

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



50
Lej

**"EVALUACION DE LA PRUEBA DE AGLUTINACION EN
PORTAOBJETO PARA LA IDENTIFICACION RAPIDA DE
Corynebacterium pseudotuberculosis"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N :
ROSALIA GUADALUPE PADILLA RUIZ
MA. ESTELA EDITH OROPEZA SALIN

DIRECTOR DE TESIS: M.V.Z. SUSANA E. GARCIA VAZQUEZ
ASESOR DE TESIS: M.V.Z. M.C. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN
PRESENTE.

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.B. - C.

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

"Evaluación de la prueba de aglutinación en portaobjeto
para la identificación rápida de *Corynebacterium*
pseudotuberculosis."

que presenta la pasante: Rosalía Guadalupe Padilla Ruiz
con número de cuenta: 7934706-0 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista ; en colaboración con:
María Estela Edith Oropeza Salín

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 13 de Diciembre de 1995

| | |
|------------------|--|
| PRESIDENTE | <u>MVZ. Luz María Ortega de Ochoa</u> |
| VOCAL | <u>MVZ. Rodolfo Ibarrola Uribe</u> |
| SECRETARIO | <u>MVZ. Tonatihu Cruz Sánchez</u> |
| PRIMER SUPLENTE | <u>M.C. Alejandro Martínez Rodríguez</u> |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>MVZ. Raúl Radillo Rodríguez</u> |



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JAINE KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEG-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.G. - C.

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

"Evaluación de la prueba de aglutinación en portaobjeto
para la identificación rápida de *Corynebacterium*
pseudotuberculosis."

que presenta la pasante: María Estela Edith Oropeza Salín
con número de cuentas: 7118794-7 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista ; en colaboración con :
Rosalía Guadalupe Padilla Ruiz

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 13 de Diciembre de 1995

| | | |
|------------------|-----------------------------------|--|
| PRESIDENTE | MVZ. Luz María Ortega de Ochoa | |
| VOCAL | MVZ. Rodolfo Ibarrola Uribe | |
| SECRETARIO | MVZ. Tonatihu Cruz Sánchez | |
| PRIMER SUPLENTE | M.C. Alejandro Martínez Rodríguez | |
| SEGUNDO SUPLENTE | MVZ. Raúl Radillo Rodríguez | |

A mi abuelita Julita. Ya que sin su cariño, ejemplo de gran mujer y apoyo nunca hubiera logrado llegar donde me encuentro.

¡Gracias Abuelita!

A mi madre Guille. Cuyo impetu de superación personal ha sido uno de mis más grandes ejemplos para poder continuar y culminar este trabajo. Te agradezco el cariño y apoyo que me has brindado siempre.

A mis hermanos Memo, Miguel, Chucho e Israel. Por su cariño y apoyo, y por que este trabajo les sirva como ejemplo para continuar con su superación personal.

A mi hermana Rocío (q. e p. d.),
en donde te encuentres, estoy
segura que te sentirás orgullosa
de mi y gracias por seguir
ayudandome.

A mi esposo Salvador. Gracias por
el amor y el apoyo que me has
brindado todo este, tiempo, sin
el cual no hubiera concluido este
trabajo, pero sobre todo, por ser
el gran amor de mi vida.

A mi hijo Cuauhtemoc, el cual ha
sido el regalo más maravillosos
que me ha dado la vida, esperando
que sea un excelente
profesionista.

A mis amigos,
Armando, Rafael, Cesar y Manuel;
agradeciendo los agradables
momentos juntos, como estudiantes
y ahora como profesionistas.

A mis amigas,
Dolores, Aide y Lourdes; que han
estado siempre conmigo en los
momentos buenos y malos.

Gracias Guadalupe

A mí Papá, Mamá; Chofita
y hermanos.

Gracias por su apoyo y
cariño ilimitado.

A mis amigas

Nadia y Susana

Sin su apoyo no lo habría logrado

A mis verdaderos amigos. Que de
una u otra forma me han ayudado
siempre.

Gracias Edith

A Susana y Tonatiuh,
Que contribuyeron con su trabajo
y apoyo, la culminación de este
trabajo.

A todo el personal del
Laboratorio L-513, que nos ayudo
en la realización de este
trabajo.

¡MIL GRACIAS!
Rosalia y Edith

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio L-513 de la Sección de Microbiología de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campo 4, perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

I N D I C E

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 11 |
| ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS | 13 |
| INTRODUCCIÓN | 14 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL | 31 |
| OBJETIVOS | 32 |
| MATERIAL Y MÉTODO | 33 |
| RESULTADOS | 43 |
| DISCUSIÓN | 52 |
| CONCLUSIONES | 55 |
| BIBLIOGRAFÍA | 57 |

RESÚMEN

La Linfadenitis Caseosa, enfermedad que se presenta en pequeños rumiantes, puede ser incluida en el grupo de enfermedades que presentan dificultad para ser diagnosticadas "in vivo". Generalmente se trata de un proceso de bajos índices de mortalidad y que clínicamente evoluciona asintómicamente; sin embargo, es importante al relacionarse ésta con la reglamentación técnico-sanitaria del comercio de canales y debe considerarse que el 90% de los diagnósticos de esta enfermedad corresponden a hallazgos post-mortem. (Brogden y col., 1984-A; Gilmour, 1990; Lindsay y col., 1991; Lloyd y col., 1990; Menzies y col., 1989).

El presente trabajo fue diseñado con el objeto de emplear la prueba de Aglutinación en portaobjeto para la identificación de Corynebacterium pseudotuberculosis (ovis), considerando que hasta la fecha el aislamiento de la bacteria a partir de lesiones que origina en animales infectados, es determinante para el diagnóstico definitivo de la enfermedad.

La evaluación de la prueba de aglutinación se realizó empleando un antisuero obtenido de conejos inoculados previamente con antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis más adyuvante completo de Freund, con un título de $3.6 \log_{10}$, y utilizando el mismo antígeno y diferentes cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis. Se trabajaron también pruebas de aglutinación con el mismo antisuero y cepas de Staphylococcus y Streptococcus, bacterias piógenas que es posible aislarlas a partir de procesos abscedativos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que la prueba puede ser promisorio para la identificación rápida de Corynebacterium pseudotuberculosis a partir de cultivos puros. Los otros microorganismos piógenos empleados también en la prueba no dieron reacción cruzada con el antígeno.

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS

| | |
|--------------------|----|
| CUADRO 1 | 15 |
| CUADRO 2 | 29 |
| CUADRO 3 | 37 |
| CUADRO 4 | 45 |
| GRÁFICA 1. | 46 |
| GRÁFICA 2. | 47 |
| CUADRO 5 | 48 |
| CUADRO 6 | 50 |
| CUADRO 7 | 51 |

**EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN
PORTAOBJETO PARA LA IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE
Corynebacterium pseudotuberculosis**

I N T R O D U C C I Ó N

La Linfadenitis Caseosa (LC) o Pseudotuberculosis, es un padecimiento crónico con una amplia ocurrencia en ovinos y caprinos, caracterizada por provocar lesiones purulentas con aspecto caseoso en los nodos linfáticos y órganos internos, cuando el problema se generaliza; es detectada generalmente durante la inspección sanitaria post-mortem en los rastros. (Brown y col., 1987; González y col., 1989; Redondo y col., 1988)

El agente etiológico de la Linfadenitis Caseosa es Corynebacterium pseudotuberculosis, bacteria Gram (+) pleomórfica; mide de 1-2 μm . de longitud; en el aislamiento primario a partir de las lesiones, el crecimiento es escaso; pero en la resiembra es uniforme y abundante; crece en agar sangre a 37°C, produciendo β -hémolisis después de 48 hrs. de incubación, y también puede desarrollarse en agar sangre con tellurito de potasio, en el Cuadro 1 podemos ver algunas de sus propiedades bioquímicas. (Favier y col., 1990; Gavin y col., 1992; García, 1980; Lloyd y col., 1990; Ocampo, 1991; Redondo y col., 1988)

CUADRO 1

| PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | |
|---|----------------|
| CARACTERÍSTICA | LECTURA |
| Hemólisis | β |
| Producción de Catalasa | + |
| Hidrólisis de Caseína | - |
| Gránulos Metacromáticos | + |
| Ácido a partir de Glucosa | + |
| Ácido a partir de Lactosa | d ⁻ |
| Ácido a partir de Maltosa | + |
| Ácido a partir de Trehalosa | - |
| Hidrólisis Almidón | + |
| Reducción de Nitratos | d |
| Producción de Ureasa | + |

(22, 30, 53, 63, 74)

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 CMNR, debido a que los 4 géneros tienen paredes celulares ricas en complejos lipídicos similares. La principal característica de esos lípidos es la presencia de un ácido graso llamado ácido micólico. Las paredes celulares de este grupo tienen

combinaciones de enlaces específicos y un péptido en común conteniendo meso- α -diaminopimélico (DAP), ácido glutámico-alanina. Corynebacterium pseudotuberculosis en especial incorpora en su pared celular ácido corinemicólico y ácido corinemicolénico; aún cuando estos compuestos no confieren la propiedad de ácido resistencia, sí están relacionados con la capacidad de sobrevivencia de esta bacteria dentro de las células hospedadoras, por lo que la virulencia de una cepa en particular se relaciona con la cantidad de lípidos en su pared celular. (Batey, 1986; Ocampo, 1991; Pépin y col., 1987)

Muckle (1983) obtuvo los lípidos de la pared celular de 25 cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis, 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 mayor cantidad de abscesos, en este contenido lipídico existe también un factor piogénico termoestable que induce la formación de lesiones caseosas y purulentas; y un lípido de superficie con actividad leucotóxica. El factor piogénico es una sustancia adicional existente, que contribuye a la formación de lesiones locales. La capa de lípido superficial que el microorganismo posee, ha sido propuesta como el principal factor degenerativo que le imparte resistencia contra enzimas lisosomales,

permitiéndole sobrevivir y multiplicarse, destruyendo las células del hospedador, después de haber evadido los mecanismos intracelulares destructivos y degradativos de los macrófagos. Burrel (1978) determinó que hay una correlación positiva entre el contenido lipídico de la pared celular y la habilidad para producir lesiones. (Batey, 1986; Burrel, 1978; Hsu, 1984; Muckle y col., 1983)

La bacteria es productora de una potente exotoxina, es una fosfolipasa D, que tiene efectos vasogénicos; sus células blanco son las células endoteliales, esta toxina actúa a nivel de la esfingomielina, que forma parte de la pared de revestimiento interno de los vasos sanguíneos, la cual al ser disociada causa desorganización de la membrana y lisis celular; esta toxina tiene un efecto facilitador de la dispersión de la bacteria. Generalmente la vía de entrada de la enfermedad es por heridas en piel, e infecta posteriormente los nodos linfáticos; las lesiones iniciales sanan rápidamente, pero siguen desarrollándose lentamente durante varios meses, en los cuales los abscesos pueden crecer hasta 7 cm. En caprinos los nodos más afectados son los parotídeos, submaxilares y preescapulares; en un principio a la inspección son móviles y poco visibles, algunos provocan irritación, causando que el animal se restriegue y se rompan, liberando exudado purulento de

aspecto cremoso, después de lo cual la lesión tiene una recuperación rápida. En ovinos, en donde la vía de entrada son las heridas producidas en la esquila, los nodos más frecuentemente afectados son los precraurales, siguiéndoles el mediastínico, bronquial, submaxilar y mesentéricos, diseminándose a vísceras, lo cual también ocurre en caprinos. Se observa principalmente en animales viejos y es detectada a la inspección de la canal al localizar abscesos, sobre todo en pulmón, nodos submaxilares y mesentéricos. (González y col., 1989; Hsu, 1984; Lindsay y col., 1991; Lloyd y col., 1990; Middleton y col., 1991; Nakamura y col., 1981; Navarrete, 1988; Schreuder, 1990)

Una vez que Corynebacterium pseudotuberculosis supera las barreras primarias del hospedero, induce la formación de un absceso en el sitio de entrada, los leucocitos, especialmente neutrófilos, se acumulan alrededor entre las bacterias; los fibrocitos y capilares se forman constituyendo una pared en la periferia de la infección; de este modo, los factores bacterianos llevan a cabo sus efectos en forma lenta pero continua, destruyen a los leucocitos y tejido involucrado, constituyéndose así la lesión característica de Linfadenitis Caseosa, un absceso caseoso encapsulado. (Brown y col., 1987; Ellis, 1983; Gillespie y col., 1983; Hsu y col., 1985)

La bacteria no detenida por la cápsula del absceso, invade los capilares y forma colonias que secretan más metabolitos, los cuales facilitan la dispersión bacteriana y la oclusión capilar; la isquemia resultante y las sustancias bacterianas matan a las células de la pared interna de tejido conectivo de la cápsula, adicionando una nueva capa de material necrótico, de esta manera, nuevo tejido conectivo prolifera para reforzar la pared. Por medio de este proceso repetitivo, se adicionan sucesivas capas a la masa necrótica, formándose el típico aspecto laminar de los abscesos. Cabe señalar, que mientras que el lípido superficial citotóxico es el principal factor piogénico, la exotoxina es más bien un factor de diseminación bacteriana, al aumentar la permeabilidad vascular. (Cameron y col., 1970; Hard, 1975; Jubb y col., 1982; Muckle y col., 1983)

Es interesante el hecho de que la exotoxina propicie la formación de abscesos, pero no evite la diseminación bacteriana con el encapsulamiento de los mismos; asimismo, es de notarse también que los linfocitos involucrados en el proceso, y que por supuesto no son células con actividad fagocítica, no sufran los efectos citotóxicos del lípido de superficie. La actividad fagocítica permite que la bacteria sea transportada viable hasta los nodos linfáticos regionales desde el sitio inicial de inoculación; ya en

los nodos el proceso se repite, abscedandose éstos y diseminando la bacteria por vía linfática y sanguínea a todo el organismo. Ocasionalmente los animales se recuperan de la infección cutánea y no presentan abscesos, pero una vez localizada la infección en nodos linfáticos, su curso es inevitablemente crónico y de carácter insidioso. (Brogden y col., 1984-A; Brogden y col., 1984-B; Ellis, 1983; García y col., 1980; Hard, 1970; Jubb y col., 1982; Muckle y col., 1983; Renshaw y col., 1979; Tashjian y col., 1983)

La Linfadenitis Caseosa generalmente tiene una evolución subclínica y lenta, los animales se muestran afebriles, con buen apetito; los signos clínicos sugestivos de esta enfermedad pasan desapercibidos, existen diversas pruebas para detectar la Linfadenitis Caseosa, pero la mayoría presentan deficiencias en cuanto a su capacidad para diagnosticar la enfermedad subclínica, la finalidad de estas pruebas, es el diagnóstico de manera rápida y eficaz para promover el control y erradicación de la enfermedad, de tal modo que en una población sea posible detectar animales enfermos sin lesiones aparentes. (Brown y col., 1987; Chikamatsu y col., 1989; Ellis, 1983; Menzies y col., 1989)

Las actividades hemolíticas y hemaglutinantes de la exotoxina de Corynebacterium pseudotuberculosis se han considerado para el

desarrollo de pruebas diagnósticas como son: Inhibición de la Antihemolisina, Prueba de Inhibición de la Hemólisis en Gel, Prueba de Protección al Ratón, Hemoaglutinación Indirecta y Directa, Inmunodifusión y Prueba de Inhibición de la Aglutinación Directa con eritrocitos lisados. (Burrel, 1980-A; Burrel, 1980-B; Burrel, 1980-C; Cameron y col., 1970; Chikamatsu y col., 1989; Shigidi, 1979)

Debido a que Corynebacterium pseudotuberculosis, es un microorganismo facultativo intracelular, se espera el desarrollo de una respuesta inmune de tipo celular. El citoplasma y pared celular contienen pequeñas cantidades de exotoxina, mientras los anticuerpos contra la exotoxina se forman, se desarrolla una reacción de hipersensibilidad tipo III (Arthus) con trombosis, infartación e invasión neutrófila, la cual es lítica para células endoteliales "in vitro". La prueba dérmica (Linfadenización) resulta ser útil para la evaluación de la respuesta inmunológica en casos experimentales o de campo en animales en los cuales la evaluación serológica es imparcial. Sin embargo, leofilizando el reactivo de la prueba dérmica, se debería haber destruido toda actividad de la exotoxina; incrementando así la especificidad de la prueba para la inmunidad mediada por células para Corynebacterium pseudotuberculosis, la lectura de los resultados se realiza a las

24, 48 y 72 hrs. La reacción alérgica evaluada por la Prueba de Linfadenización en un intervalo de 6 semanas, mostró el valor mas alto entre la 4a. y 6a. semana post-infección y después disminuyó lentamente, generalmente seguida del nivel de anticuerpos. Un tercio de los caprinos infectados perdió los títulos de la antitoxina y la reacción alérgica entre la 9a. y 10a. semana, teniendo una autocura. Se observó una disminución gradual, hasta su total desaparición del título de antitoxinas y sensibilización alérgica en algunos caprinos con abscesos en nodos linfáticos que no ulceraron aún habiendo Corynebacterium pseudotuberculosis viable en la lesión. (Brown y col., 1986-A; Brown y col., 1987; Burrel, 1980-A; Langenegger y col., 1986; Tizard, 1985)

La prueba de protección al ratón dio resultados prometedores en el diagnóstico de Linfadenitis Caseosa; esta prueba neutraliza dosis letales mínimas de toxina de Corynebacterium pseudotuberculosis por anticuerpos específicos en 1 ml. de suero ovino infectado, capaz de proteger a los ratones contra la toxina letal de Corynebacterium pseudotuberculosis, mientras que el suero de ovinos sanos esta carente de tales anticuerpos y da resultados negativos, el periodo de espera para la evaluación de esta prueba es de 1 a 4 días; Abdel Hamid (1975) trabajó con un rebaño de 68 ovinos, de los cuales 13 estaban sanos y 55 infectados, colectó

muestras sanguíneas, separando el suero bajo condiciones asépticas, y manteniéndolo abajo del punto de congelación sin preservativos y usándolo unos días después al inyectarlo por vía intraperitoneal en dosis de 0.25, 0.5 y 1 ml. a varios grupos de ratones (constituidos por 3 ratones cada uno), después de 6 horas se les aplicaron 2 dosis letales mínimas de toxina de Corynebacterium pseudotuberculosis, existiendo un grupo control; los ratones murieron en un periodo de 4 días, principalmente en las primeras 24 horas; demostrando que esta prueba es una buena herramienta para detectar Linfadenitis Caseosa en ovinos que no muestren lesiones externas. (Abdel-Hamid, 1975; Brogden y col., 1990; Cameron y col., 1984)

La base de la Prueba de la Inhibición de la Hemólisis es la inhibición, por un suero hiperinmune, de la actividad hemolítica de la exotoxina de Corynebacterium pseudotuberculosis, para eritrocitos ovinos, después de ser incubada toda la noche. Cuando la prueba fue realizada en sueros de ovinos, que habían sido vacunados con células y exotoxina de Corynebacterium pseudotuberculosis, la titulación promedio incrementó, mientras que en ovinos vacunados solamente con células de Corynebacterium pseudotuberculosis el título promedio permaneció bajo. La antitoxina también fue detectada en algunos corderos amamantados

por ovejas que tuvieron títulos altos. (Burrel, 1980-B; Ellis y col., 1990; Holstad y col., 1988; Kuria y col., 1989)

Según Kuria y Holstad (1986) la Prueba de Inhibición de la Hemólisis es una prueba sensitiva, fácil de interpretar, puede realizarse la lectura después de 8 a 22 hrs., que se correlaciona bien con la infección existente en cabras. La Prueba de ELISA también, y da resultados comparables con los de la Inhibición de la Hemólisis. La prueba de ELISA ha sido ampliamente empleada con resultados satisfactorios por varios autores, Laak y col. (1991), reportan que desde septiembre de 1988 han estado usando esta prueba en Holanda y les ha resultado apropiada para el control de la enfermedad y han podido declarar a varios rebaños libres de Linfadenitis Caseosa. (Burrel, 1980-A; Burrel, 1980-B; Ellis y col., 1990; Holstad y col., 1988; Kuria y col., 1989; Larsen y col., 1988; Lund y col., 1982-A; Lund y col., 1982-B)

Una prueba de aglutinación bacteriana utilizando un antígeno sonificado de pared celular extraído con éter-petróleo, fue desarrollada para detectar anticuerpos contra Corynebacterium pseudotuberculosis, por Augustine en 1986; esta prueba en conjunción con estudios bacteriológicos y serológicos fue empleada para observar la prevalencia de Linfadenitis Caseosa en una

población de ovinos. Este estudio sugiere que la prueba serodiagnóstica de aglutinación bacteriana pueda ser útil como una prueba inmunológica "in vitro" para la Linfadenitis Caseosa ovina. (Augustine, 1986; Brogden y col., 1984-B; Cameron y col., 1972; Cameron y col., 1973; Holstad y col., 1988; Lund y col., 1982-A; Morales, 1992; Shigidi, 1979)

Shigidi (1979) realizó la comparación de cinco pruebas serológicas: Aglutinación en Tubo, Fijación de Complemento, Difusión en Gel, Inhibición de la Antihemolisina y Hemoaglutinación Indirecta para el diagnóstico de la infección experimental de Corynebacterium pseudotuberculosis observando que ninguna de estas pruebas es 100% confiable. En un grupo de 12 ovinos infectados experimentalmente, la prueba de Aglutinación en Tubo fue de valor para la detección de anticuerpos entre la 3a. y 18a. semanas después de la infección; después de la 8a. semana no fueron detectados anticuerpos por la prueba de Fijación del Complemento y con la prueba de Difusión en Gel ocurrieron reacciones no específicas. La Prueba de la Inhibición de la Antihemolisina detectó antitoxina 9 semanas posterior a la infección, y la que resultó ser más confiable y en donde los niveles de anticuerpos de la antitoxina fueron detectados después de periodos más largos que en otras pruebas, 27 semanas después de la infección, fue la de

Hemoaglutinación Indirecta, lo que indica que es de mayor valor en la detección de rebaños infectados varios meses antes. (Shigidi, 1979)

Ellis y colaboradores (1990), usaron las pruebas de ELISA e Inhibición de la Hemólisis para detectar los anticuerpos en el suero de 33 ovinos adultos infectados naturalmente con Linfadenitis Caseosa. La prueba de ELISA empleando pared celular, detectó anticuerpos en 96.9% de los ovinos con lesiones a la necropsia, y ELISA utilizando exotoxina los detecto en el 84.8% de los ovinos positivos; pero ambas pruebas con un alto número de aparentemente falsos positivos, ya que al revisar los resultados con la Prueba de Densidad Óptica los valores fluctuaron entre 64.7% y 49.2% respectivamente. Similarmente, no hubo una relación significativa entre los títulos de anticuerpos antitoxina como en los títulos de la Prueba de Inhibición de la Hemólisis y la extensión de la enfermedad, las pruebas que usaron antígeno crudo de Corynebacterium pseudotuberculosis, son de utilidad cuestionable en el campo, donde la infección por esta bacteria es enzootica en la población ovina y estos resultados sugieren que los anticuerpos que reaccionan con los componentes de Corynebacterium pseudotuberculosis, podrían tener poco impacto en la recuperación del huésped. (Burrel, 1980-A; Burrel, 1980-B; Ellis y col., 1990;

Holstad y col., 1988; Kuria y col., 1989; Larsen y col., 1988; Lund y col., 1982-A; Lund y col., 1982-B)

Varios factores pueden contribuir a la aparente falta de especificidad de la prueba de ELISA, y de otras pruebas, cuando se aplican para el diagnóstico de la infección de Corynebacterium pseudotuberculosis en animales como pueden ser la edad, el estado inmunológico del animal, la ruta y el tiempo de exposición, el intervalo entre la exposición y el análisis serológico; algunas pruebas emplean antígenos complejos y mal definidos. (Ellis y col., 1990)

La prueba de Inhibición Sinérgica de la Hemólisis, es una prueba serológica que detecta anticuerpos formados contra la exotoxina de Corynebacterium pseudotuberculosis. Originalmente ideada para el diagnóstico de la infección de Corynebacterium pseudotuberculosis en caballos, está siendo aplicada en caprinos. En experimentos preliminares ha tenido un alto grado de sensibilidad y especificidad para la detección de Linfadenitis Caseosa, resultando un confiable indicador de la infección activa. (Brown y col., 1985; Brown y col., 1986-A; Brown y col., 1986-B)

Langenegger y colaboradores en 1991, realizaron la titulación de anticuerpos con la Prueba de la Inhibición de la Hemólisis Sinérgica, fueron detectados a la 3a. semana y se elevaron en la 7a. semana posterior a la infección. En un tercio de los animales muestreados las antitoxinas persistieron hasta la semana 29; en otro, no pudieron ser detectadas después de las 12a. a 24a.; y en el otro tercio entre la 5a. y 8a. semana post infección. Tres de los animales no mostraron anticuerpos en ninguna fase de la infección. (Langenegger y col., 1991)

La Prueba de microaglutinación utiliza cultivos de Corynebacterium pseudotuberculosis en un caldo conteniendo 0.003% de Cloruro de Tri-fenol tetra-zolium, a la vez que el antígeno, y fue empleada por Brogden y col., (1990), al estudiar el efecto inmunógeno del dipeptido muramyl en la vacunación con células completas de Corynebacterium pseudotuberculosis. (Brogden y col., 1990; Menzies y col., 1989)

Algunas pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico de Linfadenitis Caseosa se basan en la detección de antitoxinas (ver Cuadro 2);

CUADRO 2

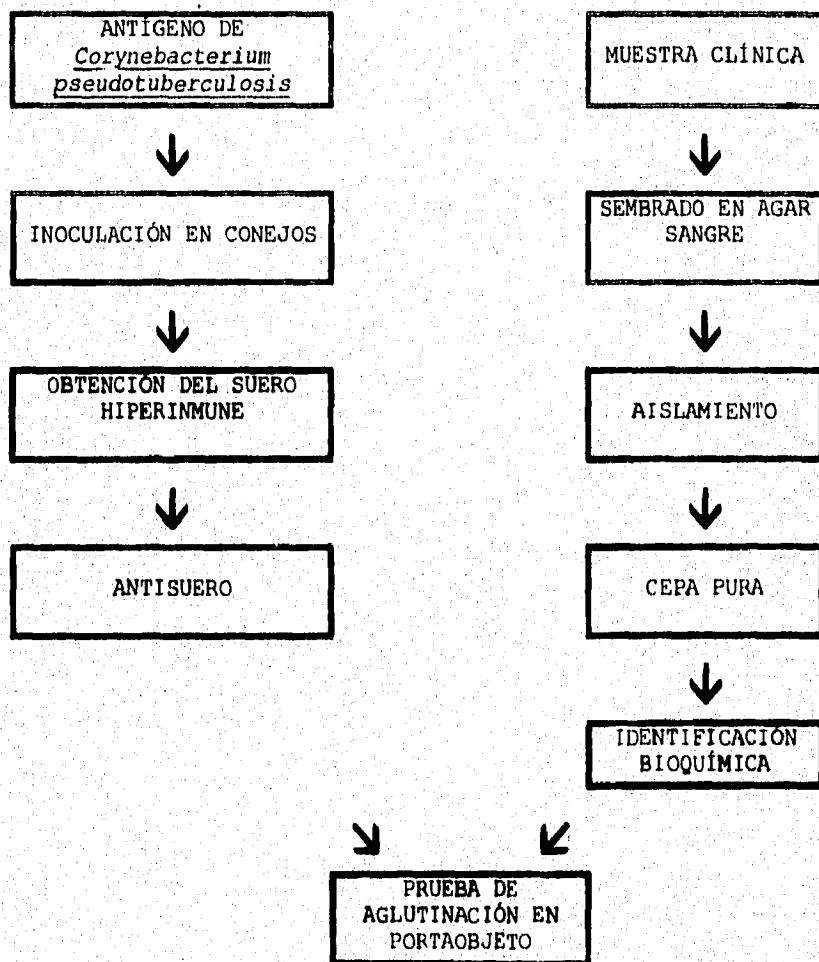
| PRUEBAS DE DIAGNOSTICO PARA LINFADENITIS CASEOSA UTILIZANDO DIFERENTES ANTIGENOS | | |
|--|--------|-------------------|
| | TOXINA | CUERPO BACTERIANO |
| PROTECCIÓN AL RATÓN (1, 3, 21) | X | |
| INMUNODIFUSION (5, 17, 23, 50, 66, 69) | X | X |
| INMUNOFLORESCENCIA (2) | | X |
| AGLUTINACIÓN (4, 8, 19, 20, 40, 54, 56, 72, 76) | | X |
| MICROAGLUTINACION (9, 56) | | X |
| INHIBICIÓN DE LA HEMOLISIS (15, 16, 27, 40, 45, 50, 54, 55) | X | |
| HEMOAGLUTINACION INDIRECTA (50, 75, 76) | X | |
| ELISA (23, 27, 42, 45, 49, 51, 64, 66, 67, 69, 78, 79) | X | X |
| INHIBICIÓN SINERGISTICA DE LA HEMOLISIS (10, 11, 12, 47, 67) | X | |
| INHIBICIÓN DE LA β-HEMOLISIS (29, 60, 68) | X | |
| INHIBICIÓN DE LA ANTIHEMOLISINA (67, 76) | X | |

Algunos investigadores reportan que los ratones y ovinos pueden ser inmunizados efectivamente contra la infección de Corynebacterium pseudotuberculosis, con el uso de vacunas de cultivos completos de Corynebacterium pseudotuberculosis inactivados con formalina y precipitados de aluminio; sin embargo, la inmunidad así obtenida no fue absoluta, y no puede ser

acrecentada por el uso de adyuvantes. Durante estos estudios se observó, sin embargo que, en ovinos, una cápsula que se formaba rápidamente alrededor de la vacuna inyectada, posiblemente impide la absorción efectiva y elaboración de antígeno. Por otra parte la elaboración de antígeno y la producción de anticuerpos en los nodos linfáticos es un evento importante en la respuesta inmune de los ovinos al Corynebacterium pseudotuberculosis. (Cameron y col., 1984)

La adición de un adyuvante, como el Adyuvante Incompleto y Completo de Freund o el Hidróxido de Aluminio, puede permitir el uso de dosis menores de inmunógeno. El Dipeptido Muramyl (componente de Mycobacterias) estimula el sistema retículo endotelial y posee actividad adyuvante sin los efectos indeseables del Adyuvante Completo de Freund. Esta combinación no solo mantiene la protección, sino también controla la reacción inflamatoria en el sitio de inyección. (Brogden y col., 1990)

DISEÑO EXPERIMENTAL



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de la prueba de aglutinación en portaobjeto para la rápida identificación de Corynebacterium pseudotuberculosis.

1) Obtención de un antisuero específico a partir de la inoculación de conejos con antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis.

2) Titulación de los sueros obtenidos de los conejos mediante la prueba de aglutinación lenta en tubo.

3) Aislamiento e identificación bioquímica de cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis a partir de muestras de campo y de rastro, para la elaboración de la prueba de aglutinación rápida en portaobjeto, empleando el antisuero y las cepas obtenidas.

4) Detección de reacciones cruzadas entre Corynebacterium pseudotuberculosis y otras bacterias piógenas como Staphylococcus spp. y Streptococcus spp.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL

1) OBTENCIÓN DEL ANTISUERO

- Antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis, elaborado en la Sección de Microbiología de Campo 4, de la FES-Cuatitlán, de acuerdo a García y Ocampo (1991).
- 1 Jaula grande para conejos.
- 4 conejos hembra de 6 meses de edad.
- Alimento concentrado para conejos.
- Jeringas desechables de 3 ml., con agujas calibre 21.
- Punzocats azul o verde
- Tubos de ensayo con tapón de rosca (4)
- Alcohol
- Etiquetas autoadheribles de 15 x 20 mm., para la identificación de los tubos.
- Marcadores de tinta permanente.
- Centrífuga.
- Refrigerador para almacenar los antisueros.

2) TITULACIÓN DE LOS SUEROS

- Tubos Durham.
- PBS (Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos).
- Antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis.
- 1 Micropipeta.
- Antisuero de los conejos para titular.
- 1 Gradilla.
- Jeringas insulínicas.
- Estufa Bacteriológica.

3) AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE

Corynebacterium pseudotuberculosis Y PRUEBA DE AGLUTINACIÓN

RÁPIDA EN PORTAOBJETO

- Antisuero contra Corynebacterium pseudotuberculosis obtenido de los conejos inoculados con el antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis.
- Antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis.
- PBS (Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos).
- Suero normal de conejo.
- Portaobjetos.
- Caja de fondo oscuro y fuente de iluminación.
- Jeringas insulínicas desechables.

4) DETECCIÓN DE REACCIONES CRUZADAS

- Portaobjetos.
- Cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis, Staphylococcus spp. y Streptococcus spp. obtenidas en el laboratorio de Microbiología.
- 1 Asa de inoculación.
- Antisuero.
- Caja de fondo oscuro con fuente de iluminación.

M E T O D O

1) OBTENCIÓN DEL ANTISUERO

El antígeno fue elaborado anteriormente en la Sección de Microbiología de Campo 4, de la FES-Cuatitlán, de acuerdo a García y Ocampo (1991); su obtención fue de la siguiente manera:

Primero se realizó un cultivo de Corynebacterium pseudotuberculosis en Agar Sangre por 36-40 hrs., se paso a un medio BHI líquido, complementado con Tween 80 al 1%, se incubó a 37°C por 48 hrs.; se lavo 3 veces con PBS (Ph 7.2) formol al .3% y Tween 80 al 1%, se tomo el sobrenadante y se ajusto nuevamente con PBS (Ph 7.2), 1% de Tween 80, 0.2% de formol y se ajustó a una transmitancia del 80%.

Se utilizaron 4 conejos de la raza Nueva Zelanda, de aproximadamente 2 Kg.; los cuales fueron marcados con los números 1, 2, 3 y 4. Para la obtención del antisuero se inocularon los conejos 2, 3, y 4 con 0.5 ml con un antígeno completo de Corynebacterium pseudotuberculosis con Adyuvante Completo de Freund en proporción de 1:1, por vía subcutánea y se dejo el conejo número 1 sin inocular, el cual quedo como control negativo.

El calendario utilizado para la inmunización se muestra en el Cuadro 3.

CUADRO 3

| CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN | | | | | | |
|----------------------------|-----|-----|--------------|----------|----------|----------|
| C O N E J O S | | | | | | |
| SEMANA | DÍA | VÍA | 1 CONTROL | 2 (*) | 3 (*) | 4 (*) |
| 1 | 1 | SC | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 2 | 8 | SC | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 3 | 15 | SC | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 4 | 22 | SC | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 5 | 29 | SC | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

SC.- Subcutánea

(*) 0.5 ml del antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis con Adyuvante Completo de Freund en proporción de 1:1.

A cada uno de los conejos se les extrajo de 2 a 3 ml de sangre cada semana, a partir de la primera semana post-inoculación, hasta terminar con 5 sangrados.

La sangre extraída se colectó en tubos de ensaye, posteriormente se centrifugo a 2500 r.p.m./15 minutos para obtener el suero, y posteriormente se almacenó en viales estériles, previamente identificados (fecha y número de conejo), y se congelaron a 0°C, hasta su utilización.

2) TITULACIÓN DE LOS SUEROS

Los sueros de los conejos fueron titulados mediante la prueba de aglutinación lenta en tubo (modificado de Morilla 1986), la cual se describe a continuación.

1.- Previo a realizar la prueba, el antígeno y el suero se retiraron del refrigerador y se expusieron a temperatura ambiente por 30 min.

2.- En cada muestra se utilizaron 12 tubos Durham, para la realización de diluciones dobles.

3.- Se colocó 0.1 ml de PBS, a cada uno de los tubos Durham.

4.- Al primer tubo de cada una de las muestras se le colocó 0.1 ml del suero a titular con una jeringa insulínica.

5.- Se homogeneizó el primer tubo y con una micropipeta se tomó 0.1 ml el cual se colocó en el tubo número 2, se homogeneizó nuevamente, se volvió a tomar 0.1 ml y se pasó a el tubo número 3, y así sucesivamente hasta llegar al tubo número 12 y el 0.1 ml sobrante se desechó.

6.- Se agregó 0.1 ml del antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis a cada uno de los tubos Durham y se homogeneizó.

7.- Se dejaron los controles, tubo A con 0.1 ml de PBS, tubo B con 0.1 ml. de suero a titular y tubo C con 0.1 ml de antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis.

8.- Los tubos se incubaron a 37 °C, en una estufa bacteriológica, durante 48 hrs.

9.- Los resultados se leyeron al término de las 48 hrs.

Al obtener los resultados se eligió el suero del conejo con mayor título, para ser utilizado en la prueba.

**3) AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE
Corynebacterium pseudotuberculosis Y PRUEBA DE AGLUTINACIÓN
RÁPIDA EN PORTAOBJETO**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE Corynebacterium
pseudotuberculosis**

Se recolectaron muestras de abscesos de ovinos y caprinos en el Rastro de Ferrería y de casos clínicos sospechosos de L.C.

A partir de las muestras se realizó el aislamiento en agar sangre e identificación bioquímica de todos los microorganismos piógenos presentes en las mismas, de acuerdo a Cowan-Steel (1974) y Carter (1985).

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN PORTAOBJETO

Para poder realizar ésta prueba, se evaluaron previamente los siguientes controles:

CONTROLES NEGATIVOS:

- 1.- .03 ml. de antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis, más 1 gota de PBS.
- 2.- .03 ml. de antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis, más 1 gota de suero normal de conejo.
- 3.- .03 ml. de antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis.

CONTROL POSITIVO:

En otro portaobjeto se depositó una gota del antisuero y otra gota del antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis, se homogeneizaron ambas gotas, se observó al portaobjeto en la caja de fondo oscuro y a los 2 min. se empezaron a formar pequeños grumos, interpretándose el resultado, como positivo a la aglutinación.

PRUEBA DE TITULACIÓN

Es con la finalidad de detectar hasta que dilución o título es capaz el antisuero de reaccionar con el antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis, colocándose una gota del mismo en un portaobjeto, al cual se le adicionó una gota del antígeno de Corynebacterium pseudotuberculosis.

4) DETECCIÓN DE REACCIONES CRUZADAS

Se tomó por separado una colonia de Staphylococcus spp. y otra de Streptococcus spp., y con una asa de inoculación, se mezclaron con la gota del antisuero en un portaobjeto.

RESULTADOS

Se utilizaron 4 conejos marcados con los números 2, 3 y 4 (los que se inocularon), y con el número 1 (conejo control). Los 4 conejos se ubicaron en la misma jaula.

Los resultados de la titulación de los sueros se pueden observar en el Cuadro 4, los cuales están expresados en diluciones dobles y en logaritmo decimal, debido a que en la revisión bibliográfica se especifica de ésta manera. (Hard, 1970; Holstad, 1986; Holstad y col., 1988; Kuria y col., 1989; Larsen y col., 1988; Lund y col., 1982-A; Menzies y col., 1989; Pépin y col., 1989)

Los resultados muestran que los conejos presentan un título de 1:8 ($0.9 \log_{10}$), en la primer semana después de la inoculación. En la segunda semana los títulos alcanzados fueron de 1:8 ($0.9 \log_{10}$) en el conejo 2; de 1:64 ($1.8 \log_{10}$) en el conejo 3 y de 1:16 ($1.2 \log_{10}$) en el conejo 4.

En la tercer semana los títulos fueron de 1:64 ($1.8 \log_{10}$) en el conejo 2; en el conejo 3 de 1:128 ($2.1 \log_{10}$) y en el conejo 4 de

1:64 ($1.8 \log_{10}$). En esta semana se completaron 3 inoculaciones a cada conejo.

En la cuarta semana los conejos tenían 4 inoculaciones cada uno y sus títulos fueron de 1:128 ($2.1 \log_{10}$) en los conejos 2 y 3, y de 1:256 ($2.4 \log_{10}$) en el conejo 4.

En la quinta semana los conejos llevaban 5 inoculaciones cada uno, y sus títulos fueron de 1:256 ($2.4 \log_{10}$) conejo 2, 1:4096 ($3.6 \log_{10}$) conejo 3 y 1:2048 ($3.3 \log_{10}$) en el conejo 4.

En la gráfica No. 1, se observa la elevación de los títulos que presentaron los conejos inoculados y el control.

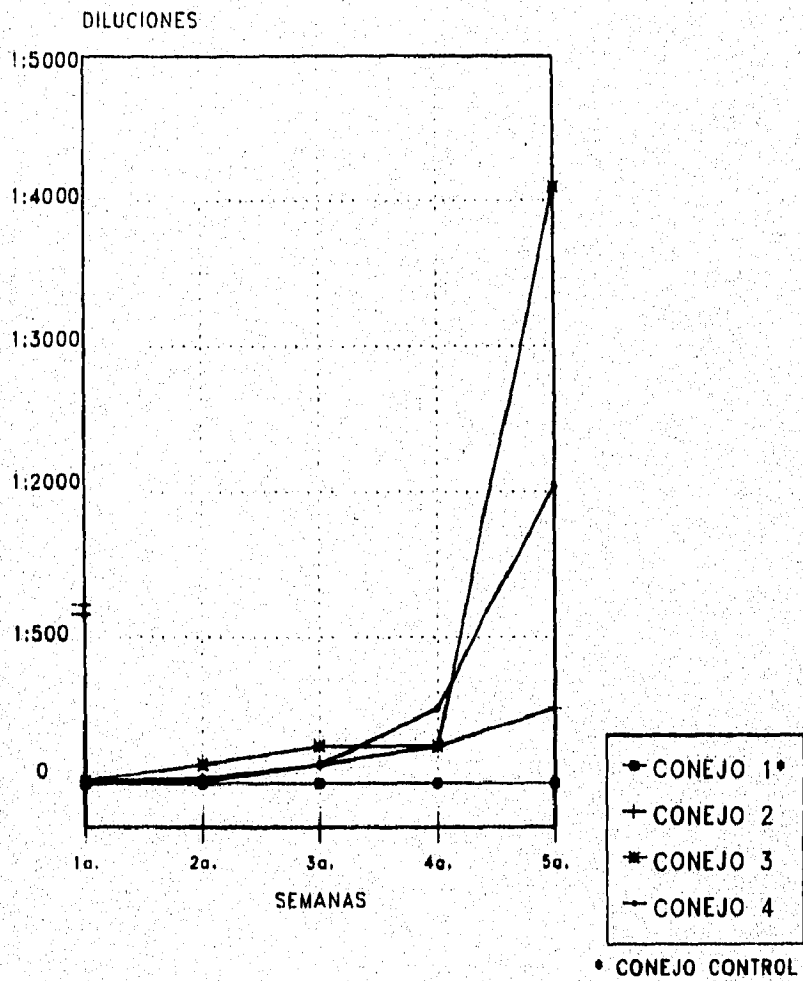
En la gráfica No. 2, se observa en forma logarítmica el promedio de titulación de los sueros de los conejos inoculados, donde se puede apreciar que el máximo título promedio fue de 3.6, en el conejo No. 3. por lo tanto se seleccionó el suero de éste conejo para la realización de las pruebas siguientes, por ser el título más alto, dilución doble 1:4096 ($3.6 \log_{10}$).

**TITULACIÓN DE LOS SUEROS DE CONEJO INOCULADOS CON EL ANTÍGENO DE
Corynebacterium pseudotuberculosis**

CUADRO 4
DILUCIONES DOBLES

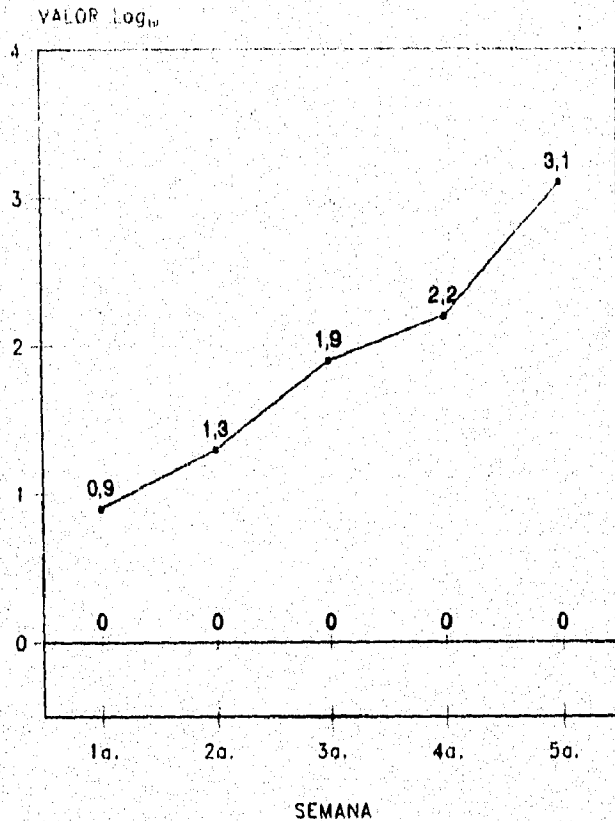
| CONEJO/SEMANA | 1° | 2° | 3° | 4° | 5° |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 (CONTROL) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 1:8 | 1:8 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |
| 3 | 1:8 | 1:64 | 1:128 | 1:128 | 1:4096 |
| 4 | 1:8 | 1:16 | 1:64 | 1:256 | 1:2048 |
| VALORES EN BASE Log. 10 | | | | | |
| 1 (CONTROL) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0.9 | 0.9 | 1.8 | 2.1 | 2.4 |
| 3 | 0.9 | 1.8 | 2.1 | 2.1 | 3.6 |
| 4 | 0.9 | 1.2 | 1.8 | 2.4 | 3.3 |
| PROMEDIO (2, 3 Y 4) | 0.9 | 1.3 | 1.9 | 2.2 | 3.1 |
| VALOR MÁXIMO | 1:8 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:4096 |
| VALOR MÍNIMO | 1:8 | 1:8 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |

TITULACION DE SUEROS DE CONEJOS
INOCULADOS CON *C. pseudotuberculosis*



GRAFICA 1

PROMEDIO DE TITULACION DE SUEROS DE
CONEJOS INOCULADOS CON
C. pseudotuberculosis
(EN BASE LOG₁₀)



← PROMEDIOS CONEJOS — CONEJO 1

GRAFICA 2

AISLAMIENTO DE CEPAS DE Corynebacterium pseudotuberculosis

A partir de las muestras de rastro fueron aisladas 13 cepas que fueron identificadas de acuerdo a sus características bioquímicas como Corynebacterium pseudotuberculosis (ver cuadro 5).

CUADRO 5

| IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <u>Corynebacterium pseudotuberculosis</u> A PARTIR DE MUESTRAS | |
|---|---------------------|
| AISLAMIENTO No. | IDENTIFICACIÓN CEPA |
| 1 | 8 |
| 2 | N |
| 3 | 2 |
| 4 | 4 |
| 5 | 7 |
| 6 | 5 |
| 7 | G |
| 8 | K |
| 9 | M |
| 10 | D |
| 11 | F |
| 12 | E |
| 13 | A |

PRUEBA DE TITULACIÓN

En esta prueba se pretendió establecer hasta que dilución del suero era posible apreciar aglutinación.

La aglutinación se detectó en la dilución 1:64.

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN PORTAOBJETO

Las cepas aisladas de Corynebacterium pseudotuberculosis fueron puestas en contacto con el antisuero para la realización de la prueba de aglutinación en portaobjetos, y los resultados se aprecian en el cuadro 6.

CUADRO 6
 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN PORTAOBJETO CON LAS
 CEPAS DE Corynebacterium pseudotuberculosis AISLADAS DE MUESTRAS
 DE RASTRO

| CEPA DE <u>Corynebacterium pseudotuberculosis</u> | AGLUTINACIÓN | CONTROL <u>Corynebacterium pseudotuberculosis</u> |
|--|--------------|--|
| 8 | DUDOSA | + |
| N | DUDOSA | + |
| 2 | + | + |
| 4 | + | + |
| 7 | + | + |
| 5 | + | + |
| G | DUDOSA | + |
| K | + | + |
| M | + | + |
| D | + | + |
| F | + | + |
| E | + | + |
| A | + | + |

+: Se observan grumos (aglutinación).

DUDOSA: La aglutinación no se percibe con claridad.

El promedio del tiempo de aglutinación fue de 5 min.

DETECCIÓN DE REACCIONES CRUZADAS

Para ello se hizo reaccionar el antisuero producido con las cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis, Staphylococcus spp. Streptococcus spp., y los resultados aparecen en el siguiente cuadro.

CUADRO 7

| REACCIONES CRUZADAS | | |
|---|-----------|-----------------|
| | ANTISUERO | SOLUCIÓN SALINA |
| <u>Corynebacterium pseudotuberculosis</u> | + | - |
| <u>Staphylococcus</u> spp. | - | - |
| <u>Streptococcus</u> spp. | - | - |

Como podrá observarse el antisuero reaccionó únicamente con Corynebacterium pseudotuberculosis, por lo cual se consideró viable para ser utilizado en la prueba de aglutinación de portaobjeto.

DISCUSIÓN

Recientemente se han introducido en el mercado una serie de Kits de diagnóstico, que tienen como finalidad la identificación rápida de diferentes microorganismos, por ejemplo la prueba de aglutinación de látex en portaobjeto para Staphylococcus aureus producida por J. & Medical Associates Inc. USA y la prueba de aglutinación para Pseudomona aeruginosa, producida por Rougier Brotech Ltd. Es por esto que el presente trabajo trató de incursionar en el logro de un método rápido para la identificación de Corynebacterium pseudotuberculosis, con ahorro de tiempo y medios de cultivo; mediante una prueba sencilla de aglutinación en portaobjeto, teniendo como antecedente el empleo de esta prueba en forma experimental por investigadores de otros países. (Augustine, 1986; Brogden y col., 1984-B; Cameron y col., 1972; Cameron y col., 1973; Holstad y col., 1988; Lund y col., 1982-A; Morales, 1992)

En base a los resultados obtenidos se pudo observar que después de la primera inoculación via subcutánea con un antígeno completo de Corynebacterium pseudotuberculosis con Adyuvante Completo de Freund en proporción de 1:1, en los conejos; los sueros tuvieron un título de 1:8 ($0.9 \log_{10}$), alcanzando en la quinta semana 1:4096 ($3.6 \log_{10}$); comparando este trabajo con el realizado

por Morales (1992), en el cual evalúa una bacterina de Corynebacterium pseudotuberculosis empleando varias pruebas, entre ellas una modificación de la prueba de aglutinación lenta en tubo, muestra como resultado de la primera inoculación en cuyes vía subcutánea 1:128 (2.1 log₁₀), alcanzando en la quinta inoculación un título de 1:4096 (3.6 log₁₀), lo cual indica que no hubo variación en los resultados aún cuando se emplearon antígenos bacterianos sometidos a diferentes tratamientos con una sola característica en común, la presencia de tween 60 en ambos para ejercer un efecto dispersor del crecimiento en acumulos que tiende a presentar Corynebacterium pseudotuberculosis y puede interferir con la respuesta inmune.

Para la elaboración del antígeno, se utilizó una cepa de Corynebacterium pseudotuberculosis obtenida a partir de un caso clínico, sin embargo fueron utilizadas para la realización de la prueba de aglutinación 13 cepas diferentes aisladas a partir de muestras de rastro; lo cual nos indica que existen propiedades antigénicas semejantes en todas las cepas independientemente de su origen. Hay reportes de diferencias en cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis en base a propiedades bioquímicas (biotipos nitratos + y biotipos nitratos -); y en lo referente a

toxigenicidad, su composición antigénica en base a pared celular es similar en todas las especies.

El antisuero producido tiene utilidad para la identificación de Corynebacterium pseudotuberculosis mediante la prueba de aglutinación y puede diferenciarlo de otros plógenos Gram positivos que pueden estar involucrados en producción de abscesos en los animales, como son especies del género Streptococcus y Staphylococcus, como se pudo apreciar en las pruebas de aglutinación que dieron resultados negativos con estas bacterias; sin embargo es posible que el antisuero pueda reaccionar con otras especies del género Corynebacterium, puesto que todas comparten características antigénicas en pared celular que también son semejantes a otros géneros bacterianos, por lo cual fueron incluidos en el grupo CMNR (Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia y Rhodococcus) debido a esto, las reacciones cruzadas suceden también en otro tipo de pruebas diagnósticas, en las que se incluyen estos microorganismos, como en el caso de la Johnina, que puede dar reacciones falsas (+) cuando el animal está infectado con Corynebacterium, debemos considerar además que tenemos la ventaja de que son muy pocas especies diferentes a Corynebacterium pseudotuberculosis que pueden causar infecciones en pequeños rumiantes de la importancia económica de la Linfadenitis Caseosa.

Los resultados de este trabajo pueden dar también la pauta para utilizar la prueba en forma inversa, produciendo el antígeno para trabajar con sueros procedentes de animales sospechosos y realizar una prueba semejante a la de tarjeta para el diagnóstico de Brucelosis.

CONCLUSIÓN

1.- La prueba de aglutinación es útil, para la identificación de Corynebacterium pseudotuberculosis a partir de cultivos puros.

2.- No existen reacciones cruzadas con Streptococcus y Staphylococcus, pero es posible que existan con especies del género Corynebacterium, puesto que todas comparten características antigénicas.

3.- Otro paso para tener mayor especificidad en la prueba sería emplear la técnica de inmunolectrotransferencia para determinar específicamente los antígenos de Corynebacterium pseudotuberculosis, que reconoce el suero.

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

- 1.- Abdel-Hamid, Y. M.; (1975); The use of mouse protection tests in the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep; Research in Veterinary Science; 18: 223-224.
- 2.- Aja, C., Coa, J., Denos, S.; (1980); Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence; Veterinary Record; 107: 421-424.
- 3.- Augustine, J., Renshaw, H.; (1986); Survival of Corynebacterium pseudotuberculosis in axenic purulent exudate on common barnyard fomites; Am. J. Vet. Res.; 47 (4): 713-715.
- 4.- Augustine, J.; (1986); Bacteriologic, Ecologic, Serologic and immunogenetic studies of Corynebacterium pseudotuberculosis induced Caseous Lymphadenitis in small Ruminants; Dissertation Abstracts International; 46 (8): 2512B-2513B.
- 5.- Anderson, V., Nairn, M.; (1984); Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination; Ed. INRA Publ; Les Colloques de l'INRA, (28): 605-609.

- 6.- Batey, R.; (1986); Pathogenesis of Caseous Lymphadenitis in sheep and goats; Australian Veterinary Journal; 63 (9): 269-272.
- 7.- Brogden, K., Cutlip, R., Lehmkuhl, H.; (1984-A); Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis infection in lambs; Am. J. Vet. Res.; 45 (8): 1532-1534.
- 8.- Brogden, K., Cutlip, R., Lehmkuhl, H.; (1984-B); Comparison of protection induced in lambs by Corynebacterium pseudotuberculosis whole cell and cell wall vaccines; Am. J. Vet. Res.; 45 (11): 2393-2395.
- 9.- Brogden, K., Chedid, L.; Cutlip, R., Lehmkuhl, H., Sacks, J.; (1990); Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of Corynebacterium pseudotuberculosis whole-cell vaccines in mice and lambs; Am. J. Vet. Res.; 51 (2): 200-202.
- 10.- Brown, C., Olander, H., Biberstein, E., Moreno, D.; (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.

- 11.- Brown, C., Olander, H., Biberstein, E., Morse, S.; (1986-A);
Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal
challenge exposure to Corynebacterium pseudotuberculosis; Am.
J. Vet. Res.; 47 (5) :1116-1119.

- 12.- Brown, C., Olander, H., Zometa, C., Alves, S.; (1986-B);
Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and
sheep, using the synergistic hemolysisinhibition test; Am. J.
Vet. Res.; 47 (7): 1461-1463.

- 13.- Brown, C., Olander, E.; (1987); Caseous Lymphadenitis of goats
and sheep; A. Review. Vet. Bull.; 57 (1): 1-9.

- 14.- Burrel, D.; (1978); Experimental induction of Caseous
Lymphadenitis in sheep by Intralymphatic inoculation of
Corynebacterium ovis; Research in Veterinary Science; (24):
269-276.

- 15.- Burrel, D.; (1980-A); In vitro direct haemagglutination by
Corynebacterium ovis exotoxin; Research in Veterinary Science;
(28): 51-54.

- 16.- Burrel, D.; (1980-B); A haemolysis inhibition test for detection of antibody to Corynebacterium ovis exotoxin; Research in Veterinary Science; (28): 190-194.
- 17.- Burrel, D.; (1980-C); A simplified double immunodiffusion technique for detection of Corynebacterium ovis antitoxin; Research in Veterinary Science; (28): 234-237.
- 18.- Cameron, C., Smit, C., (1970); Relationship of Corynebacterium pseudotuberculosis protoplasmatic toxins to the exotoxin; Onderstepoort J. Vet. Res.; 37 (2): 97-104.
- 19.- Cameron, C., Minnaar, J., Engelbrecht, M., Purdom, M.; (1972); Immune response of merino sheep to inactivated Corynebacterium pseudotuberculosis vaccine; Onderstepoort J. Vet. Res.; 39 (1): 11-24.
- 20.- Cameron, C., Fuls, W.; (1973); Studies on the enhancement of immunity to Corynebacterium pseudotuberculosis; Onderstepoort J. Vet. Res.; 40 (3): 105-114.

- 21.- Cameron, C., Bester, F.; (1984); An improved Corynebacterium pseudotuberculosis vaccine for sheep.; Onderspoort J. Vet. Res.; 51 (4): 263-267.
- 22.- Carter, R., Chengapa M.; (1991); Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology; 4a ed.; Edit. Lea Febiger, London.
- 23.- Chikamatsu, S., Zhao, H-K., Kikuchi, N., Hiramune, T.; (1989); Seroepidemiological Survey of Corynebacterium pseudotuberculosis Infection in Sheep in Japan using Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Immunodiffusion.; Jpn. J. Vet. Sci. 51 (5): 887-891.
- 24.- Cowan, T., Steel, J.; (1979); Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Medica; 1a. ed.; Edit. CECSA.
- 25.- Ellis, J.; (1983); Ovine Caseous Lymphadenitis; Continuing Education Article; No. 10, 5; (9): 362-368.
- 26.- Ellis, J.; (1988); Immunophenotype of Pulmonary Cellular Infiltrates in Sheep with Visceral Caseous Lymphadenitis; Vet. Pathol.; (25): 362-368.

- 7.- Ellis J.; Hawr, D.; Holler, L.; Mills, K.; Pratt, D.; (1990); Differential antibody responses to Corynebacterium pseudotuberculosis in sheep with naturally acquired Caseous Lymphadenitis; JAVMA; 196 (10): 1609-1613.
- 28.- Favier, B., Richard, Y., Oudar, J., Borges, E.; (1990); Étude bactériologique de 58 souches de Corynebacterium pseudotuberculosis; Note 1: Intérêt d'une microméthode (Système API 50 CH) pour l'étude du métabolisme fermentatif; Revue Méd. Vét.; 141 (1): 43-47.
- 29.- Gavin, S., Leonard, R., Briselden, A., Coyle, M.; (1992); Evaluation of the Rapid CORYNE Identification System for Corynebacterium Species and Other Coryneforms; Journal of Clinical Microbiology; 30: (7) 1692-1695.
- 30.- García, S.; (1980); Aislamiento y caracterización de Corinebacterias de ovinos y caprinos en México; Tesis Profesional; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.
- 31.- García, S., Ciprián C.; (1980); Principales enfermedades de los ovinos y caprinos, "Linfadenitis Caseosa"; 1a. ed; Ed. P. Pijoan y J. Tórtora; pp. 235-239.

- 32.- Gillespie, J., Timoney, J.; (1983); Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos; 4a. ed; Ed. Prensa Mexicana; pp. 213-216.
- 33.- Gilmour, N.; (1990); Caseous Lymphadenitis: A cause for concern; Vet. Rec.; 566.
- 34.- González, J., Cano L., Tórtora J.; (1989); Prevalencia de lesiones sugestivas de Linfadenitis Caseosa en caprinos en dos sistemas de manejo productivo en Izúcar de Matamoros, Pue.; Memorias del VI Congreso Nacional AZTECA; 38-40.
- 35.- Guilloteau, L., Pépin, M., Pardon, P., Le Pape, A., (1990); Recruitment of ^{99m}Techetium- or ¹¹¹Indium-Labelled Polymorphonuclear Leucocytes in Experimentally Induced Pyogranulomas in Lambs; Journal of Leukocyte Biology; (48):343-352.
- 36.- Hard, G.; (1970); Adoptive transfer of immunity in experimental Corynebacterium ovis infection; J. Comp Path.; (80): 329-334.

- 37.- Hard, G.; (1975); Comparative toxic effect of the surface lipid of Corynebacterium ovis on peritoneal macrophages infection and immunity.; J. Comp Pathol, 12 (6): 1439-1444.
- 38.- Holstad, G.; (1986); Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats. I Evaluation of two serological diagnostic test; Acta Veterinaria Scandinavica; 27 (4): 575-583
- 39.- Holstad, G.; (1987); Corynebacterium infections in domestic animals, and immunoprophylactic measures; Acta Vet. Scand.; 99 (1); 15-21
- 40.- Holstad, G., Teige, J.; (1988); Corynebacterium pseudotuberculosis infection in goats. VII; Acta Vet. Scand.; (29): 287-294.
- 41.- Harker B., Taylor K.; (1990); MAFF update on Caseous Lymphadenitis; The Veterinary Record; 517.
- 42.- Hsu, T.; (1984); Caseous Lymphadenitis in small ruminants; Clinical, pathological and immunological responses to Corynebacterium pseudotuberculosis and to fractions and toxins from the microorganism; Phisiology; 1396 B.

- 43.- Hsu, T., Renshaw, W.; (1985); Corynebacterium pseudotuberculosis exotoxin: Fatal haemolytic anemia induced in gnotobiotoc neonatal small ruminants by paternal administration of preparations containing exotoxin; Am. J. Vet. Res.; 46: (5).
- 44.- Jubb, F., Kennedy, C.; (1982); Patologia de los animales domésticos; Tomo I; 1a. ed; Ed. U.P.O.M.E.; pp. 440-442.
- 45.- Kuria, J., Holstad, G.; (1989); 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.
- 46.- Langenegger, C., Langenegger, J., Costa, S.; (1986); An allergen for the diagnosis of Caseous Lymphadenitis in goats; Pesq. Vet. Bras., 7 (2): 27-32.
- 47.- Langenegger, C., Langenegger, J.; (1991); Serologic and allergic monitoring of experimental infections in goats by Corynebacterium pseudotuberculosis; Pesq. Vet. Bras., 11 (1/2): 1-7.

- 48.- Laak, E; Bosch, J.; Konin, C.; Ter-Laak, E; (1988); Caseous Lymphadenitis in goats in the Gelderland province of the Netherlands; Tijdschrift-voor. Diergeneeskunde; 113 (24): 1362-1365.
- 49.- Laak, E; Schreuder, B.; (1991); Serological diagnosis of Caseous Lymphadenitis in goats and sheep; Veterinary Record; 128 (18): 436.
- 50.- Larsen, J., Moksnes, K., Øvernes, G.; (1988); Influence of Selenium on antibody production in sheep; Research in Veterinary Science; (45): 4-10.
- 51.- LeaMaster B., Shen D., Gorham J., Leathers C., Wells H.; (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.
- 52.- Lindsay, H., Lloyd, S.; (1991); Diagnosis of Caseous Lymphadenitis in goats; Veterinary Record; 128: 86.

- 53.- Lloyd, S., Lindsay, H., Slater, J., Jackson, P.; (1990);
Caseous Lymphadenitis in goats in England; Veterinary Record;
127: 478.
- 54.- Lund, A., Almlid, T., Larsen, H., Steine, T.; (1982-A);
Antibodies to Corynebacterium pseudotuberculosis in adult
goats from a naturally infected herd; Acta Vet. Scand; (23):
473-482.
- 55.- Lund, A.; Almlid, T.; Steine, T.; Larsen, H.; (1982-B);
Colostrum transfer in the goat of antibodies against
Corynebacterium pseudotuberculosis and the antibody status of
kids during the first 10 months of life; Act. Vet. Scand.;
(23): 483-489.
- 56.- Menzies, P., Muckle, A.; (1989); The Use of a
Microagglutination Assay for the Detection of Antibodies to
Corynebacterium pseudotuberculosis in Naturally Infected Sheep
and Goat Flocks; Can. J. Vet. Res.; (53): 313-318.
- 57.- Middleton, M., Epstein, V., Gregory, G.; (1991); Caseous
Lymphadenitis on Flinders Island prevalence and management
surveys; Australian Veterinary Journal; 68:9; 311-312

- 58.- Morales, J.; (1992); Evaluación de un antisuero para la identificación de Corynebacterium ovis; Tesis Profesional; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.
- 59.- Morrilla, J., Bautista, G.; (1986); Manual de Inmunología; Ed. Diana; pp. 195-199.
- 60.- Muckle, C., Gyles, C.; (1983); Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of Corynebacterium pseudotuberculosis in mice; Am. J. Vet. Res.; 44; (6): 1149-1153.
- 61.- Nakamura, K., Momotani, E. Yokomizo, Y, Yugi, H., Shoya, S.; (1981); Pathological changes in sheep infected with Corynebacterium pseudotuberculosis; Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn); (21): 150-151.
- 62.- Navarrete, S.; (1988); Obtención de toxina a partir del aislamiento de Corynebacterium ovis; Tesis Profesional; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 63.- Ocampo, J.; (1991); Elaboración de una bacterina de Corynebacterium ovis; Tesis Profesional; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.
- 64.- Paton, M., Mercy, A., Sutherland, S., Ellis, T.; (1988); The influence of shearing and age on the incidence of Caseous Lymphadenitis in Australian sheep flocks; Acta Vet. Scand; (84); 101-103.
- 65.- Paton, M., Mercy, A., Sutherland, S., Ellis, T., Duda S.; (1991); The effect of antibody to Caseous Lymphadenitis in ewes on the efficacy of vaccination in lambs; Australian Veterinary Journal; 6; (4): 143-146.
- 66.- Pépin, M., Pardon, P., Marly, J., (1987); Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep and the Complement Fixation Test for Paratuberculosis; Veterinary Record; (120): 236.
- 67.- Pépin, M., Pardon, P., Marly, J., Lantier, F.; (1988); Corynebacterium pseudotuberculosis infection in adult ewes by inoculation in the external ear; Am. J. Vet. Res.; 49; (4): 459-463.

- 68.- Pépin, M., Boisramé, A., Marly, J.; (1989); Corynebacterium pseudotuberculosis: Biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains; Ann. Rech. Vét.; (20): 111-115.
- 69.- Pépin, M., Pardon, P., Lantier, F., Marly, J., Levieux, D., Lamand, M.; (1991); Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation; Veterinary Microbiology; (26): 381-392.
- 70.- Redondo E.; Roncero V.; Moiano M.; (1988); Consideraciones sobre la Pseudotuberculosis ovina.; Acta Med. Vet.; (34): 191-198.
- 71.- Renshaw, H., Graff, V., Gates, N.; (1979); Visceral Caseous Lymphadenitis in Thin Ewe Syndrome: Isolation of Corynebacterium, Staphylococcus and Moraxella spp. from Internal Abscesses in Emaciated Ewes; Am. J. Vet. Res.; 40(8):1110-1113.

- 72.- Ribeiro, O., Silva, J., Maia, P., Campos, W.; (1988); Evaluation of an inactivated vaccine against Caseous Lymphadenitis of goats kept under extensive management; *Pesq. Vet. Bras.* 8 (1/2): 27-29.
- 73.- SantaRosa, J., Johnson, E., Alves, F., Santos, L.; (1989); A retrospective study of hepatic abscesses in goats: Pathological and Microbiological findings; *Br. Vet. J.*; (145):73-76.
- 74.- Schreuder, B.; (1990); *Corynebacterium pseudotuberculosis* in milk of CL affected goats; *Veterinary Record*; 387.
- 75.- Shigidi, M.; (1978); An indirect haemagglutination test for the sero-diagnosis of *C. ovis* infection in sheep; *Research in Veterinary Science*; (24): 57-60.
- 76.- Shigidi, M.; (1979); A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep; *Br. Vet. J.*; 135 (2): 172-177.

- 77.- Siddik, I., Ghaneimak, S., Barakat, A., Nafie, E., Saber, M.; (1987); Studies on the growth products of C. ovis of different sources with special reference to toxin production; Veterinary Medical Journal; 18 (35): 127-133.
- 78.- Sutherland, S., Ellis, T., Mercy, A., Paton, M., Middleton, H.; (1987-A); Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the detection of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep; Australian Veterinary Journal; 64 (9): 263.
- 79.- Sutherland, S., Paton, M., Mercy, A., Ellis, T.; (1987-B); A reliable method for establishing Caseous Lymphadenitis infection in sheep; Australian Veterinary Journal; 64 (10): 323-324.
- 80.- Sutherland, S., Speijers, E. Andres, B.; (1989); Comparison of the exotoxins of four strains of Corynebacterium pseudotuberculosis; Research in Veterinary Science; (47): 190-194.

81.- Tashjian, J., Campbell, S.; (1983); Interaction between caprine macrophages and Corynebacterium pseudotuberculosis: An electron microscopy study; Am. J. Vet. Res.; 44 (4): 690-693.

82.- Tizard I.; (1985); Inmunología Veterinaria; Edit. Interamericana; Mexico, 2ª ed.