

69  
203



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



**PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMOLISIS  
PARA DIAGNOSTICO DE LINFADENITIS  
CASEOSA.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:  
**MIGUEL ANGEL PEREZ MOSQUEDA.**

Director de Tesis:  
MVZ. SUSANA E. GARCIA VAZQUEZ

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1993.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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.....	2
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y METODO.....	19
RESULTADOS Y DISCUSION.....	22
CONCLUSIONES.....	27
BIBLIOGRAFIA.....	28

## RESUMEN

La linfadenitis Caseosa ( L C ) se podría encuadrar dentro del grupo de enfermedades poco diagnosticadas. Generalmente se trata de un proceso de bajos índices de mortalidad y clínicamente evoluciona asintóticamente; sin embargo es de vital importancia, relacionándose con la reglamentación técnico-sanitaria del comercio de canales y se debe considerar que el 90% de los diagnósticos de ésta enfermedad corresponden a hallazgos post mortem.

Hasta el momento no existen pruebas serológicas confiables para el diagnóstico y control de la L C. Por lo que el presente trabajo se encaminó a la realización de la prueba de inhibición de la hemólisis para establecer un método serodiagnóstico fácil de realizar que permita la identificación in vivo de animales infectados con ésta enfermedad tan común en el país. Para su realización se utilizaron 118 sueros de ovinos de raza indefinida obtenidos del rastro de Ferrería sin tomar en consideración sexo y edad.

Los resultados más altos obtenidos en la realización de la prueba, fueron en la dilución 1:8192 con un 35.6% y en la dilución 1:32 con un 15.25%. Se detectaron resultados seropositivos desde la dilución 1:8, como ha sido ya reportado por otros investigadores.

Se concluye que la prueba de inhibición de la hemólisis es sensible, económica, de fácil realización y puede ser promisoría para el diagnóstico de la enfermedad.

## INTRODUCCION

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

De acuerdo a la información obtenida del libro de registros de matanza y decomiso del rastro frigorífico de Ferrería, en el periodo de julio a septiembre de 1991 la matanza registrada fue de 68,310 ovinos y caprinos con un total de 29,212 kilogramos de decomiso y de estos, 16,901 kilogramos decomisados fueron debido a la linfadenitis caseosa (L C), es decir 57.86% corresponde a esta enfermedad. (Libro de registro de matanza y decomiso de Ferrería, 1991).

La L C, es una enfermedad de curso crónico producida por el Corynebacterium pseudotuberculosis (C. ovis) que se caracteriza por la presencia de abscesos en los nódulos linfáticos periféricos especialmente el parotídeo, el preescapular y el prefemoral, ocasionalmente la enfermedad llega a ser generalizada y la formación de abscesos ocurre en varios órganos incluyendo los nódulos linfáticos internos, pulmón, hígado, riñón, cerebro, cordón espinal, bazo, tejido subcutáneo y corazón. Es un problema de dimensiones significativas que causa pérdidas económicas considerables a la industria ovina y caprina (Rensshaw, 1979; Hamir, 1991; Holstad y col.,

1989).

La enfermedad tiene una evolución subclínica y lenta, los animales se muestran afebriles con buen apetito y los signos clínicos sugestivos de cualquier enfermedad específica pasan inadvertidos, sólo se advierte tumefacción de los ganglios linfáticos superficiales que desprenden pus amarillo verdoso al abrirlos. La caquexia y disminución de la producción predispone a sospechar la presencia de abscesos en los ganglios linfáticos internos como son los pulmonares y mediastínicos dando un cuadro clínico de disnea y trastornos digestivos (Hiepe, 1972; Cuéllar y col., 1986; Navarrete 1988).

Al penetrar C. pseudotuberculosis se comporta como un parásito intracelular facultativo, los factores que contribuyen a que pueda sobrevivir en el hospedero y producir lesiones son: una exotoxina que aumenta la permeabilidad vascular, un factor piogénico que atrae a los leucocitos y una gran cantidad de lípidos superficiales tóxicos para los fagocitos (Hagan y Bruner, 1983; Holstad y col., 1989).

La exotoxina de la C. pseudotuberculosis es una fosfolipasa "D" que afecta a la esfingomielina de los eritrocitos y las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Los lípidos permiten al microorganismo sobrevivir sin ser dañado en los fagolisosomas de las células fagocíticas del hospedero y producir abscesos en el ganglio linfático regional o ser transportados a otro lugar (Hsu, 1985).

Se ha mostrado que la eliminación de los lípidos y la extracción sucesiva con acetona, éter y alcohol no reproduce la actividad piogénica de

los organismos. también se demostró que la eliminación de los lípidos no afecta la viabilidad de la bacteria. El lípido es una sustancia serosa y es tóxica para cuyes, esta contiene ácido corinomicólico que es similar a la cera "D" de las micobacterias (Cameron, 1970; Hsu, 1985; Holstad y col., 1989).

En algunos países la prevalencia estimada para la L C es alta, en 5 regiones del oeste de E.U. el 42% de 4,089 borregos seleccionados y el 53.7% de 4,574 ovejas adultas son sacrificadas en los rastros debido a esta enfermedad. En Francia la L C, es incluida en el síndrome de la enfermedad de los abscesos que reconoce dos causas principales: C. pseudotuberculosis y Staphylococcus aureus subespecie anaerobius (Pepin, 1989).

En un estudio serológico para detectar anticuerpos contra C. pseudotuberculosis en animales de 14 rebaños positivos y en un rebaño formado con animales de diferentes rebaños, todos los sueros fueron evaluados con pruebas de aglutinación bacterial (BAT), y la prueba de inhibición de la hemólisis (HIT). La proporción de animales que son seropositivos en ambas pruebas decreció a cero en animales de 4 meses de edad; en la edad de 11 a 12 meses la proporción de animales seropositivos fue de casi el 50% en BAT y del 30% en HIT. A la edad de 8 meses la prevalencia de animales con protuberancias superficiales fue de 7%, en la edad de un año el 29% de los animales examinados tiene semejantes lesiones. En el rebaño establecido con animales de diferentes rebaños sólo unos pocos de los de un año de edad son seropositivos. Los valores de los títulos de BAT e HIT incrementó en los de 6 años de edad. Los valores de los títulos de anticuerpos son significati-

vamente bajos en los de un año de edad que en animales mayores en ambas pruebas (Holstad, 1986b; Navarrete, 1988).

Existen pocos reportes en lo que concierne a la transferencia calostrál de anticuerpos contra C. pseudotuberculosis de madres a hijos. Burrell (1981) citado por Lund, examinó 23 cabritos de un hato comprendido de 64 cabras adultas. Diez cabritos fueron seropositivos en la prueba de inhibición de la hemólisis. Todos estos cabritos fueron menores de 3 semanas de edad excepto uno y sus madres seropositivas. Sólo 2 cabritos desarrollaron L C clínica cerca de los 6 meses de edad. Otro estudio realizado por Burrell (1980) examinó el suero normal de corderos mamones infectados naturalmente y se encontraron anticuerpos contra la toxina de C. pseudotuberculosis en sueros de 6 corderos. la antitoxina en suero simple de cabritos y corderos nacidos de madres seropositivas indican transferencia calostrál un poco después de la infección postparto (Lund, 1982).

La enfermedad es difícil de erradicar una vez que ha llegado a ser enzoótica debido a las dificultades en el control de la enfermedad, muchos estudios se han encaminado a la obtención de vacunas, bacterinas y toxoides para dar protección a los pequeños rumiantes contra esta enfermedad (Holstad y col., 1989).

En un estudio se evaluó la eficacia de una exotoxina formalinizada de C. pseudotuberculosis en cabras en donde 2 grupos de machos caprinos de 9 semanas de edad (5 animales por grupo) fueron inmunizados subcutáneamente con exotoxina formalinizada con adyuvante incompleto de

Freud. A cada animal se le dio 2 inmunizaciones. Al grupo uno se le inoculó 0.5 ml. de toxoide y al grupo 2 se le inoculó 1 ml. de toxoide y a los 30 días se les dió la segunda inmunización en donde los animales inmunizados y los 5 no inmunizados de 12 semanas de edad (control) fueron inoculados intradérmicamente (desafío - exposición) con C. pseudotuberculosis vivo. A la necropsia 5 de los 10 animales inmunizados no presentaban lesiones de LC, 3 presentaban abscesos limitados en el sitio de inoculación y 2 presentaban lesiones con diseminación bacterial. De los 5 controles no inmunizados 4 tenían abscesos diseminados y uno presentaba un absceso individual en un nódulo interno. Serológicamente 9 de 10 inmunizados desarrollaron títulos de anticuerpos positivos (1:8) contra la exotoxina una semana después de la inoculación, mientras que los animales controles requieren 3 semanas para desarrollar una respuesta de anticuerpos positivos. Por lo tanto durante una infección con C. pseudotuberculosis los anticuerpos contra la exotoxina pueden proteger a un animal de la diseminación del microorganismo (Brown, 1986).

En otro estudio realizado en México se inocularon cuyes con una bacterina de C. pseudotuberculosis con hidróxido de aluminio estandarizada a  $3 \times 10^9$  bacterias/ml. Los cuyes se dividieron en 3 grupos de 10 animales. Al grupo 1 se le inoculó la bacterina sin diluir 1:1; al grupo 2 se le inoculó la bacterina diluida 1:10 y al grupo 3 se le administró agua destilada y fue el grupo testigo. Todos los animales recibieron 1 ml. por vía subcutánea el día cero y el día 21 post-inoculación se repitió el procedimiento.

La bacterina se evaluó mediante una prueba de intradermo-reacción y pruebas de aglutinación lenta en tubo e inhibición de la hemólisis. Las pruebas de intradermo-reacción se efectuaron con toxina cruda y antígeno del cuerpo celular a los 25 días post-inoculación. Los animales del grupo 1 resultaron protegidos contra los efectos dermonecróticos y letales de la toxina y contra los efectos del antígeno del cuerpo celular. El grupo 2 no se protegió contra los efectos dermonecróticos observándose un promedio de 3.4 mm. de necrosis aunque si hubo una protección de los efectos letales en un 90%. En el grupo testigo se observaron reacciones en la piel más severas con una mortalidad de 40%. El grupo 1 fue el que mostró mayores títulos de anticuerpos tanto en la prueba de aglutinación lenta en tubo como en la prueba de inhibición de la hemólisis (Morales, 1991).

La eficacia de una bacterina de C. pseudotuberculosis para proteger borregos contra el desarrollo de L C, fue evaluada en experimentos controlados de desafío-exposición y en donde los resultados indican que la bacterina provee una protección inmunológica de corderos contra el desafío con C. pseudotuberculosis ya que los signos sistémicos de la actividad de la exotoxina (ictericia, hemoglobinuria o muerte) no se desarrollan en estos (Lea Master, 1987).

Cameron (1972) citado por Holstad encontró que vacunas inactivadas no protegen contra el desarrollo de abscesos después de la inoculación intravenosa de organismos bacterianos y sugieren el uso de vacuna viva contra la L C. De cualquier modo las vacunas inactivadas han muestra-

do tener un cierto efecto protector contra la infección subcutánea o intradérmica en borregos y cabras. También se observa que el desarrollo de lesiones caseosas en los nódulos linfáticos en cabras seguido de la inoculación subcutánea con C. pseudotuberculosis puede ser reducido por una vacuna inactivada conteniendo organismos enteros y toxina cruda (Holstad y col., 1989).

La inoculación intravenosa de C. pseudotuberculosis vivo, sobrenadante de cultivo, exotoxina purificada cromatográficamente en pequeños ruminantes gnotobióticos, causa la muerte de éstos dentro de 48 horas. Los cambios observados en los animales vivos 2 horas después de la inoculación son: anemia hemolítica severa y hemoglobinuria, fluido rojo oscuro en cavidades corporales, edema pulmonar e ictericia. Los preparados de exotoxina cruda causan un síndrome de choque agudo en 2 corderos que murieron a los 15 minutos después de la inoculación. La evidencia histopatológica indica que la exotoxina causa cambio necrótico en los túbulos proximales de los riñones. La inoculación con organismo vivo causa un foco múltiple de inflamación supurativa en músculo esquelético y tejido adiposo adyacente, mientras que tales cambios no se observan en animales que se les administró preparación de exotoxina de C. pseudotuberculosis. Aunque ésta induce una anemia hemolítica en animales experimentales, ésta no conduce a una lisis de eritrocitos in vitro de ovino, caprino o bovino a menos que estos hayan sido sensibilizados con filtrados de Rhodococcus equi (Corynebacterium equi).

Además otro estudio histopatológico de 50 carneros con epididimitis y un granuloma espermático apoyados con estudios bacteriológicos revelaron que el C. pseudotuberculosis fue aislado de tejido testicular (Hsu, 1985; Cardenas , 1986).

Hamir (1981) encontró que el corazón de un borrego adulto con una buena condición nutricional, en la aurícula del atrio derecho mostró un agrandamiento circular firme aproximadamente de 3 centímetros de diámetro. Sobre una sección cortada la lesión encontrada fue un absceso conteniendo material caseoso verde-amarillo dispuesto en laminaciones concéntricas. El absceso se encapsuló dentro de la pared del atrium. En apariencia fue la causa marcada del estrechamiento de el lumen atrial pero como no fueron notadas otras anomalías cardíacas se concluyó que la lesión no causaba ninguna obstrucción significativa a la circulación sanguínea. El examen microscópico confirmó que el absceso fue dentro del miocardio atrial y reveló la lesión característica de L. C. A la bacteriología del material purulento se observó crecimiento masivo de C. pseudotuberculosis sobre el cultivo aeróbico y anaeróbico.

Diversos casos de infección en humanos han sido notificados relacionados como ocupacionales, ocurriendo en pastores y tablajeros. Un caso surgido en un habitante urbano después de la ingestión de leche cruda de cabra desarrolló un absceso en el nódulo linfático cervical. Otro fue una infección del tracto respiratorio en un estudiante de veterinaria posiblemente después del contacto con el organismo en un laboratorio de bacte-

riología, en donde la enfermedad tomó forma de neumonía eosinofílica que respondió a la eritromicina. Otro caso de infección por C. pseudotuberculosis en el hombre presentó un cuadro clínico consistente en fatiga, dolores musculares, sensibilidad y aumento del volumen del hígado y linfadenopatía localizada. Se estableció una identificación bacteriológica concluyente del microorganismo en muestras obtenidas de la aspiración de ganglios linfáticos y de la extirpación quirúrgica de los propios ganglios afectados. El examen de dicho ganglio reveló un proceso patológico manifestado por áreas focales de inflamación crónica. Había nidos de células epiteloides rodeadas por reacción fibroblástica y linfadenitis esclerosante crónica. Más recientemente se ha informado de casos esporádicos en Austria. La cirugía fue curativa en todos los casos de linfadenitis (Brown y Olander, 1987; Hagan y Bruner, 1983).

La inmunidad aparece como un complejo y esto es atribuido a mecanismos de células T (inmunidad celular) y células B (inmunidad humoral). Esto es debido aparentemente a 2 factores: la pared celular lipídica y la exotoxina que juegan un papel esencial en el desarrollo de las lesiones. Los lípidos permiten al microorganismo resistir la digestión por enzimas celulares y persistir como un parásito intracelular facultativo aún con macrófagos activados. Esto ha sugerido que la pared celular lipídica es el factor implicado en la formación de abscesos mientras que la exotoxina es la responsable en la diseminación de el organismo (Holstad y col., 1989).

El C. pseudotuberculosis y el Mycobacterium spp tienen muchas

similitudes en la estructura de la pared celular y ambas persisten como parásitos intracelulares facultativos, la inmunidad celular es parte importante de la respuesta inmune para ambas. La prueba de la tuberculina y johnina pueden dar reacciones cruzadas no especificadas en borregos y cabras infectadas natural y artificialmente con C. pseudotuberculosis. Esto probablemente es debido a las porciones de algunos antígenos de la pared celular. En un estudio realizado en 2 rebaños de cabras, uno infectado con C. pseudotuberculosis y uno libre de la infección, los animales fueron vacunados subcutáneamente en el hombro contra la paratuberculosis y 32 de 40 (55%) y 31 de 45 (69%) cabras presentaron lesiones en los animales infectados respectivamente y se concluye que la mayor parte de las inflamaciones sobre el hombro de las cabras son granulomas resultantes de la vacunación contra la paratuberculosis (Brown y Olander, 1987; Holstad, 1986 c).

Jolly (1966) citado por Cameron ha demostrado que la presencia de lípidos está asociado con la virulencia y habilidad del C. pseudotuberculosis de resistir la acción lítica de los macrófagos además de que juegan un papel muy importante en la patogénesis de la infección. Otro estudio realizado por Cameron (1964) establece que las células bacterianas cuyo lípido a sido eliminado con formalina retiene la habilidad de producir abscesos estériles en cuyes cuando se inyectan en cantidades suficientes. Opuestamente las células bacterianas que son muertas con fenol pierden la habilidad para causar abscesos subcutáneos (Cameron, 1970).

Se piensa que la exotoxina induce un filtración marcada de plasma

de los pequeños vasos sanguíneos por acción directa de la esfingomielina en el revestimiento interno de las células endoteliales. Sin embargo, los signos clínicos de hipoxia y hemoglobinuria son sugestivos de la acción de la exotoxina sobre los eritrocitos (brogden, 1990.)

Las pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico de esta enfermedad se basan en la detección de anticuerpos contra la exotoxina de C. pseudotuberculosis e incluyen: inhibición de la antihemolisina, prueba de protección al ratón, hemaglutinación indirecta, prueba de inhibición de la hemólisis e inmunodifusión (Sutherland, 1987).

El estudio de las actividades hemolíticas y hemaglutinantes de la exotoxina de C. pseudotuberculosis tiene delineado el desarrollo de cuatro tipos de pruebas de diagnóstico que son: Prueba de inhibición de la hemólisis, prueba de inhibición de la hemaglutinación directa, prueba de inhibición de la aglutinación directa con eritrocitos lisados y prueba de inhibición de la hemólisis en gel (Burrell, 1980 a).

Shigidi (1978) reportó que animales con títulos de 1:16 o mayor son considerados positivos a la prueba de hemaglutinación indirecta (IHA). Se examinaron sueros provenientes de casos de L C, por la prueba de IHA y la prueba de inhibición de la antihemolisina (AHI) y se demostró que la prueba de IHA fue más sensible que la prueba de AHI aunque la evaluación de ambas pruebas para el serodiagnóstico de L C, demostró que ninguna fue 100% segura, debido a que dan un alto porcentaje de falsos positivos. Por otra parte, los resultados positivos en ambas pruebas con borregos

aparentemente normales pueden ser causa de la inmunidad residual de una infección previa.

La aglutinación y la hemólisis pueden ser inhibidas por la antitoxina y pueden ser el prelude para el uso de esta actividad como indicador en ensayos de diagnóstico (Burrell, 1980 b).

Se han hecho trabajos con una prueba de piel en la cual la exotoxina fue titulada con suero a probar e inyectada intradérmicamente en conejos. La ausencia de necrosis fue indicativo de la presencia de anticuerpos; esta prueba tiene desventajas en la aplicación a larga escala pero confirma la sospecha que se ha desarrollado una respuesta humoral a la exotoxina y que una reacción de neutralización antitoxina-toxina, puede ser empleada en un esquema de diagnóstico (Brown, 1987).

Se ha probado la eficacia de un alérgeno llamado "Lymphadenin" que se ha evaluado en cuyes previamente sensibilizados, inyectándolos con 0.1 ml intradérmicamente con diluciones de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 del alérgeno en cada animal. Después de 24 horas las reacciones alérgicas locales aparecen como áreas circulares eritematosas con un diámetro de 15.7, 13.3, 9.9 y 7.9 mm respectivamente. Los cuyes no sensibilizados usados como control no desarrollaron ninguna reacción. La inyección intradérmica de 0.1 ml de "Lymphadenin" estandarizada en la región del hombro de 40 cabras clínicamente afectadas con linfadenitis dan reacciones alérgicas elevadas que alcanzan su máximo a las 48 horas después de su aplicación. El incremento en el grosor de la piel en el sitio de inyección varía de 1.6 a 12.2 mm con un

rango promedio de 6.04 +- 2.87 mm. En 40 cabras sanas de un rebaño libre de linfadenitis el rango del incremento en el grosor de la piel fue entre 0.0 y 1.5 mm con un promedio de 0.57 +- 0.4 mm (Langenegger, 1986).

Burrell (1980 b) mostró el criterio de la actividad dermonecrótica de la exotoxina de C. pseudotuberculosis en donde se inyectó intradérmicamente un volumen de 0.1 ml de la exotoxina en conejos y el criterio tomado de la actividad dermonecrótica fue el desarrollo después de 48 horas de una placa dérmica palpable con inflamación central con exudado pustular.

Shigidi (1979) realizó la comparación de 5 pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección experimental de C. pseudotuberculosis en donde se demostró que ninguna de esas pruebas es 100% confiable. La prueba de aglutinación con tubo (AT) fue de valor entre 3 y 18 semanas después de la infección. Los anticuerpos no son detectados por la prueba de fijación del complemento (FC) después de 8 semanas de la infección y con la prueba de difusión en gel (DG) ocurren reacciones no específicas. La prueba de inhibición de la antihemolisina (AHI) fracasó en detectar antitoxina en una proporción alta de borregos infectados que son positivos a C. pseudotuberculosis. La prueba de hemaglutinación indirecta (IHA) fue más confiable y los niveles de antitoxina diagnosticada persisten por largos periodos más que los anticuerpos de otras pruebas. En conclusión la prueba de IHA tiene ventajas sobre las otras pruebas para el diagnóstico serológico de la infección por C. pseudotuberculosis en borregos.

La prueba de inmunodifusión doble en gel provee una economía

extrema además de que se pueden efectuar 16 pruebas en cada caja de petri y los resultados pueden ser obtenidos en un lapso de 24 horas. Los resultados positivos obtenidos con suero de casos confirmados de L C, en ovinos y caprinos y los resultados negativos de sueros de animales libres de L C, demostraron la confiabilidad de la prueba (Burrell, 1980 c).

Abdel Hamid (1975) reporta una prueba de protección en ratón (MP) que fue considerada de valor para detección de L C especialmente cuando hay lesiones externas. Esta prueba depende de la neutralización de dosis mínima letales (DML) de la toxina de C. pseudotuberculosis por anticuerpos específicos presentes en un mililitro de suero de ovejas infectadas. Esta prueba es segura pero costosa (García y Ciprian, 1985).

Más recientemente se ha reportado la prueba de ELISA para hacer una evaluación comparativa de la medición de anticuerpos contra la pared celular (C - ELISA) y la toxina (T - ELISA) de C. pseudotuberculosis en infección natural e infección experimental en borregos bajo condiciones de campo. En donde borregos infectados naturalmente con C. pseudotuberculosis, la sensibilidad y la especificidad de la C - ELISA fue de 76 y 73 % respectivamente. Para borregos sacrificados un año después de la infección artificial la sensibilidad de las pruebas fue de > 83 % y la especificidad > 72 %. Para borregos sacrificados cuatro meses después de la infección artificial la especificidad de ambas pruebas fue < 30% donde el promedio de sensibilidad fue de 85%. La C - ELISA en conjunción con la T - ELISA detectó el 92% de los borregos con lesiones pulmonares (Sutherland, 1987).

En estudios siguientes con el procedimiento de ELISA mostró que borregos con unas cuantas lesiones pequeñas de L C, dan resultados relativos. En los borregos falsos negativos no tiene probablemente suficiente estimulación antigénica para producir anticuerpos detectables a los antígenos de la toxina o a la pared celular de la bacteria (Ellis, 1987).

La prueba sinérgica de inhibición de la hemólisis (SHI) es un ensayo serológico fácil de realizar y económico que detecta anticuerpos contra la exotoxina de C. pseudotuberculosis en caballos pero fue aplicada en cabras. En ensayos preliminares esta prueba tiene un alto nivel de sensibilidad y especificidad para detectar L C, un título de 1:4 o más fue interpretada como una respuesta seropositiva (Brown, 1985).

Holstad (1986 a) indica que la prueba de aglutinación bacterial (BAT) y la prueba de inhibición de la hemólisis (HIT) pueden ser usadas para investigaciones seroepidemiológicas de C. pseudotuberculosis en infecciones de cabras, además de que ambas pruebas son sencillas de realizar. En un estudio realizado con suero de 25 cabras adultas infectadas con C. pseudotuberculosis el título positivo de BAT fue estipulado como  $> 2.1$  y en HIT como  $> 0.6$ . La sensibilidad y la especificidad fue de 0.96 en ambas pruebas en donde 23 de las 25 cabras infectadas con C. pseudotuberculosis son positivas en ambas pruebas. Los títulos de anticuerpos son expresados como  $\text{Log}^{10}$  al valor recíproco de la dilución de suero positivo más alto en ambas pruebas. El valor inicial escogido en el presente estudio da un falso positivo (4%) y un falso negativo (4%) en cada prueba (Holstad,

1986 a; Kuria, 1989).

La prueba de inhibición de la hemólisis es también una prueba fácil de realizar y mide la habilidad del suero inmune para inhibir la actividad hemolítica de la exotoxina de C. pseudotuberculosis, esta prueba es adecuada para estudios sobre inmunidad perinatal y los resultados obtenidos sugieren una transferencia calostrual de antitoxina. La prueba solo implica la incubación del sobrenadante de cultivo de C. pseudotuberculosis y suero, seguido de la adición de eritrocitos de borrego (Burrell, 1980 a).

## **OBJETIVOS**

**Objetivo general:** Realización de la prueba de inhibición de la hemólisis, empleando sueros de ovino sacrificados en el rastro de Ferrería para determinar la eficiencia de esta prueba en el diagnóstico de la linfadenitis caseosa en México.

### **Objetivos particulares:**

- 1) Montaje de la prueba.**
  - 1.1: obtención de la toxina.**
  - 1.2: Obtención de glóbulos rojos de ovino.**
  - 1.3: Realización de la prueba.**
  - 1.4: Control positivo (+).**
  - 1.5: Control negativo (-).**
- 2) Obtención de muestras del rastro de Ferrería.**
- 3) Obtención de títulos de inhibición de la hemólisis de las muestras del rastro de Ferrería.**

## MATERIAL Y METODO.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de microbiología de la FES-C, UNAM, ubicado en el perímetro urbano de Cuautitlán de Romero Rubio.

Se utilizaron 118 sueros de ovinos de raza indefinida obtenidos del rastro de Ferrería, estos se escogieron al azar sin tomar en cuenta edad y sexo. El muestreo se realizó al momento del sacrificio de los animales y transportados inmediatamente al laboratorio de microbiología en donde se mantuvieron en refrigeración y posteriormente a las 24 horas se obtuvo el suero de las muestras.

La obtención de la toxina se elaboró según cita Hsu (1985) en donde teniendo el cultivo puro e identificado de C. pseudotuberculosis se tomó una asada de colonias y se inoculó en 100 ml de caldo BHI (infusión cerebro-corazón) contenidos en un matraz de 250 ml el cual se incubó 48 horas a 37° C. La suspensión desarrollada en el caldo se colocó en un matraz conteniendo 4 litros de medio hidrolizado de lactoalbúmina (HLA). A continuación el matraz se colocó en un agitador orbital y se incubó a 37° C durante 48 horas con una agitación constante de 130 rpm para evitar la formación de una película de conglomerados bacterianos ya que el microorganismo en medios artificiales es muy propenso a formar aglutinaciones o escamas suspendidas que se separan con dificultad. La suspensión fue tratada por centrifugación a 2500 rpm durante 30 minutos y a continuación se procedió a separar el paquete celular y el líquido sobrenadante por medio

de una filtración continua a través del filtro millipore (membranas con poro de 0.22  $\mu$ m). El líquido sobrenadante estéril constituyó el extracto crudo de la toxina. El paquete celular se colectó y almacenó en congelación sin conservador.

Para la obtención de glóbulos rojos, previa antisepsia se puncionó la vena yugular del ovino con una aguja estéril del número 21 y ya obtenida la sangre (5 ml) se depositó en un tubo de ensaye con anticoagulante (EDTA) teniendo cuidado de que resbalara lentamente por la pared del tubo para evitar hemólisis. Posteriormente se centrifugó para separar el plasma a 2500 rpm durante 10 minutos y ya separado el plasma este se desechó y se colocó la misma cantidad de PBS (buffer de fosfatos) con un pH de 6.4 y nuevamente se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos. Este mismo paso se repitió 2 veces más y ya lavados los glóbulos rojos se tomaron 0.5 ml del paquete celular y se colocaron en 99.5 ml de PBS estéril y se mantuvieron en refrigeración.

La prueba de inhibición de la hemólisis se realizó usando una modificación del método realizado por Burrell, (1980); fue empleada una microplaca en donde a una serie de pozos de esta (15 en total) se le adicionó una gota (0.025 ml) de PBS con la micropipeta, luego se tomó una muestra del suero a probar con el microdilutor y se colocó en el primer pozo de la microplaca y se hicieron diluciones dobles rotando el microdilutor en todos los pozos y ya en el último pozo se desechó el contenido. Posteriormente se colocó una gota (0.025 ml) de toxina de C. pseudotuberculosis constante en

todos los pozos y se dejó 60 minutos a temperatura ambiente para posteriormente adicionarle los glóbulos rojos (0.025 ml) lavados de ovino al 0.5% y meterlo a incubar en refrigeración durante 48 - 72 horas y efectuar la lectura.

Control positivo: En un pozo de la microplaca se colocó una gota (0.025 ml) de PBS, más una gota de suero (0.025 ml) de PBS con la micropipeta, más una gota de suero conocido (+), luego se adicionó una gota de la toxina de C. pseudotuberculosis con la micropipeta y por último se colocó una gota de glóbulos rojos lavados de ovino al 0.5% y se dejó incubando con la prueba.

Control negativo: En un pozo de la microplaca se colocó una gota (0.025 ml) de PBS, más una gota de toxina de C. pseudotuberculosis, más una gota de glóbulos rojos de ovino lavados al 0.5% y se dejó incubando con la prueba.

## RESULTADOS Y DISCUSION.

De los 118 sueros empleados para la realización de este estudio, los resultados obtenidos muestran que los títulos más altos en la prueba de inhibición de la hemólisis son en la dilución 13 (D-13) con un título de 1:8,192 siendo esta el 35.593%, siguiéndole la dilución 5 con un título de 1:32 con el 15.264% y la dilución 6 con un título de 1:64 con el 11.864% respectivamente. Como se puede observar los resultados se empezaron a detectar a partir de la dilución 1:8. También se aprecian que las diluciones 1 y 2 con títulos de 1:2 y 1:4 respectivamente no hubo ningún suero positivo. Los títulos de anticuerpos obtenidos en esta prueba se pueden observar en el cuadro y figura 1.

Cabe mencionar que la prueba se modifico usando microplacas, microdilutores y solución buffer (PBS) con pH de 6.4, ya que la prueba original citada por Burrel (1980), se trabajó con tubos de ensaye, mayor cantidad de volumen y solución salina fisiológica (SSF). La prueba funcionó en forma más satisfactoria utilizando PBS que empleando la SSF como lo señala la prueba original; Burrel, (1980 a) menciona que la exotoxina de C. pseudotuberculosis tiene actividad hemolítica sobre eritrocitos de borrego cuando reacciona bajo un pH 6 y actividad directa de hemaglutinación cuando reacciona en títulos altos de pH. Cualquier variación en el pH puede originar alteraciones en los resultados de esta prueba.

La mayor cantidad de sueros respondieron en forma positiva en la

dilución 1:8,192 un título alto si se considera que trabajos realizados por otros investigadores utilizando esta misma prueba en infecciones experimentales empieza a dar resultados (+) a partir de la dilución 1:4, 1:8. Brown (1985) en un ensayo con la prueba sinérgica de inhibición de la hemólisis interpreta como respuesta seropositiva un título de 1:4.

Otro reporte hecho por Shigidi (1978) con la prueba de hemaglutinación indirecta considera los títulos de 1:16 y mayores como una respuesta positiva.

Burrell (1980 a) reporta un título de 1:32 como positivo en la prueba de inhibición de la hemólisis en 10 de 12 cabras con infección experimental.

Una correlación hecha por Holstad (1986 a) entre las pruebas de inhibición de la hemólisis (HIT) y aglutinación bacteriana (BAT) el título positivo fue estipulado como 0.6 y 2.1 respectivamente (expresado en logaritmo decimal).

Morales (1991) realizó las pruebas de inhibición de la hemólisis y aglutinación lenta en tubo para evaluación de una bacterina de C. pseudotuberculosis con una concentración de  $3 \times 10^9$  UFC/ml, aplicándola por vía subcutánea en cuyes, obteniendo títulos de 3.3 (expresado en logaritmo decimal).

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de varianza y la desviación standart. Los resultados de estos se muestran en el cuadro 1.

Debido a los altos títulos obtenidos en la realización de la prueba

se puede pensar en una hipótesis basada en que todos los sueros muestreados eran de animales adultos. Esto se puede verificar según reporta Holstad (1986 b) que al realizar las pruebas de aglutinación bacterial (BAT) e inhibición de la hemólisis (HIT) en animales de rebaños infectados los títulos de anticuerpos se incrementaron en los animales a los 6 años de edad y la mayor parte de crías poseen anticuerpos contra C. pseudotuberculosis durante los primeros meses de vida y que tales anticuerpos están ausentes en animales a la edad de 3-4 meses y esto pudiera sugerir el porque de estos títulos.

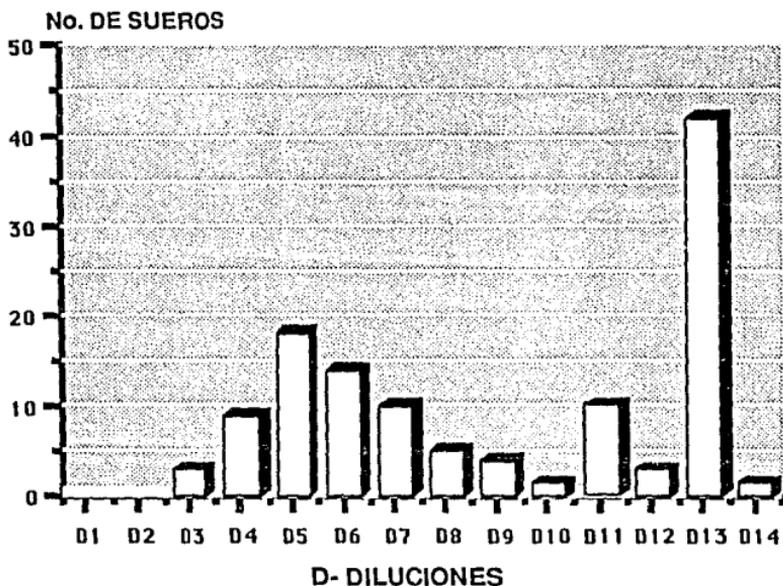
Además de que los sueros trabajados fueron obtenidos al azar y no pudo llevar a cabo un seguimiento apropiado de los animales muestreados ya que no se realizó la observación cuando se abrieron los animales y no se alcanzó a revisar los ganglios linfáticos superficiales e internos; por otro lado debido a la falta de información por parte de la gente encargada de la matanza y de que no se pudo observar a los animales desde los corrales para determinar por ejemplo la presencia y localización de lesiones que nos permitieran en un momento dado correlacionar con mayor exactitud los resultados obtenidos en esta prueba.

Sin embargo, la prueba es promisoría y puede ser provechosa debido al modo de trabajar en el campo ya que es fácil de realizar, rápida y económica para el diagnóstico de LC en México.

**CUADRO 1. TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMOLISIS USANDO SUEROS DE OVINOS OBTENIDOS DEL RASTRO FRIGORIFICO DE FERRERIA.**

DILUCIONES	No. DE SUEROS	PORCENTAJE (%)
D-1 1: 2	0	0
D-2 1: 4	0	0
D-3 1: 8	2	1.695
D-4 1: 16	9	7.627
D-5 1: 32	18	15.254
D-6 1: 64	14	11.864
D-7 1: 128	11	9.322
D-8 1: 256	4	3.390
D-9 1: 512	3	2.542
D-10 1: 1024	1	0.847
D-11 1: 2048	11	9.322
D-12 1: 4096	2	1.695
D-13 1: 8192	42	35.593
D-14 1: 16384	1	0.847
<b>TOTAL</b>	<b>118</b>	<b>100.000</b>
PROMEDIO	8	7
VALOR MAXIMO	118	100
VALOR MINIMO	0	0
DESVIACION STANDAR	10.848	9.193
VARIANZA	117.673	84.511

## PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMOLISIS EN SUEROS DE OVINOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LINFADENITIS CASEOSA



## CONCLUSIONES.

- 1.-) La prueba de inhibición de la hemólisis es fácil de realizar y puede ser promisoría para el diagnóstico de LC en ovinos y caprinos de México.
- 2.-) Utilizando ésta prueba en un total de 118 sueros, el 35.593% dieron resultados positivos en la dilución 1:8192.
- 3.-) Se recomienda la realización de esta prueba a partir de animales identificados como positivos a LC, sospechosos y negativos en condiciones de campo para poder determinar el porcentaje de seguridad de la prueba.
- 4.-) De esta manera se puede llevar un control del rebaño para evitar la diseminación a otros animales y por lo tanto una baja producción.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Brogden, K. A. and Engen, R. L. (1990). Alterations in the phospholipid composition and morphology of ovine erythrocytes after intravenous of Corynebacterium pseudotuberculosis. Am. J. Vet. Res. 51 (6): 874 - 877.
- 2.- Brown, C. C. ; Olander, H. J. (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.
- 3.- Brown, C. C. ; Olander, H. J. (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to Corynebacterium pseudotuberculosis. Am. J. Vet. Res. 47 (5): 1116 - 1119.
- 4.- Brown, C. C. ; Olander, H. J. (1987). Caseous lymphadenitis of goats and sheep: A review. Veterinary Bulletin 57 (1): 1- 11.
- 5.- Burrell, D. H. (1980 a). A Haemolysis inhibition test for detection of antibody to Corynebacterium ovis exotoxin. Res. Vet. Sci. 28 : 190 - 194.
- 6.- Burrell, D. H. (1980 b). In vitro direct haemagglutination by Corynebacterium ovis exotoxin. Res. Vet. Sci. 28: 51 -54.

7.- Burrell, D. H. (1980 c). A simplified immunodiffusion technique for detection of Corynebacterium ovis antitoxin. Res. Vet. Sci. 28: 234 - 237.

8.- Cameron, C.M. And Smit, C. M. (1970). Relationship of Corynebacterium pseudotuberculosis protoplasmic toxins to the exotoxin. Ondersteport Vet. Res. 37 (2): 97 -104.

9.- Cardenas, L. A. and Maki, R. L. (1986). Detection of antibody in rams with contagious epididymitis using the enzyme - linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 47 (4): 738 - 739.

10.- Cuellar, O. A. ; Hernández, V. C. ; Oviedo, F. G. (1986) Linfadenitis caseosa en: Producción de caprinos. Primera edición. Editado por Arbiza, A.S.I.; AGT editor, México pp. 551 - 554.

11.- De Lucas, T. J. (1986). Producción ovina en México en: Temas selectos de ovinos. Editado por José de Lucas Tron. UNAM. México número 2, pp. 39.

12.- Ellis, T. M. ; Sutherland, S. S. (1987). The role of Corynebacterium pseudotuberculosis lung lesions in the transmission of this bacterium to the other sheep. Australian Veterinary Journal 64 (9): 261 - 263.

- 13.- García, V. S. (1980). Aislamiento y caracterización de corinebacterias de ovinos y caprinos en México. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan - UNAM.
- 14.- García, V. S. ; Ciprian, C. A. (1985). Linfadenitis caseosa en: Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. 1ª edición. Editado por Pijoan y Tortora. Impreso en México. pp. 235 -238.
- 15.- Hagan y Brunel (1983). Linfadenitis Caseosa en: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4ª edición. Ed. La prensa médica mexicana. pp. 213 -215.
- 16.- Hamir, A. N. (1981). Corynebacterium pseudotuberculosis lesion in the heart of a sheep. Veterinary Record. 109: 180.
- 17.- Hlepe, T. H. (1972). Linfadenitis caseosa en: Enfermedades de la oveja. 4ª edición. Ed. Acribia. pp. 160 -162.
- 18.- Holstad, G. (1986 a). Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats 1: Evaluation of two serological diagnostic test. Acta Vet. Scand. 27: 575 -583.
- 19.- Holstad, G. (1986 c). Corynebacterium pseudotuberculosis infection in

goats 111. The influence of age. Acta Vet. Scand 27: 598 - 608.

20.- Holstad, G. (1986 c). Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats V. Relationship between the infection and lesions resulting from vaccination against Paratuberculosis. Acta Vet. Scand 27: 617 -622.

21.- Holstad, G. ; Teige, J. ; Larsen, H. J. (1989). Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats VIII. The effect of vaccination against experimental infection. Acta Vest. Scand. 30 (3): 275 - 283.

22.-Hsu, Y. T. ; Reshaw. W. H. (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 (5): 1206 -1211.

23.- Kuria, J. N. K. and Holstad, G. (1989). A seroepidemiological investigation of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep flocks in southern Norway. Acta Vet. Scand. 30 (1): 107 -108.

24.- Langenegger, C. H. ; Langenegger, J. ; Costa, S. G. (1986). Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 7 (2): 27 -32.

25.- Lea Master, B. R. ; Shen, T. D. (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.

26.- Libro de registros de matanza y decomiso de el rastro de Ferrería 1991.

27.- Lund, A. ; Almlid, T. (1982). Colostral transfer in the goat of antibodies against Corynebacterium pseudotuberculosis and the antibody status of kids during the first 10 months of life. Acta Vet. Scand. 23: 483 -489.

28.- Menezies P. ; Muckle, A. (1989). The use of microagglutination assay for the detection of antibodies to Corynebacterium pseudotuberculosis in naturally infected. Can. J. Vet. Res. 53 313 -318.

29.- Morales, P. ; E. A. (1991). Evaluación de una bacterina de Corynebacterium pseudotuberculosis en cuyes. Tesis profesional FES- C. UNAM México.

30.- Navarrete, G. S. M. (1988). Obtención de toxina a partir del aislamiento de Corynebacterium ovis. tesis profesional FES - C. UNAM.

31.- Pepin, M. ; Pardon p. (1988). Corynebacterium pseudotuberculosis

infection in adult ewes by inoculation in the external ear. *Am. J. Vet. Res.* **49** (4): 459 -463.

32.- Redondo, E. ; Roncero, V. y Moiano M. (1988). Consideraciones sobre la pseudotuberculosis ovina. *Acta Med. Vet.* **34** 191 - 198.

33.- Rensshaw, W. H. ; Parrish, C. V. (1979). Visceral caseous Lymphadenitis in thin ewe syndrome: Isolation of Corynebacterium Staphylococcus and Moraxella spp from internal abscesses in amaciated ewes. *Am. J. Vet. Res.* **40** (8) : 1110 - 1114.

34.- Shigidi, M. T. A. (1978). An indirect haemagglutination test for the sero-diagnosis of Corynebacterium ovis infection in sheep. *Research in Veterinary Science.* **24**: 57 -60.

35.- Shigidi, M. T. A. (1979). A comparison of five serological test for the diagnosis of experimental Corynebacterium ovis infection in sheep. *British Veterinary Journal.* **135** (2): 172 - 177.

36.- Sutherland, S. S. ; Ellis, T. M. (1987). Evaluation of an enzyme - linked immunosorbent assay for the detection of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep. *Australian Veterinary Journal* **64** (9): 263 - 266.