



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



EVALUACION DE UN ANTISUERO PARA  
LA IDENTIFICACION DE  
Corynebacterium ovis

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A  
**JUAN MORALES SANCHEZ**

ASESORES

M.V.Z. SUSANA E. GARCIA VAZQUEZ

M.V.Z. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1992



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

RESUMEN.....	2
INTRODUCCION.....	4
OBJETIVOS.....	16
MATERIAL Y METODO.....	17
RESULTADOS.....	25
DISCUSION.....	33
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objeto de evaluar un antisuero contra la bacteria Corynebacterium ovis la cual origina la enfermedad denominada Linfadenitis Caseosa (LC). Esta enfermedad es causa de grandes pérdidas económicas por decomisos y tratamientos inadecuados debido a que los animales afectados no presentan manifestaciones clínicas características.

Para la elaboración del antisuero se utilizaron cuatro conejos de los cuales tres fueron inoculados con una bacterina elaborada en el laboratorio de Microbiología de la FES-Cuautitlán. El cuarto animal no fue inoculado quedando como control negativo.

A cada uno de los animales se les tomaron muestras de sangre (1.0 ml.) semanalmente para obtener el antisuero y realizar las pruebas de aglutinación lenta en tubo para su titulación y aglutinación en portaobjetos.

Con el mismo antisuero se realizaron pruebas de aglutinación en portaobjetos utilizando las bacterias Staphylococcus aureus Streptococcus Grupo A y Corynebacterium ovis para detectar si había reacción cruzada entre las mismas ya que estas bacterias han sido aisladas de procesos supurativos.

Los resultados muestran que el antisuero presentó reacción de aglutinación desde la primer semana post-inoculación con titu-

los de 2.1 y un título final a las 5 semanas de 3.6.

La prueba de aglutinación en portaobjetos dió resultados negativos en la prueba de reacción cruzada. Se obtuvo reacción positiva con Corynebacterium ovis pero no con Staphylococcus aureus ni con Streptococcus Grupo A.

Con los resultados obtenidos se concluye que el antisuero elaborado en este trabajo y que dió un título máximo de 3.6 (expresado en logaritmo decimal), indica que esta prueba puede ser utilizada para diagnosticar infecciones ocasionadas por Corynebacterium ovis.

## I N T R O D U C C I O N

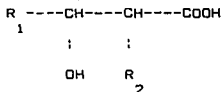
La Linfadenitis Caseosa (LC), es una enfermedad que afecta a ovinos y caprinos principalmente, es una enfermedad crónica caracterizada por inflamación, necrosis y supuración de los ganglios linfáticos superficiales, pérdida de peso y ocasionalmente muerte del animal afectado. La causa de esta enfermedad es la bacteria denominada Corynebacterium pseudotuberculosis, (Corynebacterium ovis). (BROWN, 1987; KURIA, 1989; AUGUSTINE, 1986).

El género Corynebacterium es un grupo heterogéneo con todas sus especies colocadas en este grupo por la similitud de los componentes de sus paredes celulares. Frecuentemente se les llama bacterias difteroides, son inmóviles, no esporulan, presentan unos gránulos en su citoplasma, los cuales se tienen de manera irregular (gránulos metacromáticos). En los frotis tienden a la formación de agrupaciones características en forma de "empalizadas" o "letras chinas" (GARCIA, 1980; JAWETZ, 1983).

Basándose en el contenido lipídico, de la pared celular, el género Corynebacterium frecuentemente se agrupa con los géneros Mycobacterium, Nocardia y Rhodococcus para formar un grupo denominado C M N R debido a que los cuatro géneros tienen paredes celulares ricas en complejos lipídicos similares. La mayor característica de esos lípidos es la presencia de un ácido graso llamado ácido micólico. Las mureinas (peptidoglicanos o

mucopéptidos), de sus paredes celulares contienen combinaciones de enlaces específicos. Las paredes celulares de este grupo tienen un péptido común conteniendo meso alfa diaminopimélico (DAP), ácido glutámico y alanina, (además el género Corynebacterium contiene un polisacárido con arabinosa, galactosa y algunas veces manosa), en asociación con arabinogalactán. Además de tener mureinas básicamente similares los organismos del grupo C M N R incorporan entre sus paredes ácido corinemicólico y curinemicolénico en caso de corinebacterias; ácido tetrahidro-nocárdico en nocardias ó ácido micólico en micobacterias.

Los ácidos micólicos son ácidos grasos Beta hidroxilicos de cadena larga, con sustituciones en el carbono alfa. La fórmula general para el ácido micólico es:



con largas cadenas de carbono en sus radicales R, difiriendo entre si los cuatro géneros del grupo C M N R. El ácido micólico de Mycobacterium spp tiene el mayor número de carbonos de este grupo con (C<sub>79</sub> - C<sub>85</sub>). Corynebacterium spp tiene las cadenas de carbono más cortas de los cuatro géneros, conteniendo (C<sub>40</sub> - C<sub>28</sub>). Rhodococcus y Nocardia tienen un ácido micólico con cadenas de carbono de (C<sub>40</sub> - C<sub>50</sub>) y (C<sub>48</sub> - C<sub>58</sub>) respectivamente (GARCIA 1980; BROWN, 1987; PEREZ, 1988).

Microscópicamente C. ovis es un bastón muy corto Gram positivo, que mide de 1 a 3 micras de largo y de 0.5 a 0.6 micras de ancho. Es una bacteria anaerobia facultativa, la cual crece lentamente en agar sangre, produciendo colonias planas opacas de color blanco-amarillento, en un tiempo aproximado de 24 a 48 horas. Las colonias están rodeadas por un halo angosto ocasionado por Beta hemólisis. Los lípidos de la pared celular tienen un peso aproximado de 11.3% de el peso seco de la bacteria. Debido al alto contenido lipídico las colonias tienen un aspecto seroso y se deslizan fácilmente sobre la superficie del agar (JAWETZ, 1983; CARTER, 1985).

Bioquímicamente C. ovis es catalasa y ureasa positivo y es capaz de fermentar glucosa, galactosa, maltosa y manosa, generalmente forman ácidos pero no forman gas con algunos carbohidratos. La habilidad para reducir nitratos a nitritos es variable, cepas aisladas de pequeños rumiantes no son capaces de realizar esta reducción, pero las cepas aisladas de caballos sí lo hacen (GARCIA, 1980; BROWN, 1985; REDONDO, 1988).

La virulencia de una cepa en particular se relaciona con la cantidad de lípidos de su pared celular. En un experimento Muckle (1984), se obtuvieron los lípidos de la pared celular de 25 cepas de C. ovis utilizando cloroformo-metanol y cada una de las extracciones de esas 25 cepas fue inoculada en diferentes grupos de ratones. La cepa con mayor cantidad de lípidos produjo una ma-



por cantidad de abscesos. Resultados similares fueron obtenidos por Burrell (1978), quien determinó que hay una correlación positiva entre el contenido lipídico de la pared celular y la habilidad para producir lesiones en los ganglios poplíteos de borregos (BURRELL, 1978; MUCKLE, 1984).

Un componente muy importante de esta bacteria es una potente exotoxina. Esta exotoxina es una fosfatidilcolina-fosfato-hidrolasa, más conocida con el nombre de fosfolipasa D. Esta toxina actúa como una esfingomielinasa catalizando la esfingomielina de los eritrocitos en ceramida y colina, además, también afecta a las células endoteliales, aumentando así la permeabilidad capilar. Experimentalmente es letal por vía intravenosa para ovinos, caprinos y animales de laboratorio. Estructuralmente la exotoxina es una glicoproteína con una composición de aminoácidos, su peso molecular se estima entre 14 500 a 31 000; se localiza principalmente en el citoplasma de la bacteria y en menor cantidad en la pared celular, puede ser obtenida fácilmente de el sobrenadante de un cultivo en caldo nutritivo. Es estable en líquido pero se inactiva con calor o almacenaje prolongado o con formalina (CARNE, 1978; HSU, 1985; BROWN, 1987; JOLLY, 1965; JUBB, 1982; ZAKI, 1976).

La fosfolipasa D actúa sobre la esfingomielina de la membrana celular, por sí sola no causa mucho daño en la membrana eritrocítica para dar una franca hemólisis, pero algunas veces la hemólisis puede ocurrir si el proceso es ayudado por frío o

disminución del pH a menos de 6. Esta toxina es capaz de inhibir la hemólisis ocasionada por la beta lisina del Staphylococcus aureus, la cual es también una esfingomielinasa, por competición ocupando el sitio receptor sobre la membrana del eritrocito (LOVELL, 1966; BROWN, 1987; CARTER, 1985).

Puede ocurrir hemólisis sinérgica cuando la fosfolipasa D de C. ovis actúa en combinación con ciertos tipos de fosfolipasa C. Esta fosfolipasa C degrada más al fosfato producido de la división de la esfingomielina ocasionada por la fosfolipasa D. La exotoxina de Corynebacterium equi (Rhodococcus equi), es una fosfolipasa C y las dos toxinas actúan secuencialmente. La degradación de la esfingomielina hasta una capa simple de fosfato resulta en una desorganización de la membrana suficiente para producir lisis celular. Esta hemólisis sinérgica ocasionada por las dos exotoxinas corinebacterianas es utilizada en la identificación de otras especies y constituye la base de la prueba de inhibición de la hemólisis sinérgica. Esto puede utilizarse para la detección de anticuerpos contra las exotoxinas de C. ovis (KNIGHT, 1978).

Todas las cepas de C. ovis producen exotoxinas similares antígenicamente, aunque se ha observado cierta variabilidad en la patogenicidad de dichas cepas. Carne (1978), realizó un experimento en el cual las exotoxinas de 12 cepas, fueron neutralizadas en su totalidad por una antitoxina. Doty (1964), examinó 120 cul-

tivos aislados de 4 especies animales y produjo antitoxina en conejos, encontrando que todas fueron neutralizadas por reacción cruzada (DOTY, 1964; CARNE, 1978; SUTHERLAND, 1989; CAMERON, 1970; RENSHAW, 1979).

Hay variación en la cantidad de exotoxina producida por diferentes cepas con evidente complejidad, así como también hay cierta variación en cuanto a la virulencia de esas exotoxinas. Muckle y Gyles examinaron 25 cepas de C. ovis y no encontraron correlación significativa entre la producción de exotoxina y la severidad de la enfermedad en ratones. En contraste Burrell, trabajando con borregos descubrió que las cepas con más alta producción de exotoxina son las que más abscesos producen (JOLLY, 1965; BURRELL, 1980; MUCKLE, 1982).

En lo que se refiere a la alta toxicidad de la exotoxina ésta fue demostrada por Hsu y colaboradores con un experimento en el cual se inocularon 13 corderos gnotobióticos, intravenosa o subcutáneamente con exotoxina sola o en combinación con C. ovis vivo. Todos los corderos murieron dentro de las primeras 48 horas post-inoculación, debido a una anemia hemolítica con nefrosis y edema pulmonar. La exotoxina produce alteración suficiente para causar una remoción masiva y degradación de la membrana de los glóbulos rojos por el sistema reticuloendotelial (HSU, 1985).

C. ovis también posee un factor piogénico termoestable de actividad quimiotáctica para leucocitos y un lípido de superficie derivado del ácido corinemicólico, tóxico para leucocitos y

gracias al cual esta bacteria resiste la actividad lisosómica de estas células (CAMERON, 1970; JUBB, 1982; ELLIS, 1983).

El C. ovis puede ser aislado junto con otras bacterias piogénas tales como Staphylococcus y Streptococcus de procesos supurativos de algunos otros mamíferos, en vacas es ocasionalmente productor de mastitis o abscesos en ganglios linfáticos, también ocasiona la linfangitis ulcerosa de los bovinos y equinos, artritis supurativa y contagiosa de los corderos, orquitis supurativa de los carneros y el acné contagioso de los equinos, todas estas enfermedades nunca se presentan acompañadas de LC (SMITH, 1985; BLOOD, 1986; CARDENAS, 1986; NAVARRETE, 1988; SANTAROSA, 1989).

#### PRUEBAS PARA DIAGNOSTICO DE LINFADENITIS CASEOSA.

El diagnóstico de la enfermedad superficial en ovinos se hace en base a la exploración por medio de la inspección y palpación minuciosa de los ganglios linfáticos superficiales, esto puede tener poco valor en la detección de lesiones tempranas y en los casos en que se presentan lesiones viscerales sin antecedentes clínicos de infección periférica. La signología de LC es prácticamente inaparente, gran parte de los animales afectados se observan aparentemente normales, detectandose casi siempre la enfermedad a nivel de rastro con la presencia de ganglios voluminosos al momento de la inspección, con lesiones características y

la presencia al corte de exudado purulento de consistencia semi-dura (caseosa), sin olor, de color verdoso o amarillo. Los ganglios superficiales más afectados son los parotídeos, mandibulares, retrofaringeos, preescapulares así como supramamarios, pre-femorales y poplíteos. En cuanto a los ganglios internos más afectados están los mediastínicos, bronquiales, mesentéricos y sublumbaros (OCAMPO, 1991; NAVARRETE, 1988; AYERS, 1977; JUBB, 1982).

Además del diagnóstico clínico numerosas pruebas de laboratorio han sido utilizadas para detectar la LC la mayoría de esas pruebas miden la respuesta humoral contra la exotoxina. Sin embargo, todas han tenido una utilización limitada, ya sea por su elevado costo de realización, por complejas y laboriosas y sobre todo por que muchas de ellas son poco confiables (NAVARRETE, 1988). Entre las pruebas de laboratorio que se han utilizado para el diagnóstico de esta enfermedad se tienen: la prueba de intradermorreacción, la neutralización, la fijación del complemento, la inhibición de la antihemolisina, la hemoaglutinación, la aglutinación, la inmunodifusión y la prueba de Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

El primer intento para determinar el estado de la inmunidad humoral fué hecho por Carne (1940), quien elaboró una prueba diagnóstica similar a la de "Schick" que es una prueba en piel para diagnosticar la infección por Corynebacterium diphtheriae en la cual una pequeña cantidad de la toxina diftérica es inyectada

intradérmicamente. En presencia de anticuerpos circulantes los efectos de la toxina son neutralizados inmediatamente y no hay reacción. Sin la protección de anticuerpos, hay un acúmulo de células rojas e inflamación en el sitio de la inyección durante varios días. Carne inyectó pequeñas dosis de la exotoxina de C. ovis en 100 borregos con LC, pero las reacciones fueron irregulares. Otros trabajos probados fueron, una prueba en piel, la cual fué titulada con pruebas séricas e inyección intradérmica en conejos. La ausencia de necrosis fue un indicativo de la presencia de anticuerpos. Esta prueba tuvo la desventaja de que no pudo ser aplicada en gran escala, pero confirmó la suposición de que se desarrolla una respuesta humoral contra la exotoxina y que una reacción de neutralización de la toxina con una antitoxina puede ser empleada como una prueba diagnóstica (CARNE, 1940; DOTY, 1964).

Utilizando la propiedad de la exotoxina de inhibir la lisis de los glóbulos rojos por la beta-lisina estafilococal, Zaky (1976), desarrolló la prueba de inhibición de la anti-beta-hemólisis (IHA ó IHB). La prueba se realizó incubando una cantidad igual de exotoxina y eritrocitos de un bovino adicionándole la hemolisina estafilococal. En ausencia de anticuerpos la exotoxina del C. ovis ocupó los sitios receptores sobre la membrana de los eritrocitos, inhibiendo los efectos hemolíticos de la beta-lisina. Esta prueba tiene efectos sensitivos y específicos del 92% y 96% respectivamente (BROWN, 1987).

La prueba de inhibición de la hemólisis sinérgica (IHS), se desarrollo en California para diagnosticar la infección en caballos por C. ovis. La prueba se realizó utilizando la acción complementaria de las exotoxinas de C. ovis y C. equi para causar la hemólisis sinérgica. El suero fué diluido e incubado con una cantidad igual de exotoxina de C. ovis y adsorbida en discos de papel filtro, los cuales fueron colocados sobre placas de agar sangre que contenian la exotoxina de C. equi. Las reacciones se interpretaron a las 24 horas, una banda de hemólisis alrededor indicó la ausencia de anticuerpos. En cabras infectadas experimentalmente la prueba dió resultados positivos en todos los animales, los cuales desarrollaron lesiones de LC. En una prueba de campo en la cual se utilizaron animales infectados con C. ovis en forma natural, se encontró una sensibilidad del 98% para cabras y del 96% para borregos. Los títulos fueron positivos tanto en los animales que presentaban la enfermedad clínica como en los animales con enfermedad subclínica, esto indica que esta prueba puede ser utilizada para detectar animales que son portadores sanos (KNIGHT, 1978; BROWN, 1985).

La prueba de ELISA también puede ser utilizada en el diagnóstico de la LC. Se ha reportado una sensibilidad comparable a la prueba IHS. La detección de anticuerpos contra la exotoxina fue de mayor sensibilidad que la detección de anticuerpos contra los componentes de la pared celular y los títulos de antitoxina aparecieron 30-60 días después de la infección experimental. Por

otro lado, Chikamatsu reporta que de 1186 casos de LC, trabajados con esta prueba se detectaron 466 animales como positivos (39.3%) (BROWN, 1987; PEPIN, 1988; CHIKAMATSU, 1989).

La prueba de aglutinación es otra de las pruebas que se ha utilizado para el diagnóstico de la LC. Sin embargo, es importante que el antígeno que se va a utilizar para realizarla reciba un tratamiento previo con Tween 60, por ejemplo, para eliminar la capacidad de autoaglutinación que presenta este microorganismo debido a la composición de su pared celular la cual ya fue mencionada con anterioridad. Esta prueba es semicuantitativa pero, tiene un alto grado de sensibilidad. En esta prueba los anticuerpos establecen uniones cruzadas con los antígenos que se presentan en forma de partículas, lo que hace que se agrupen o aglutinen. Esta aglutinación se logra al mezclar una suspensión de partículas antigénicas, por ejemplo, bacterias con suero. Los anticuerpos se combinan con rapidez con las partículas pero, la aglutinación es un proceso mucho más lento, ya que la adherencia entre las partículas solo se produce cuando se tocan unas con otras. Los anticuerpos IgM son aglutinadores considerablemente más eficaces que los anticuerpos IgG (MORILLA, 1986; TIZARD, 1989).

La prueba de aglutinación puede ser empleada para diagnosticar la infección ocasionada por C. pseudotuberculosis en cabras. De 36 rebaños infectados con esta bacteria y que presentaban le-



siones de LC, se realizaron muestreos utilizando esta prueba, la cual dió como resultados que el 81% de esos rebaños eran positivos (HOLSTAD, 1986).

Los anticuerpos contra C. pseudotuberculosis, pueden ser detectados tempranamente por esta prueba. Los altos niveles de anticuerpos pueden ser detectados a las 2 semanas después de la infección por esta bacteria. La misma prueba demostró que la mayoría de los cabritos en un rebaño infectado con C. pseudotuberculosis poseían anticuerpos contra la LC durante su primer mes de vida y dichos anticuerpos estaban ausentes en los mismos cabritos entre los 3 y 4 meses de edad y reaparecían nuevamente cuando los animales tenían más de dos años de edad (HOLSTAD, 1986; HOLSTAD, 1988).

## O B J E T I V O S

### I Objetivo Principal.

Evaluación de un antisuero para la identificación de Corynebacterium ovis.

### II Objetivos Particulares.

- a) Producción de antisuero específico contra Corynebacterium en conejos.
- b) Titulación del antisuero producido mediante la prueba de aglutinación en tubo.
- c) Realización de la prueba de aglutinación en placa o portaobjeto, entre el antisuero y Corynebacterium ovis.
- d) Detectar reacciones cruzadas entre Corynebacterium ovis y otras bacterias púlgernas tales como: Staphylococcus aureus y Streptococcus Grupo A.

## M A T E R I A L

### a) Para la producción del antisuero:

- \* Cuatro jaulas para conejos.
- \* Cuatro conejos hembras de seis meses de edad.
- \* Alimento concentrado para conejo.
- \* Jeringas desechables de 3 ml. con agujas de calibre 21.
- \* Jeringas "insulinicas" con agujas de calibre 26.
- \* Alcohol.
- \* Algodón.
- \* Frascos de 5 ml. estériles, con tapón de goma.
- \* Etiquetas autoadheribles, de 15 X 20 mm. para la identificación de los frascos.
- \* Marcadores de tinta permanente.
- \* Hojas de rasurar.
- \* Centrifuga.
- \* Refrigerador para almacenar los antisueros.
- \* Bacterina de Corynebacterium ovis, elaborada en el laboratorio de Microbiología de la F.E.S.- Cuautitlán. Dicha bacterina fue elaborada a partir de abscesos recolectados en el rastro de Ferrería de el Distrito Federal. A esta bacterina se le realizaron las siguientes pruebas, para su evaluación:
  - a) Prueba de determinación de pH.

b) Prueba de esterilidad.

c) Prueba de pureza. ( Su concentración fue medida por espectrofotometría, ajustada a 600 nm. de longitud de onda, teniendo un 76% de transmitancia.

d) Prueba de Seguridad.

e) Prueba de Antigenicidad.

(DCAMPO, 1991).

**b) Titulación del antisuero:**

\* Tubos de ensaye con capacidad de 1 ml.

\* Solución Salina Fisiológica (SSF).

\* Pipetas de 1.0 y 5.0 ml.

\* Gradilla.

\* Micropipetas.

\* Palillos de madera.

\* Estufa bacteriológica.

**c) Prueba de aglutinación en portaobjetos:**

\* Antisuero contra C. ovis, obtenido de los conejos inoculados con la bacterina de C. ovis.

\* Antígeno de C. ovis.

\* S S F.

\* Suero normal de conejo.

\* Portaobjetos.

\* Jeringas "insulínicas" desechables.

\* Caja con fuente de iluminación y fondo oscuro.

d) Prueba de detección de reacciones cruzadas:

\* Portaobjetos.

\* Caja con fuente de iluminación y fondo oscuro.

\* Asa de inoculación.

\* S S F.

\* Antígeno de C. ovis.

\* Cepas de Staphylococcus aureus y Streptococcus grupo A que fueron obtenidas del Cepario de la Sección de Microbiología de la F.E.S.- Cuautitlán.

## M E T O D O

(Modificado de Morilla, 1986 y Morales 1991).

### A) Producción del Antisero

Para la elaboración del antisuero se inocularon tres de los conejos con la bacterina de C. ovis. La inoculación de los animales se realizó como se muestra en el cuadro #1. A uno de los cuatro animales no se le inculó la bacterina, quedando como control negativo.

CUADRO #1. Protocolo de inmunización contra C. ovis.

Número de inoculación	1	2	3	4	5
Día de la inoculación	1	15	23	26	29
Dosis de bacterina (ml)	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0
Vía de inoculación	Sc.	IM	Sc.	IM	Sc.
Conejos inoculados	3	3	3	3	3

A cada animal se le extrajo 1.0 ml de sangre semanalmente a partir de la primera semana después de la primera inoculación, incluyendo al control negativo, se le realizaron cinco sangrados en total a cada uno de los animales. De esos sangrados el último se hizo en blanco (extracción de toda la sangre posible).

La sangre extraída se dejó reposar en los frascos de 5 ml

estériles hasta que se formó el coágulo y se separó del suero, este suero fue centrifugado durante 10 minutos a 2, 500 rpm y posteriormente se almacenó en viales estériles en el refrigerador a una temperatura de congelación, previa identificación.

B) Titulación del Antisuero Mediante la Prueba de Aglutinación en Tubo.

Para la titulación de los antisueros se realizó el siguiente procedimiento:

- a) Para cada muestra se utilizaron 12 tubos de ensaye con capacidad de 1 ml, los cuales correspondieron a las diluciones de: 1:2, 1:4, 1:8... 1:4096. (Los resultados se expresaron en logaritmo decimal con las siguientes equivalencias: 1:2 = 0.3, 1:4 = 0.6, 1:8 = 0.9... 1:4096 = 3.6).
- b) Antes de iniciar la prueba se retiró el antisuero y el antígeno del refrigerador y se expusieron a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos.
- c) A cada uno de los tubos se le depositó 0.1 ml de SSF.
- d) Al primer tubo de cada una de las muestras se le adicionó 0.1 ml del antisuero utilizando jeringas "insulinicas".
- e) Después de que se homogenizaron los tubos número 1 de cada una de las muestras, se pasó 0.1 ml del contenido al tubo número 2 utilizando una micropipeta y se agitaron con los palillos de madera.

- f) Una vez que el tubo número 2 fue homogenizado se le extrajo 0.1 ml de su contenido y este se adicionó al tubo número 3. El mismo procedimiento se realizó hasta llegar al tubo número 12 y por último a este tubo se le extrajo la misma cantidad de su contenido (0.1 ml), y se desecho.
- g) Se agrego 0.1 ml de antígeno de C. ovis a cada uno de los tubos.
- h) Los tubos se homogenizaron durante 30 segundos.
- i) Las muestras se incubaron a 37 grados centigrados en una estufa bacteriológica durante 48 horas.
- j) Los resultados fueron interpretados al término de las 48 horas. (VER FIGURA #1).

#### C) Prueba de aglutinación en Portaobjeto.

Para la realización de esta prueba se evaluaron previamente los siguientes controles negativos:

- a) Se colocó una gota de antígeno de C. ovis sobre un portaobjetos y se le adicionó una gota de SSF.
- b) Se colocó una gota de antígeno de C. ovis sobre un portaobjetos y se le adicionó una gota de suero normal de conejo.
- c) Se colocó una gota de antígeno de C. ovis sobre un portaobjetos y a este no se le adicionó nada más.



d) Sobre otro portaobjetos se colocó una gota del antígeno de C. ovis y se le adicionó una gota del antisuero extraído de los conejos inoculados con la bacterina de C. ovis, las gotas se mezclaron con un palillo para homogenizarlas.

Los portaobjetos se colocaron sobre la caja de fondo oscuro y fuente de iluminación para observar los resultados.

#### D) Detección de Reacciones Cruzadas.

a) Esta prueba se realizó utilizando portaobjetos limpios para cada una de las cepas bacterianas que se probaron, en cada uno de ellos se depositó una gota del antisuero extraído de los conejos inoculados con la bacterina de C. ovis.

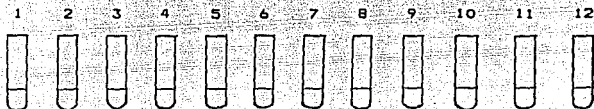
b) Con una asa de inoculación se tomó una colonia de las diferentes cepas bacterianas (C. ovis, Staphylococcus aureus y Streptococcus Grupo A), y se mezclaron con la gota del antisuero que les correspondió.

c) Los resultados se observaron colocando los portaobjetos en la caja de fondo oscuro y fuente de iluminación.

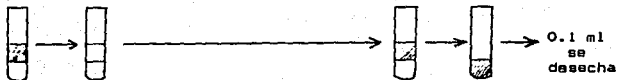
**Figura #1.**

Esquematación de la Prueba Lenta en Tubo para la Titulación de los Antisueños:

1) A cada tubo se le adiciona 0.1 ml. de S.S.F.



2) Se agrega 0.1 ml del antisueño a titular en el primer tubo y se homogeniza. Se toma 0.1 ml del antisueño del tubo anterior y se pasa al siguiente, se homogeniza y se repite el mismo procedimiento en todos los tubos. Se toma 0.1 ml del último tubo y se desecha.



3) A cada tubo se le agrega 0.1 ml de antígeno de C. ovis.

4) Se incuban los tubos a 37°C durante 48 horas.

5) Se hace la lectura de los tubos.



## RESULTADOS

Los resultados de las muestras obtenidas de los animales inoculados con la bacterina de C. ovis se muestran en el cuadro #2 y en las gráficas: #1, #2 y #3.

El título de los anticuerpos fue expresado en logaritmo decimal.

Los resultados muestran un título de 2.1 para los conejos 1 y 2 y un título de 1.8 para el conejo 3, a una semana después de la primera inoculación.

En la segunda semana los títulos alcanzados fueron de 1.8 para los conejos 1 y 2 y de 2.4 para el conejo 3.

Para la tercer semana se habían inoculado 2 veces cada animal y los títulos encontrados en los conejos 2 y 3 fue de 2.7 y para el conejo 1 fue de 3.0.

En la cuarta semana los tres animales tenían cuatro inoculaciones cada uno y sus títulos fueron de 2.1 para el conejo 2, 3.0 para el 3 y de 2.4 para el conejo 1.

En la quinta semana se habían inoculado cinco veces cada uno de los animales y sus títulos fueron de 3.6 para cada uno de los tres animales.

El conejo control (4), dió resultados negativos en esta

prueba, durante todo el experimento.

CUADRO #2. Titulación de los antisueros de los conejos inoculados con la bacterina de G. ovis.

Muestra	Conejo	título											
		0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6
1	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En la prueba de aglutinación en placa o portaobjetos, los controles negativos, (SSF más antígeno de C. ovis suero normal de conejo más antígeno de C. ovis y antígeno de C. ovis sólo), dieron resultados negativos. Sin embargo, el antisuero de C. ovis más el antígeno de C. ovis dio un resultado positivo (cuadro #3).

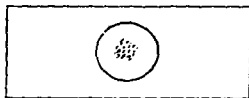
CUADRO #3. Reacción de los controles negativos con el antígeno de C. ovis.

	Controles negativos		
Antígeno de <u>C. ovis</u>	SSF	Suero normal de conejo.	Antisuero de <u>C. ovis</u> .
	-	-	+

La reacción de aglutinación con el antisuero se observó aproximadamente a los cinco minutos para todos los antisueros de los animales inoculados con la bacterina de C. ovis. Dicha reacción se observó como lo muestra la figura #2.

FIGURA #2. Reacción de aglutinación.

A)



Reacción positiva de aglutinación contra el antígeno de C. ovis, utilizando el antisuero.

B)



Reacción negativa de aglutinación contra el antígeno de C. ovis, utilizando suero normal de conejo.

En la prueba de detección de reacciones cruzadas, los antisueros de los conejos inoculados con la bacterina de C. ovis y que fueron puestos en contacto con Staphylococcus aureus y Streptococcus Grupo A, dieron resultados negativos pero, los mismos antisueros puestos en contacto con el antígeno de C. ovis dieron resultados positivos (Cuadro #4).

CUADRO #4. Resultados de la detección de reacciones cruzadas con el antígeno de C. ovis.

Antisero de <u>C. ovis</u>	Antígeno de <u>C. ovis</u>	<u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>	<u>Streptococcus</u> <u>Grupo A.</u>
		+	-

En el presente experimento la reacción de aglutinación pudo ser detectada desde la primer semana después de que se realizó la primera inoculación. Los resultados se muestran en el cuadro #5.

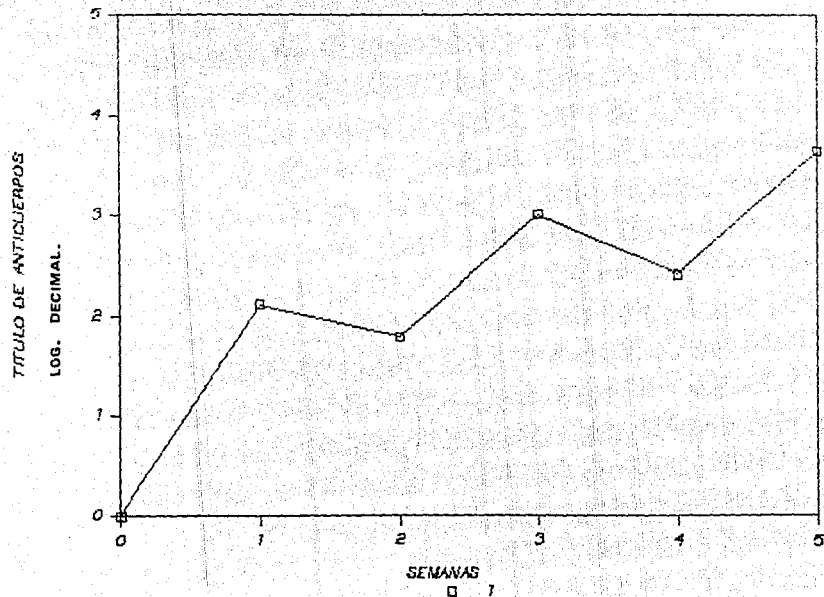
CUADRO #5. Tiempo en que se detecta reacción de aglutinación.

Muestreo	Día de sangrado	Conejo			
		1	2	3	4
1	7	+	+	+	-
2	14	+	+	+	-
3	21	+	+	+	-
4	28	+	+	-	-
5	35	-	+	+	-

Como se puede observar en el cuadro #5 dos de los conejos

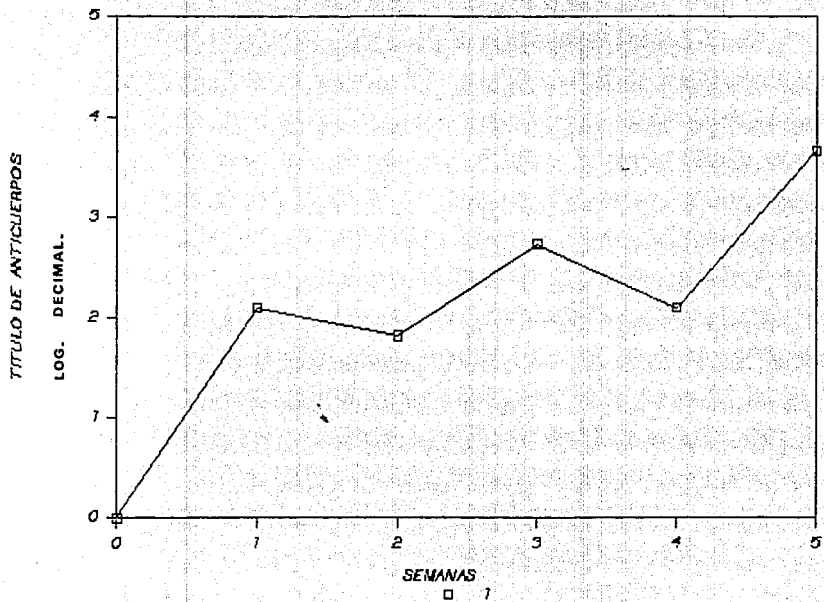
presentaron reacciones negativas; estos fueron el #1 con el quinto sangrado y el #3 con el cuarto sangrado, esto se debió posiblemente a la presencia de hemólisis en los sueros de dichos sangrados.

GRAFICA # 1. TITULO DE ANTICUERPOS

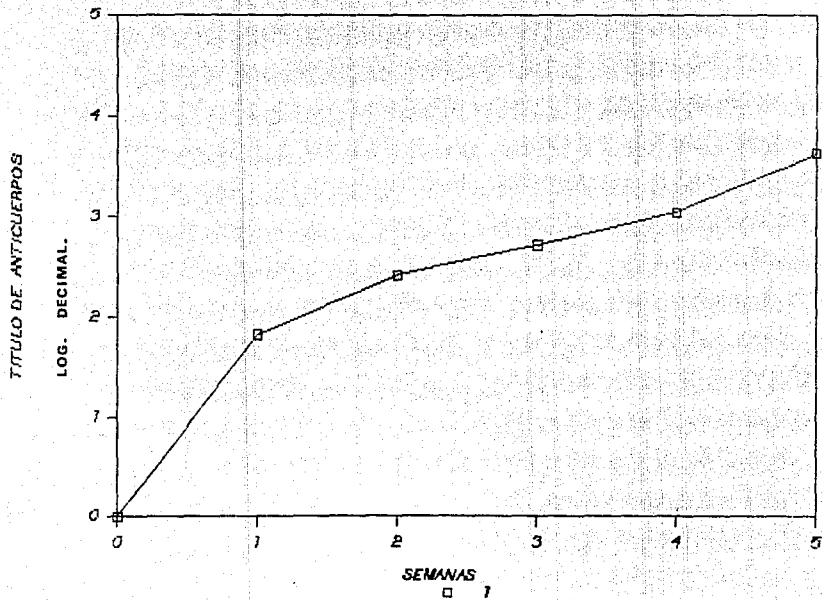




GRAFICA # 2. TITULO DE ANTICUERPOS



GRAFICA # 3. TITULO DE ANTICUERPOS



## D I S C U S I O N

En la prueba de aglutinación se observaron títulos de 2.1 en la primera semana después de la primera inoculación y de 3.6 a la quinta semana, con un total de cinco inoculaciones, aplicadas por vía subcutánea e intramuscular de manera alternada. Esto coincide con trabajos anteriores, (HOLSTAD, 1989), reporta títulos de 0.5 a la primera semana post-inoculación y un título máximo de 4.2 a la 12a. semana, aplicando una bacterina 2 veces a cada animal, con un intervalo de cuatro semanas entre cada inoculación, por vía subcutánea, en cabritos.

Utilizando una bacterina con una concentración de  $3.1 \times 10^4$  UFC / ml (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro) aplicada por vía intravenosa, en corderos, se obtuvieron títulos de 2.4 a la 10a. semana después de la primera inoculación (BROGDEN, 1984).

En el trabajo de Morales (1991), utilizando una bacterina con una concentración de  $3 \times 10^9$  UFC / ml y aplicandola 2 veces, por vía subcutánea en cuyes, se obtuvieron títulos de 3.3 a la tercer semana después de la primera inoculación (MORALES, 1991).

Cabe hacer mención que el antígeno de C. ovis utilizado en el presente trabajo fue un antígeno de un caso de campo pero con un cierto tratamiento para que no autoaglutinara. Cabría en un futuro trabajo emplear un mayor número de cepas de campo sin tratamiento previo para observar la reacción con el antisuero.

No se detectó reacción cruzada con los otros microorganismos piógenicos que se utilizaron en esta prueba, probablemente por las características tan especiales que presenta C. ovis en su pared celular, sería necesario realizar esta prueba con otras bacterias como por ejemplo: Corynebacterium pyogenes (Actinomyces pyogenes), Staphylococcus epidermidis, Pseudomona aeruginosa, Pasteurella haemolytica, E. coli, Moraxella spp. ya que todas estas bacterias han sido aisladas de procesos abscedativos (HARLAND, 1979; SANTAROSA, 1985).

La hemólisis, como observamos en el cuadro #5, interfiere con la reacción de aglutinación, por lo cual se recomienda evitarla en la medida de lo posible.

## CONCLUSIONES

1) Se elaboró un antisuero contra C. ovis con un título máximo alcanzado de 3.6.

2) La reacción de aglutinación en portaobjetos se observa en un tiempo aproximado de cinco minutos, con un antígeno preparado de C. ovis.

3) No se detectó reacción cruzada con Staphylococcus aureus ni con Streptococcus Grupo A.

4) Se recomienda evaluar el antisuero con:

a) Mayor número de cepas de C. ovis de campo.

b) Mayor número de bacterias piógenas aisladas a partir de muestras de campo.

Estas recomendaciones se hacen con el fin de obtener un antisuero con mayor especificidad y sensibilidad para ser utilizado en el diagnóstico de infecciones ocasionadas por C. ovis.

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

- 01) Augustine, J.L.; Renshaw, H.W. (1986): Survival of Corynebacterium pseudotuberculosis in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. Am. J. Vet. Res. 47: 713-715.
- 02) Ayers, J.L. (1977): Caseous Lymphadenitis in goats and sheep: A review of diagnosis, pathogenesis and immunity. Am. J. Vet. Med. Assoc. 171: 1252-1254.
- 03) Blood, D.C.; Henderson, J.A. (1985): Linfadenitis caseosa de los ovinos en: Medicina Veterinaria. 6a edic. Ed. Interamericana. 566-567.
- 04) Brogden, K.A.; Cultlip, R.C.; Lehmkuhl, H.D. (1984): Comparison of protection induced in lambs by Corynebacterium pseudotuberculosis whole cell and cell wall vaccines. Am. J. Vet. Res. 45 : 2393-2395.
- 05) Brown, C.C.; Olander, H.J.; Biberstein, E.L.; Moreno, D. (1985): Serologic response and lesions in goats experimentally infected with Corynebacterium pseudotuberculosis of caprine and equine origins. Am. J. Vet. Res. 46: 2322-2326.
- 06) Brown, C.C.; Olander, H. J. (1987): Caseous Lymphadenitis of goat and sheep: A review. Bull. Vet. 57: 1-12.

- 07) Burrell, D. H. (1978): Experimental induction of Caseous Lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of Corynebacterium ovis. Res. Vet. Sci. 24: 269-276.
- 08) Burrell, D. H. (1980): A haemolysis inhibition test for detection of antibody to Corynebacterium ovis exotoxin. Res. Vet. Sci. 28: 190-194.
- 09) Cameron, M.C.; Smith, C.M. (1970): Relationship of Corynebacterium pseudotuberculosis protoplasmatic toxins to the exotoxin. Onfers J. Vet. Res. 37: 97-104.
- 10) Cárdenas, A.L.; Maki, L.R. (1986): Detection of antibody in rams with contagious epididimitis, using the enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 47: 738-739.
- 11) Carne, H. R. (1940): The toxin of Corynebacterium ovis. J. Pathol. 51: 197-212.
- 12) Carne, H. R.; Onon, E.O. (1978): Action of Corynebacterium ovis exotoxin on endothelial cells of blood vessels. Nature. 271: 246-248.
- 13) Carter, G.R.; (1985): Bacteriología y Micología Veterinaria: Aspectos esenciales. 1a. edic. Ed. Manual Moderno. 127-130.
- 14) Chikamatsu, S.; Zhao, H.K.; Kikuchi, N.; Hiramune, T. (1989): Seroepidemiological survey of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep in Japan using Enzyme-linked

immunosorvent Assay and immunodiffusion. Jpn. J. Vet. Sci. 51: 887-891.

- 15) Doty, R. B.; Dunne, H. W.; Hokanson, J.F.; Reid, J.J. (1964): A comparisson of toxins produced by various isolates of Corynebacterium pseudotuberculosis and the development of a diagnostic skin test for caseous lymphadenitis of sheep and goats. Am. J. Vet. Res. 25: 1679-1685.
- 16) Ellis, A.J. (1983): Ovine caseous lymphadenitis. The compendium of continuing education (Article #10). 5: 504-510.
- 17) Garcia, V. S. (1980): Aislamiento y caracterización de corinebacterias de muestras de ovinos y caprinos en México. Tesis de Licenciatura. ENEP-CUAUTITLAN, UNAM.
- 18) Holstad, G. (1986): Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats I. Evaluation of two serological diagnostic test. Acta Vet. Scand. 27: 575-583.
- 19) Holstad, G.; Teige, J. (1988): Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats VII. Clinical, pathological, serological and hematological changes after subcutaneous inoculation of the organism. Acta Vet. Scand. 29: 287-294.
- 20) Holstad, G.; Teige, J.; Jorgen, L.H. (1989): Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats VIII. The effect of



Vaccination against Experimental Infection. Acta Vet. Scand.  
30: 275-283.

- 21) Hsu, T.Y.; Renshaw, H.W.; Livingstone, C.W.; Augustine, J.L.; Zink, D.L.; Gauer, B.B. (1985): Corynebacterium pseudotuberculosis exotoxin: fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. Am. J. Vet. Res. 46: 1206-1211.
- 22) Jawetz, E.; Melnick, J. L. (1983): Corinebacterias en: Microbiologia Médica. 10a. edic. Ed. Manual Moderno. 217-220.
- 23) Jolly, R.D. (1965): The pathogenic action of the exotoxin of Corynebacterium ovis. J. Comp. Pathol. 75: 417-431.
- 24) Jubb, F.K.V.; Kennedy, C.P. (1982): Patología de los animales domésticos. Tomo I. 1a. Edic. Ed. U.P.O.M.E. 440-442.
- 25) Knight, H.D. (1978): A serologic method for the detection of Corynebacterium pseudotuberculosis infections in horses. Cor. Vet. 68: 220-237.
- 26) Kuria, J.N.K.; Holstad, G. (1989): A seroepidemiological investigation of Corynebacterium pseudotuberculosis infection - in sheep flocks in Southern Norway. Acta Vet. Scand. 30: 107-108.
- 27) Lovell, R.; Zaki, M.M. (1966): Studies on growth products of

Corynebacterium ovis. Res. Vet. Sci. Z: 302-306.

- 28) Merck, (1981): Linfadenitis caseosa en: Manual Merck de Veterinaria. 2a. edic. Ed. Merck and Co. 283-285.
- 29) Morales, E.A. (1991): Evaluación de una bacterina de Corynebacterium pseudotuberculosis en cuyes. Tesis de licenciatura F.E.S.-CUAUTITLAN-UNAM.
- 30) Morilla, G.A.; Bautista, G.C. (1986): Manual de Inmunología. Ed. Diana. 195-199.
- 31) Muckle, C.A.; Gyles, C.L. (1982): Characterization of strains of Corynebacterium pseudotuberculosis. Can. J. Comp. Med. 46: 206-208.
- 32) Muckle, C. A.; Gyles, C.L. (1984): Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of Corynebacterium pseudotuberculosis in mice. Am. J. Vet. Res. 44: 1149-1153.
- 33) Navarrete, G.S.M. (1988): Obtención de toxina a partir del aislamiento de Corynebacterium ovis. Tesis de Licenciatura, F.E.S.-CUAUTITLAN-UNAM.
- 34) Pèpin, M.; Pardon, P; Marly, J.; Lantier, F. (1988): Corynebacterium pseudotuberculosis infection in adult ewes by inoculation in the external ear. Am. J. Vet. 49: 459-463.
- 35) Pérez, M. J. (1988): Principios químico biológicos de Bacteriología. memorias de Educación Continua de la UNAM.

160-166.

- 36) Redondo, E.; Roncero, V.; Durán, E.; Molano, M. C. (1988): Consideraciones sobre la pseudotuberculosis ovina. Acta Med. Vet. 34: 191-198.
- 37) Renshaw, W.H.; Graff, P.V.; Gates, L.M. (1979): Visceral caseous lymphadenitis in a thin ewe syndrome. Isolation of - Corynebacterium, Staphylococcus, and Moraxella spp. from internal abscess in emaciated ewes. Am. J. Vet. Res. 40: 1110-1114.
- 38) Santarosa, J.; Johnson, E.H. (1989): A retrospective study of hepatic abscesses in goats pathological and microbiological findings. Br. Vet. J. 145: 73-76.
- 39) Smith, H. A.; Jones, T.C. (1985): Linfadenitis caseosa en: Patología Veterinaria. 1a. edic. Ed. Uteha. 424-425.
- 40) Sutherland, S.S.; Speijers, E. J.; Andres, B. (1989): Comparison of the exotoxin of four strains of Corynebacterium pseudotuberculosis. Res. Vet. Sci. 47: 190-194.
- 41) Tizard, I. R. (1989): Inmunología Veterinaria. 3a. edic. Ed. Interamericana. 149-152.
- 42) Zaki, M.M. (1976): Relation between the toxigenicity and pyogenicity of Corynebacterium ovis in experimentally infected mice. Res. Vet. Sci. 20: 197- 200.