

- A).- Matraces
- B).- Tubos con tapón de rosca
- C).- Tubos Durham
- D).- Pipetas
- E).- Micropipetas de plástico de 0.1 ml
- F).- Filtro de plástico adaptable a jeringa
- G).- Membrana de filtración de 0.5 nm
- H).- Jeringas
- I).- Calibrador de Vernier

#### II.- EQUIPO:

- A).- Espectrofotómetro
- B).- Potenciómetro
- C).- Centrífuga
- D).- Agitador orbital

#### III.- BIOLÓGICO:

A).- Bacterina.- Se usó una bacterina experimental de Corynebacterium pseudotuberculosis producida en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán resultado de un trabajo de tesis (Ocampo, 1991).

B).- Cepa de Corynebacterium pseudotuberculosis.- Esta cepa se obtuvo a partir de un decomiso en el rastro de Ferrería y se mantuvo en congelación.

C).- Cobayos.- Se adquirieron 30 cuyes (*Cavia porcellus*)

cepa Hartley provenientes del bioterio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional con un promedio de 745 g de peso. Todos los animales estaban clínicamente sanos.

#### IV.- MEDIOS Y REACTIVOS:

A).- Medio de Caldo Cerebro-corazón (BHI). (Lab. Difco).

A-1.- BHI adicionado con 0.1 % de suero equino estéril.

A-2.- BHI adicionado con 0.1 % de Tween 60.

B).- Solución Bufferada de Fosfatos (PBS): Formulada de la siguiente manera:

1er. paso.- Soluciones concentradas:

|                           |        |                                  |
|---------------------------|--------|----------------------------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 0.15 M | 21.3 g/l de agua -<br>destilada. |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$  | 0.15 M | 20.4 g/l " " "                   |
| $\text{NaCl}$             | 0.15 M | 8.8 g/l " " "                    |

2o. paso.- Para obtener PBS con pH=7.2

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 76.0 ml  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$  | 24.0 ml  |
| $\text{NaCl}$             | 100.0 ml |

(Morilla, 1986).

Solución B-1: PBS adicionado con 0.1 % de Tween 60 y 0.3 % de formalina

Solución B-2: PBS adicionado con 0.1 % de Tween 60 y 0.2 % de formalina.

C).- Eritrocitos de cabra suspendidos al 0.5 % en PBS.

D).- Antígeno.- Para la elaboración del antígeno se utilizó la cepa de C. pseudotuberculosis ya descrita (III-B) --- cultivada en 5.0 ml del medio A-1 y se incubó a 37°C durante 24 horas. Después de ese tiempo se pasó a los matraces con 250 ml del medio A-2 y se incubaron en el agitador orbital a 37°C durante 12 horas a 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 2 500 rpm durante diez minutos. El paquete celular ----

obtenido se lavó con la solución B-1. Se ajustó a una transmitancia de 84 % a 600 nm suspendiendo el paquete celular en la solución B-2 la cual también fué usada como blanco en el espectrofotómetro.

E).- TOXINA.- Se utilizó la cepa empleada en la producción del antígeno cultivada en el medio A-1 en el agitador orbital a 200 rpm. Este cultivo se centrifugó a 2500 rpm por diez minutos y el sobrenadante se filtró a través de la membrana "Millipore".

La titulación de la toxina se hizo mediante una prueba de hemólisis con eritrocitos de cabra al 0.5 %. Se hicieron diluciones logarítmicas de la toxina de  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$  y el título hemolítico de esta toxina fué de  $10^{-5}$  y se conservó en congelación en dos formas:

Toxina A: Sin diluir.

Toxina B: Diluida  $10^{-4}$ .

#### MÉTODOS

I.- INMUNIZACION.- Los cuyes se colocaron en tres grupos: A, B y C de diez animales cada uno. El lote C se consideró como grupo testigo. En los tres grupos se colocaron tres machos y siete hembras no preñadas. El grupo A recibió dos dosis de 1.0 ml de la bacterina sin diluir por vía subcutánea en la cara interna del muslo izquierdo la primera dosis y en el muslo derecho la segunda. Al grupo B se le inoculó la bacteria diluida 1:10 y al grupo C testigo se le administró agua destilada estéril; todos en la misma cantidad, por la misma vía y bajo el mismo calendario que como se hizo con el grupo A (Figura 1).

#### II.- EVALUACION:

A).- PRUEBA DE INTRADERMORREACCION.- Se hicieron estas pruebas a todos los grupos experimentales usando la toxina A y el antígeno (IV-D). Se rasuraron los costados de los animales y con aguja insulínica se les inoculó 0.1 ml de toxina -

y 0.1 ml de antígeno por vía intradérmica en sitios diferentes. Se inoculó también la solución B-2 como control de reacción negativa ante la reacción del antígeno. La lectura se hizo con un calibrador de Vernier.

B).- PRUEBAS SEROLOGICAS.- Con el fin de detectar la -- producción de anticuerpos, los cuyes fueron sangrados a blanco. Con el suero obtenido se hicieron pruebas de aglutinación lenta en tubo y de inhibición de la hemólisis. Los procedimientos de estas pruebas se detallan en las figuras 2 y 3.

C).- METODOS ESTADISTICOS.- Se hizo un análisis de varianza con las reacciones inflamatorias de los tres grupos - y una prueba de hipótesis con la reacción dermonecrótica de los grupos B y C.

FIGURA 1  
CALENDARIO DE ACTIVIDADES PARA LA EVALUACION  
DE LA BACTERINA

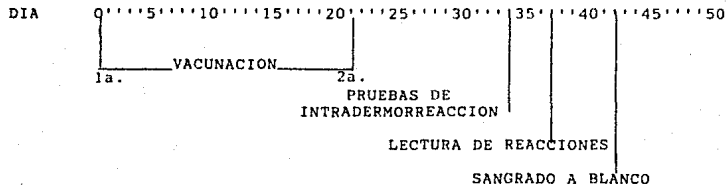
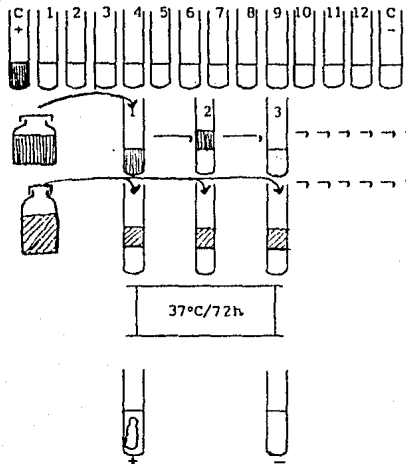




FIGURA 2.- PRUEBA DE AGLUTINACION LENTA EN TUBO.



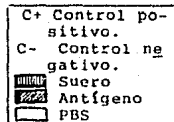
1.- Se colocaron 0.1 ml de PBS en una serie de 12 tubos Durham más un control + (suero sin diluir) y un control - (PBS sin suero).

2.- Se agrega 0.1 ml de suero a titular al tubo 1, se homogeniza y se toma 0.1 ml que se pasa al tubo 2 así sucesivamente hasta el tubo 12

3.- Se añade 0.1 ml de Antígeno a cada tubo incluyendo a los controles.

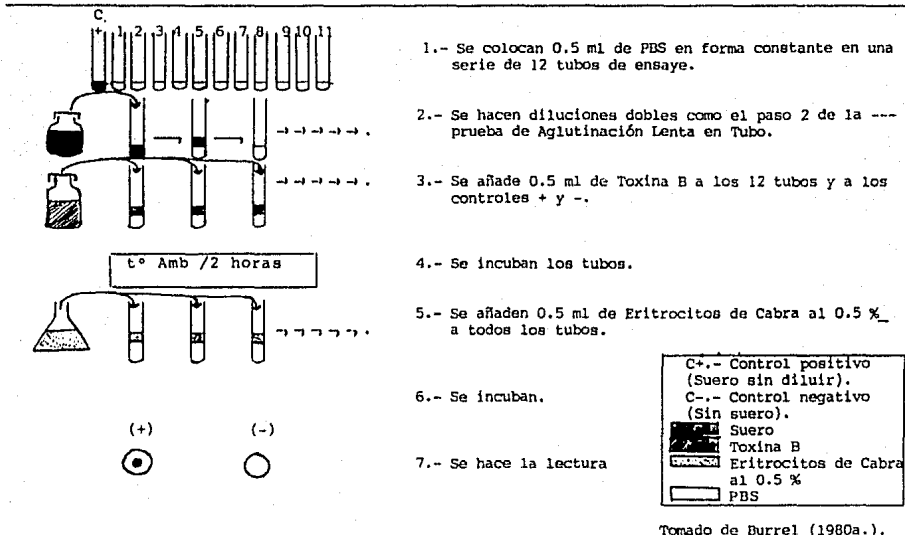
4.- Se incuban los tubos

5.- Se hace la lectura



Modificado de Morilla (1986).

FIGURA 3.- PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMOLISIS



## RESULTADOS

A).- PRUEBAS DE INTRADERMORREACCION.- Los resultados de estas pruebas se presentan en el cuadro 1. En el grupo C se desarrolló una induración de la piel que no se presentó en los otros dos grupos en el sitio en que se inyectó toxina y la inflamación provocada no presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $p > .05$ ) en cambio donde se inyectó antígeno, esta diferencia si lo fué ( $p < .05$ ).

A las 12 horas los animales de los grupos B y C mostraron dificultad para caminar y trataban de lamerse en el sitio en que se les inyectó la toxina, lo cual sugirió la presencia de dolor y algunos presentaron signos secundarios que consistieron en un cuadro de anorexia, baja de peso, caída de pelo y muerte antes de 72 horas de iniciada la prueba --- (Cuadro 2).

A partir de las 72 horas la inflamación provocada por el antígeno tendió a desaparecer en los tres grupos mientras que en el lugar en el que se aplicó toxina se produjo un foco de necrosis cutánea en los grupos B y C únicamente.

B).- PRUEBAS SEROLOGICAS.- Los títulos de anticuerpos para cada una de las pruebas se muestran en el cuadro 3. Estas pruebas se hicieron después del desafío lo cual debe considerarse. Los títulos más elevados de anticuerpos se encontraron entre los animales que fueron inmunizados con bacteria sin diluir y en todos los casos se encontraron títulos más altos contra el cuerpo celular que contra la toxina.

CUADRO 1.  
 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INTRADERMORREACCION

| GRUPO | X DIAMETRO DE INFLAMACION POR TOXINA (mm) | X DIAMETRO DE NECROSIS POR TOXINA (mm) | X DIAMETRO DE INFLAMACION POR ANTIGENO (mm) | X DIAMETRO DE INFLAMACION POR PBS (mm) |
|-------|---|--|---|--|
| A     | 15.44                                     | -                                      | 7.78  | -                                      |
| B     | 16.15                                     | 3.7                                    | 10.73                                       | -                                      |
| C     | *11.65                                    | *2.3                                   | 11.38                                       | -                                      |

- A INMUNIZADO CON BACTERINA SIN DILUIR  
 B INMUNIZADO CON BACTERINA DILUIDA 1:10  
 C SIN INMUNIZAR  
 \* CON INDURACION

CUADRO 2.  
MORBILIDAD Y MORTALIDAD POR EFECTO DE LA TOXINA

| GRUPO | ANIMALES CON<br>CUADRO CLINICO | %    | ANIMALES<br>MUERTOS | %    |
|-------|--------------------------------|------|---------------------|------|
| A     | -                              | -    | -                   | -    |
| B     | 1                              | 10.0 | 1                   | 10.0 |
| C     | 5                              | 50.0 | 4                   | 40.0 |

- A INOCULADOS CON BACTERINA SIN DILUIR  
 B INOCULADOS CON BACTERINA DILUIDA 1:10  
 C SIN INMUNIZAR

CUADRO 3.  
 TITULOS DE ANTICUERPOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS  
 POST-DESAFIO

| GRUPO | AGLUTINACION LENTA<br>EN TUBO | INHIBICION DE<br>LA HEMOLISIS |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|
| A     | 1:1024                        | 1:128                         |
| B     | 1:512                         | 1:32                          |
| C     | 1:8                           | 1:4                           |

- A INOCULADOS CON BACTERINA SIN DILUIR  
 B INOCULADOS CON BACTERINA DILUIDA 1:10  
 C SIN INMUNIZAR

## DISCUSION

Los resultados de este trabajo muestran que los cuyes inoculados con la bacterina experimental no mostraron ninguna alteración, siendo que ésta había sido elaborada con más de tres meses de anterioridad. En cambio esta misma bacterina había sido probada en cuyes 5 días después de su elaboración provocándoles un cuadro de depresión e inapetencia seguido por un 80 % de mortalidad (Ocampo, 1991, comunicación personal). Esta observación concuerda con la de Cameron y col. (1972) quienes mencionan que la bacterina empleada por ellos después de siete días de elaborada resultó inocua; no así cuando la usaron dos días posteriores a su elaboración produciendo la muerte de cuyes y borregos.

La lesión característica que produce la exotoxina inoculada por vía intradérmica en conejos, cuyes y borregos es una dermonecrosis tal como lo describen Jolly (1965) y Sutherland (1989). En este trabajo se observó esta misma reacción y no se vió ningún caso en que se desarrollara edema o hemorragia como lo reporta Hsu y col. (1985) después de que se inyectó toxina cruda, filtrada o purificada a animales de laboratorio. Por el contrario, Burrell (1978), al hacer un estudio comparativo de los efectos de diferentes cepas, en animales inoculados con exotoxina o con bacterias inactivadas no mostraron ninguna alteración.

El efecto tóxico de C. pseudotuberculosis es debido al lípido de superficie que se encuentra en la pared celular y se lleva a cabo sobre las membranas endoplasmicas de los macrófagos provocándoles la muerte (Hard, 1975). Tashjian y Campbell (1983) encuentran que esta toxicidad se mantiene aún cuando la bacteria está inactivada o destruida y que al inyectarse así es posible la formación de abscesos estériles en el sitio de inoculación. Sin embargo estos abscesos no se formaron ni en los animales inmunológicamente sensibilizados

formaron ni en los animales inmunológicamente sensibilizados ni en los del grupo testigo de este trabajo.

En este trabajo se observó el desarrollo de un cuadro clínico que consistió en decaimiento, anorexia, baja de peso y caída de pelo en los grupos B y C después del desafío con toxina cruda. Ashfaq (1980) reportó esta misma reacción y se la atribuyó a los efectos de la toxina. Así mismo, de acuerdo a los trabajos de Brown y col. (1985) es posible el desarrollo de esta signología en grados variables e incluso pueden existir casos de muerte súbita por choque tóxico dependiendo en gran medida de la especie con que se trabaje, la cepa bacteriana y las técnicas de desafío utilizadas. Por ejemplo, Jolly (1965) describe el efecto letal de la toxina de esta bacteria en ratones, Sin embargo Gómez y Alcalá (1988) no encontraron tal efecto.

La mortalidad encontrada entre los grupos experimentales del presente trabajo concuerda con los hallazgos de Brown y col. (1986) y de Cameron y Puls (1973). Los primeros, después de aplicar un toxide experimental encontraron una protección eficaz contra el desafío de C. pseudotuberculosis viva mientras que los segundos encontraron diferentes grados de protección en cuyes y borregos al comparar bacterinas comerciales y experimentales. Esto sugiere que el número de animales afectados o muertos después de un desafío puede estar determinado por la forma en que la bacterina fué elaborada.

Con las pruebas serológicas de diagnóstico empleadas aquí, se detectaron bajos títulos de anticuerpos en animales no inmunizados. Del mismo modo, En los trabajos de Lea Master y col. (1987) se menciona la presencia de títulos similares contra la bacteria en algunos animales de laboratorio no inmunizados con el empleo de pruebas serológicas más



finas; de hecho son los cuyes y los conejos las especies que sin ser inmunoestimulados previamente contra el agente etiológico de la Linfadenitis Caseosa, presentan los títulos mayores e incluso considera que un título mayor a 0.2 en la prueba de ELISA es negativo. Sin embargo no se encontraron trabajos que expliquen la presencia de estos anticuerpos.

Finalmente aquí se encontraron títulos mayores de anticuerpos contra el cuerpo celular que contra la toxina, pero de la literatura revisada no se encontró ningún artículo en que se mencione esta observación. Es probable que la aglutinación observada en los tubos con las diluciones más bajas en la prueba de aglutinación lenta en tubo sea debida a que la presencia de anticuerpos contra el microorganismo facilite la autoaglutinación que C. pseudotuberculosis es capaz de llevar a cabo (Garg et.al., 1984) dando la apariencia de un título mayor al real.

## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que:

A).- Los animales a los que se les inoculó la bacterina sin diluir no presentaron dermonecrosis cuando se les administró toxina por vía intradérmica.

B).- Después de inocular la toxina por vía intradérmica la lesión más notable en cuyes no inmunizados es una induración en el sitio de inoculación mientras que en animales inmunizados con un producto diluido provoca una dermonecrosis.

C).- El título de anticuerpos contra toxina y contra la bacteria aumenta a medida que la bacterina inoculada esté menos diluida.

D).- La mortalidad y morbilidad aumentan después del desafío con toxina por vía intradérmica si la bacterina está diluida o si no se inmunizan los animales.

E).- Estadísticamente hay una diferencia significativa en la inflamación provocada por la inoculación del antígeno con respecto al grupo testigo pero no la hay por la administración intradérmica de toxina.

LITERATURA CITADA

- Adeyeke, J.D.; D. Shanon & P.B. Addo (1980). Mastitis in a - cow caused by Corynebacterium pseudotuberculosis (C. ovis). Vet. Rec. 106 (3): 207.
- Ajai, C.O.; J.E. Cook & S.M. Dennis (1980). Diagnosing ovine epididimitis by immunofluorescence. Vet. Rec. 107 (5): 421-424.
- Ashfaq, M.K. & S.G. Campbell (1979). A survey of Caseous - Lymphadenitis and its etiology in the United States. Vet. Med. Small An. Clin. 74 (8): 1161-1165.
- Ashfaq, M.K. & S.G. Campbell (1980). Experimental induced - Caseous Lymphadenitis in goats. Am. J. Vet. Res. 44 (11): 1789-1792.
- Augustine, J.L. & H.W. Renshaw (1986). Survival of Coryne -- bacterium pseudotuberculosis in axenic purulent exudates on common barnyard fomites. Am J. Vet. Res. 47 (44): 713-715.
- Ayers, J.L. (1977). Caseous Lymphadenitis in goats and sheep A review of diagnosis, pathogenesis and immunity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171 (12): 1251-1254.
- Bandopathyay, M.C.; S.K. Chatopathyay & S.V. Pachaleq(1972). Brain abscess in sheep. Indian Vet. J. 49 (7): 653--665.
- Blood, D.G.; J.A. Henderson & O.M. Radostis (1982). Caseous\_ Lymphadenitis. Veterinaryr Medicine: A textbook of - the diseases of cattle, sheep, pigs and horses. 5a. Edición. Interamericana. México, D.F. 439-441.

- Brogden, K.A.; R.C. Cutlip & H.D. Lehmkuhl. (1984a). Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis infection in lambs. Am. J. Vet. Res. 45 (8): 1532-1534.
- Brogden, K.A.; R.C. Cutlip & H.D. Lehmkuhl (1984b). Comparison of protection induced in lambs by Corynebacterium pseudotuberculosis whole cell and cell wall -- vaccines. Am. J. Vet. Res. 45 (11): 2393-2395.
- Brown, C.C. H.J. Olander; E.L. Biberstein & B. Moreno (1985). Serologic response and lesions in goats experimentally infected with Corynebacterium pseudotuberculosis of caprine and equine origins. Am. J. Vet. Res. 46 (11): 2322-2326.
- Brown, C.C.; H.J. Olander; E.L. Biberstein & S.M. Morse --- (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goats -- against intradermal challenge exposure to Corynebacterium pseudotuberculosis. Am. J. Vet. Res. 47(5): 1116-1119.
- Brown, C.C. & H.J. Olander (1987). Caseous Lymphadenitis of goats and sheep: A review. Vet. Bull. 57 (1): 1-9.
- Burrell, D.H. (1978). Experimental induction of Caseous -- Lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of Corynebacterium ovis. Res. Vet. Sci. 24 (3): 269-276.
- Burrell, D.H. (1980a). A haemolysis inhibition test for detection of antibody to Corynebacterium ovis exotoxin. Res. Vet. Sci. 28 (2): 190-194.
- Burrell, D.H. (1980b). A simplified double immunodiffusion technique for detection of Corynebacterium ovis antitoxin. Res. Vet. Sci. 28 (2): 234-237.

- Cameron, C.M. & L. Buchan (1966). Identification of the protective and toxic antigens of Corynebacterium pseudo tuberculosis. Onderspoort J. Vet. Res 33 (1):39-48.
- Cameron, C.M. & M.C. Smit (1970). Relationship of Corynebacterium pseudotuberculosis protoplasmic toxins to the exotoxin. Onderspoort J. Vet. Res. 37 (2): 97-104.
- Cameron, C.M.; J.L. Minaar; M.M. Engelbrecht & M.R. Purdom - (1972). Immune response of merino sheep to inactivated Corynebacterium pseudotuberculosis vaccine. Onderspoort J. Vet. Res. 39 (1): 11-24.
- Cameron, C.M. & W.J.P. Fuls (1973). Studies on the enhancement immunity to Corynebacterium pseudotuberculosis. Onderspoort J. Vet. Res. 40 (3): 105-114
- Cameron, C.M. (1975). Effect of levamisole on immunity to Corynebacterium pseudotuberculosis in mice and sheep Onderspoort J. Vet. Res. 44 (1): 47-48.
- Cameron, C.M. & F.J. Bester (1984). An improved Corynebacterium pseudotuberculosis vaccine for sheep. Onderspoort J. Vet. Res. 51(4): 263-267.
- Chicamatsu, S.; H.K. Shao; N. Kikuchi & T. Hiramune (1989). Seroepidemiological survey of Corynebacterium pseudo tuberculosis infection in sheep in Japan using Enzyme Linked Immunosorbent Assay and immunodiffusion. Jpn. J. Vet. Sci. 51 (5): 887-891.
- Desiderio, J.V.; L.A. Turillo & S.G. Campbell (1979). Serum proteins of normal goats and goats with Caseous Lymphadenitis. Am. J. Vet. Res. 40 (3): 400-402.

- Egen, N.B.; W.A. Cuevas; P.J. Mc. Namara; D.W. Sammons; R.--  
Humphreys & J.G. Songer (1989). Purification of the -  
fosfolipase D of Corynebacterium pseudotuberculosis -  
by recycling isoelectric focusing. Am. J. Vet. Res. -  
50 (8): 1319-1322.
- Ellis, J.A. (1983). Ovine Caseous Lymphadenitis. Continuing\_  
Education Article # 10. 5 (9): 8504-8510.
- Ellis, J.A. (1988). Immunophenotype of pulmonary celular in-  
filtrates in sheep with visceral Caseous Lymphadeni--  
tis. Vet. Pathol. 25 (5):362-368.
- Ellis, T.M.; S.S. Sutherland; F.C. Wilkinson; A.R. Mercy & -  
M.W. Paton (1987). The role of Corynebacterium pseudo  
tuberculosis lung lesions in the transmission of this  
bacterium to other sheep. Aust. Vet. J. 64(9): 261---  
266.
- Favier, B.; Y. Richard; J. Oudar & E. Borges (1990). Étude -  
bactériologique de 58 souches de Corynebacterium pseu  
dotuberculosis. Note 1: Intérêt d'une microméthode --  
(Système API 50 CH) pour l'étude du métabolisme fer-  
mentatif. Revue de Méd. Vet. 14 (1): 43-47.
- García V., S.E. (1980). Aislamiento y caracterización de co-  
rinebacterias de muestras de ovinos y caprinos en Mé-  
xico. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superio  
res Cuautitlán - U.N.A.M.
- Garg, D.N.; S.P.S. Nain & M.K. Chandiramani (1984). Seropre-  
valence of Corynebacterium ovis agglutinins amongst --  
sheep and goats. Indian J. Anim. Sci. 54 (6): 544-546.

- Garg, D.N. & N.K. Chandiramani (1984). Preliminary observations on the applications of the Enzima-Linked Immune sorbent Assay (ELISA) for the detection of Corynebacterium ovis antibodies. Indian J. Vet. Sci. 54 (10): -- 965-968.
- Gillespie, J.H. & J.F. Timoney (1984). Corynebacterium pseudotuberculosis. Hagan and Bruner's Infectious Diseases of Domestic Animals. 4a. Ed. (Español). La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 213-216.
- Gómez de la Rosa, A. y J.L. Alcalá (1988). Evaluación de la toxina cruda de Corynebacterium ovis en animales de laboratorio. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - U.N.A.M.
- Hamir, A.N. (1981). Corynebacterium pseudotuberculosis lesion in the heart of a sheep. Vet. Rec. 109 (9): 180.
- Hard, G.C. (1970). Adoptive transfer of immunity in experimental Corynebacterium ovis infection. J. Comp. Pathol. 80 (2): 329-334.
- Hard, G.C. (1975). Comparative toxic effect of the surface lipid of Corynebacterium ovis on peritoneal macrophages infection and immunity. J. Comp. Pathol. 12 (6) ; 1439-1444.
- Hedden, J.A.; C.M. Thomas; J.M. Songer & G.B. Olson (1986).-- Characterization of lectin-binding lymphocytes in -- goats with Caseous Lymphadenitis. Am. J. Vet. Res. 47 (6): 1265-1267

- Hsu, T.Y.; H.W. Renshaw; C.W. Livingston; J.L. Augustine; D. L. Zink & B.B. Gauer (1985). Corynebacterium pseudotuberculosis exptoxin: fatal hemolytic anemia induced - in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. -- Am. J. Vet. Res. 46 (5): 1206-1211.
- Husband, A.J. & D.L. Watson (1977). Immunological events in the popliteal lymph node in sheep following injection of live or killed Corynebacterium ovis into an afferent popliteal lymphatic duct. Res. Vet. Sci. 22 (1): 105-112.
- Jolly, R.D. (1965). The pathogenic action of the exotoxin of Corynebacterium ovis. J. Comp. Pathol. 75 (3): 417-431.
- Kuria, J.N.K. & G. Holstad (1989a). A seroepidemiological investigation of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep flocks in Southern Norway. Acta Vet. Scand. 30 (1): 107-108.
- Kuria, J.N.K. & G. Holstad (1989b). Serological investigation of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep - Correlation between the hemolysis inhibition test and the ELISA test. Acta Vet. Scand. 30 (1): 109-110.
- Lea. Master, B.R.; D.T. Shen; J.R. Gorham; C.W. Leathers & H. D. Wells (1987). Efficacy of Corynebacterium pseudotuberculosis bacterin for the immunologic protection of sheep against development of Caseous Lymphadenitis. - Am. J. Vet. Res. 48 (5): 869-872.



- Lovell, R. & M.M. Zaki (1966). Studies on growth products - of Corynebacterium ovis. 1.- The exotoxin and its -- lethal action on white mice. Res. Vet. Sci. 7 (3): - 302-306.
- Lund, A.; T. Almlid; H.J. Larsen & T. Steine (1982a). Antibodies to Corynebacterium pseudotuberculosis in ---- adult goats from a naturally infected herd. Acta Vet. Scand. 23 (4): 473-482.
- Lund, A.; T. Almlid; T. Steine & H.J. Larsen (1982b). Colocal transfer in the goat of antibodies against Corynebacterium pseudotuberculosis and the antibody status of kids during the ten first months of life. --- Acta Vet. Scand. 23 (4): 483-489.
- Mohan, K. & M. Uzoukwu (1980). Certain characteristics of Corynebacterium pyogenes infection. Vet. Rec. 107 -- (11): 252-253.
- Morilla, G. y C.R. Bautista (1986). Manual de Inmunología - 1a. Edición. Editorial Diana. México, D.F.
- Muckle, C.A. & G.L.Gyles (1983). Relation of lipid content\_ and exotoxin production to virulence of Corynebacterium pseudotuberculosis in mice. Am. J. Vet. Res. 44 (6): 1149-1153.
- Nairn, M.E. & J.P. Robertson (1974). Corynebacterium pseudo tuberculosis infection of sheep: Role of skin le---- sions and dipping fluids. Aust. Vet. J. 50 (12):537-542.

- Nakamura, K.; E. Momotani; Y. Yokomizo; H. Yugi & S. Shoya. (1981). Pathological changes in sheep infected with Corynebacterium pseudotuberculosis. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.) 21: 150-151.
- Navarrete G., S.M. (1988). Obtención de toxina a partir del aislamiento de Corynebacterium ovis. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - U.N.A.M.
- Ocampo L., J. (1991). Elaboración de una bacterina de Corynebacterium ovis. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - U.N.A.M.
- Pepin, M.; J. Marly & P. Pardon (1987). Corynebacterium --- pseudotuberculosis infection in sheep and the complement fixation test for paratuberculosis. Vet. Rec. - 120 (10): 136.
- Pepin, M.; P. Pardon; J. Marly & F. Lantier (1988). Corynebacterium pseudotuberculosis infection in adult ewes by inoculation in the external ear. Am. J. Vet. Res. 49 (4): 459-468.
- Renshaw, H.W.; V.P. Graff & N.L. Gates (1979). Visceral Caseous Lymphadenitis in thin ewes syndrome: Isolation of Corynebacterium, Staphylococcus and Moraxella spp from internal abscesses in emaciated ewes. Am. J. Vet. Res. 40 (8): 1110-1114.
- Shigidi, M.T.A. (1978). An indirect haemagglutination test - for the serodiagnosis of C. ovis infection in sheep. Res. Vet. Sci. 24 (1): 57-60.

- Stoops, S.G.; H.M. Renshaw & J.P. Thilsted (1984). Ovine - Caseous Lymphadenitis: Disease prevalence, lesion, - distribution and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. Am. J. Vet. Res. 45 (3): 557-561.
- Sutherland, S.S.; M.W. Paton; A.R. Mercy & T.M. Ellis (1987) A reliable method for establishing Caseous Lymphadenitis infection in sheep. Aust. Vet. J. 64 (10):323-324.
- Sutherland, S.S. E.J. Speijers & B. Andres (1989). Comparison of the exotoxins of four strains of Corynebacterium pseudotuberculosis. Res. Vet. Sci. 47 (2): 194-199.
- Tashjian, J.J. & S.G. Campbell (1983). Interaction between caprine macrophages and Corynebacterium pseudotuberculosis: An electron microscopic study. Am. J. Vet.-Res. 44 (4): 690-693.
- Tórtora, P.J. (1989). Instalaciones, medio ambiente y salud animal. Memorias del II Congreso Nacional de Producción Ovina. San Luis Potosí, S.L.P.; U.A. S.L.P. 118-125. 125.
- Williams, C.S.F. (1980). Differential diagnosis of Caseous Lymphadenitis in the goat. Vet. Med. Small Anim. --- Clin. 75 (7): 1165-1169.
- Williams H. (1984). Situación de la ovinocultura a nivel -- mundial. Memorias del Curso "Bases de la Cría Ovina" Toluca, México. Ed. Pau J. Pijoán, Santos I. Arbiza. 11-27.

Williamson, P. & M.E. Nairn (1980). Lesions caused by Corynebacterium pseudotuberculosis in the scrotum of ---  
rams. Aust. Vet. J. 56 (10): 496-498.