



11622
1
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis INVOLUCRADAS
EN LAS PRESENTACIONES DE LA LINFADENITIS
CASEOSA**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS**

PRESENTA

JUAN SEBASTIÁN BARRIENTOS PADILLA

TUTOR:

Dr. JORGE TÓRTORA PÉREZ

COMITÉ TUTORAL:

**Dr. EFRÉN DÍAZ APARICIO
Dr. GUILLERMO VALDIVIA ANDA**

CUAUTITLAN IZCALLI EDO. MÉX.

2002

7



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.

**PAGINACION
DISCONTINUA**



ACADEMIA NACIONAL
AZTECA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
COORDINACIÓN GENERAL DEL PROGRAMA
DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
SECRETARIA TÉCNICA DEL PROGRAMA
DE PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

OFICIO/FES-C/STPPySA/676/VIII/2002

ASUNTO: Designación de Jurado.

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DE POSGRADO
DE LA DIRECCION GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
Presente.

El Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal autoriza al alumno **JUAN SEBASTIAN BARRIENTOS PADILLA**, con número de expediente **100981025** y número de cuenta **8501078-1**, para presentar su examen de grado de la **Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**, con la tesis titulada "**Caracterización de las cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis involucradas en las dos presentaciones de la linfadenitis caseosa (cutánea y visceral)**" a quien se le ha designado el siguiente jurado:

Presidente:	DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
Vocal:	DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA
Secretario:	M. C. LAURA JARAMILLO MEZA
Primer Suplente:	DR. JORGE TORTORA PEREZ
Segundo Suplente:	DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 1 de agosto del 2002.


DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
COORDINADOR GENERAL

C.c.p. Exp. de alumno
C.c.p. Archivo
FSG/HRA/mrc

B



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

**Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES-Cuautitlán
Presente.**

Por medio de este conducto nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada **"Caracterización de las cepas de Corynebacterium pseudotuberculosis involucradas en las dos presentaciones de la linfadenitis caseosa (cutánea y visceral)"** que presenta el alumno con el número de cuenta **8501078-1** y con el número de expediente **100981025** para obtener el grado de **Maestro en Ciencias**. Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

**Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

_____ a _____ de _____ del _____

NOMBRE DE LOS SINODALES

Presidente: **DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES**

Vocal: **DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA**

Secretario: **M.C. LAURA JARAMILLO MEZA**

Primer Suplente: **DR. JORGE TORTORA PEREZ**

Segundo Suplente: **DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO**

Q

Después de pasar una etapa muy dura en mi vida y renegar de DIOS, ¿por qué a mi? ¿Dónde estaba cuando lo necesite?.....sigo pensando sin lugar a dudas que a DIOS lo creó el hombre, debido a la necesidad de creer en algo por no tener la fuerza de creer en sí mismo y necesitar de algo o alguien para seguir adelante.

Pasaron ya algunos años de esto y pese a todo me doy cuenta que existe "algo" o "alguien", si se le puede llamar DIOS que así se le llame, creo en mi, me conozco pero algo es cierto, el sentir la presencia de "algo" o "alguien" tranquiliza mucho y te ayuda a superar las cosas.

Hoy después de varios años de ausencia solamente quiero decir:

"GRACIAS DIOS"

A Francisco Barrientos González
Mi padre

Gracias por enseñarme a tratar de ser perfecto en todo y por encima de todo el sentido de responsabilidad.....te quiero mucho papá, desde aquí un abrazo y un beso.

A Teresa Padilla Sotelo
Mi madre

Amada madre te agradezco el enseñarme a amar con pasión, sin límites, sin miedos y sobre todo el enseñarme a disfrutar las cosas de la vida.....por todo eso gracias mami.

**A Mariana y Angel
Mis hermanos**

Porque pase lo que pase y a pesar de lo diferentes que somos, hemos aprendido de mis padres que somos una familia y siempre estaremos juntos apoyándonos.....los quiero mucho.

Gracias papá y gracias mamá, porque sus enseñanzas me han ayudado a ser un hombre de bien y las he podido aplicar a mi vida cotidiana, pero también me enseñaron con todo eso que es maravilloso ser un imperfecto, que algunas ocasiones es saludable ser un poco irresponsable, que las cosas se disfrutan y se comparten, pero también el dolor es bueno, hay que disfrutarlo y sobre todo aprender de él y por encima de todas las cosas a amarme a mí mismo; Con esto termino de cerrar un círculo de mi vida muy doloroso y saben a lo que me refiero, toque fondo, fui un títere de mí mismo y no fue hasta que me encontré conmigo que pude salir poco a poco y aprender de todo esto, después de todo si quedo algo hermoso de esto que hoy se cierra, alguien a quien amo con toda mi alma.....MITZLI.

**Norhan Cortes Fernández de Arcipreste
Mi futura esposa:**

Primero le doy gracias a DIOS por permitir que te cruzaras en mi camino y después por amarnos. ¿Sabes? El sentimiento de amor es tan reconfortante y más cuando es mutuo, olvídate de todos tus miedos, entrégate, disfrútalo, recuerda que la vida esta hecha de momentos y aquí estoy yo y estaré por siempre a tu lado, te amo no porque seamos uno solo, si no porque juntos seguimos siendo dos.

A Mitzli Barrientos Moreno
Mi amada hija

Mitzli, solo quiero plasmar aquí unas palabras que espero te sirvan algún día como a mí me sirvieron, recuerda que siempre que me necesites ahí estaré:

Hija, tú eres el resultado de ti misma. No culpes a nadie, nunca te quejes de nada y ni de nadie, porque fundamentalmente tu has echo tu vida.

Acepta la responsabilidad de edificarte a ti misma y el valor de acusarte en el fracaso para volver a empezar corrigiéndote.

Nunca te quejes del ambiente o de los que te rodean, hay quienes en tu ambiente supieron vencer las circunstancias buenas o malas según la voluntad o fortaleza de su corazón, aprende a convertir toda situación difícil en un arma para luchar.

No te quejes de tu pobreza, de tu soledad o de tu muerte. Enfrentate con valor y acepta que de una u otra manera son el resultado de tus actos y prueba que has de ganar.

No te cargues con tu propio fracaso, ni se lo cargues a otro, acéptate ahora o seguirás justificándote como niña, recuerda que cualquier momento es bueno para comenzar y que ninguno es tan terrible para claudicar.

Deja de engañarte, eres la causa de ti misma, de tu necesidad, de tu dolor, de tu fracaso, si tu has sido ignorante e irresponsable, nadie pudo haber sido por ti.

No olvides que la causa de tu presente es tu pasado como la causa de tu futuro es tu presente. Aprende de los fuertes, de los audaces, imita a los valientes, a los enérgicos, a los vencedores, a quienes no aceptan situaciones, a quienes vencieron a pesar de todo.

Piensa menos en tus problemas y más en tu trabajo y tus problemas sin alimento morirán. Aprende a nacer desde el dolor y a ser más grande, que es el más grande de los obstáculos, mirate en el espejo de ti misma.

Comienza a ser sincera contigo, reconócete libre y fuerte y dejaras de ser un títere de las circunstancias, porque tu misma eres tu destino, nunca pienses en la suerte porque la suerte es el pretexto de los fracasados.

Con todo mi amor.....tú papá.

A Cynthia González Ruiz.

Mi amiga:

Que bueno es tenerte, que bueno que nos conocemos, que bueno que somos amigos, porque los dos juntos hacemos un solo equipo, podría decirte tantas cosas, sin embargo.....

A Juan Carlos del Río García.

Mi amigo:

Porque la vida nos ha hecho vivir cosas muy similares, por estar en el momento justo cuando se necesita con las palabras precisas para ayudarlo a uno a encontrar su lugar.....

A Jorge Alfredo Cuellar Ordaz.

Mi amigo:

Solo quiero decirte que eres mi ejemplo a seguir, te admiro mucho, que en gran medida parte de lo que soy te lo debo a ti, nunca cambies.....

.....sabiendo que no existirá una forma de pagarles, quiero decirles que este logro también es suyo y que a veces los amigos se separan para crecer juntos.....GRACIAS.

Dr. Jorge Tórtora Pérez.

Dr. Guillermo Valdivia Anda.

Por todo el apoyo que me brindaron para culminar este trabajo y por todas sus enseñanzas, solo me resta decirles..... GRACIAS y que:

**“EN CUALQUIER LUGAR QUE ME ENCUENTRE Y ESTE CON
QUIEN ESTE, SIEMPRE SERE DE PIEL DORADA Y DE SANGRE
AZUL”**

Resumen

La linfadenitis caseosa presenta dos diferentes manifestaciones clínicas, la cutánea y la visceral, el agente etiológico es *Corynebacterium pseudotuberculosis* y existe la posibilidad, aunque no se ha demostrado, que las cepas involucradas presenten diferencias en los factores de virulencia involucrados. Con el fin de encontrar diferencias en los factores de virulencia, se colectaron 241 (n=189) muestras de borregos con presentaciones clínicas de linfadenitis caseosa (cutánea 106 y visceral 135). Se tomaron muestras de diferentes órganos encontrando el linfonodo parotideo (61%) y el pulmón (64%) como los órganos más afectados en cada presentación respectivamente. Se procedió al aislamiento e identificación, se trabajó la caracterización bioquímica y la electroforesis de la envoltura y proteínas internas para su identificación, así mismo se realiza el análisis de Western blott contra sueros de conejo previamente inmunizados con los biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Se encontraron dos biotipos relacionados con la fermentación de la glucosa (Glu), galactosa (Gal) y maltosa (Mal), existiendo diferencias significativas ($p < .05$) entre Glu⁺ - Gal⁻ en aislamientos viscerales y Glu⁻ - Gal⁻ en cutáneos. Los patrones de las proteínas en la electroforesis fueron los mismos para todas las cepas. Las diferencias observadas parecen estar relacionadas a la patogenia de la bacteria, involucradas en la entrada y mayor diseminación observada para la presentación visceral y el pequeño papel del serotipo en las presentaciones clínicas de la enfermedad.

Abstract

The cases of lymphadenitis disease presents two kinds of clinical manifestations, cutaneous and visceral and caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and exists the possibility, although it is has not proved, that the strains involved has differences in the virulence factors. In order to find, the virulence factors differences 241 (n=189) samples were taken from sheep with clinical sings of the disease (106 cutaneous, and 135 viceral). The samples were taken from different organs, and the most damaged were the lungs and parotid lymphatic ganglions. Isolation and identification were the next procedure, biochemical characterization and electrophoresis of the enveloped and internals proteins were taken for the identification also western blott analysis for rabbit serum previously immunized with *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. Two biotypes related with glucose (Glu), maltose (Mal) and galactose (Gal) fermentation significant differences were found within Glu⁺-Gal⁻ in visceral samples and Glu⁻-Gal⁻, in cutaneous samples. The protein pattern in the electrophoresis test were the same for all the strains. The differences seems to be related with the bacterial pathogenesis, involved in the infection process and the dissemination in visceral presentation, and the small role developed by serotype in the clinical presentation.

Indice

	Pagina
Introducción.....	1
Justificación.....	17
Hipótesis.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares.....	18
Materiales y métodos.....	19
Resultados.....	30
Discusión.....	42
Conclusiones.....	50
Bibliografía.....	51

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Calendario de inmunización en conejos para la prueba de inmunotransferencia.	28
Cuadro 2. Muestras de lesiones sugestivas de linfadenitis caseosa obtenidas de animales provenientes de ranchos y de rastro.	30
Cuadro 3. Muestras obtenidas por órganos de cada presentación clínica.	31
Cuadro 4. Aislamientos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> de las muestras de ovino trabajadas.	31
Cuadro 5. Velocidad de crecimiento de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en caldo Todo-Hewitt y caldo brucela.	32
Cuadro 6. Viabilidad de cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en diferentes métodos de conservación.	33
Cuadro 7. Resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	34
Cuadro 8. Relación de las pruebas bioquímicas variables de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> con el órgano de procedencia.	35
Cuadro 9. Análisis estadístico de la presentación cutánea y visceral, con los tres carbohidratos variables.	35
Cuadro 10. Frecuencias de los diferentes biotipos.	36
Cuadro 11. Diferentes biotipos y sus frecuencias en la presentación cutánea y visceral.	37
Cuadro 12. Unidades de fosfolipasa D (UFLD) que bloquean el efecto de 2 UH de <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan 1.	38

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Curva de crecimiento en caldo brucela para <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	32
Figura 2. Gráfica de frecuencias de los diferentes biotipos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	36
Figura 3. Frecuencias cutánea y visceral de los diferentes biotipos.	37
Figura 4. Corrimiento electroforético de las cepas de la presentación cutánea y visceral.	40
Figura 5. Inmunotransferencia de cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	41

Introducción

La linfadenitis caseosa (LC) de cabras y borregos es una enfermedad crónica causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caracterizada por supuración e inflamación de uno o más linfonodos. La enfermedad está presente en muchas partes del mundo, especialmente en las áreas de cría de pequeños ruminantes y es un problema que causa pérdidas económicas importantes en la producción. La información confiable sobre la incidencia y prevalencia de esta enfermedad es escasa debido a su carácter endémico y su naturaleza subclínica (1,2,3,4,5,6,7).

Las pérdidas económicas debidas a LC son variables y más severas cuando se presenta la forma visceral, cuando están presentes los abscesos internos ocurre un decremento en la eficiencia reproductiva además de resultar en la pérdida del valor del animal por desecho y decomiso a causa de los abscesos, la LC visceral ha sido implicada como una de las principales causas del "Síndrome de la oveja flaca" en los Estados Unidos. Los efectos económicos de la forma externa de LC están poco documentados; fue reportado un decremento en la producción de leche en un rebaño de cabras con una alta presencia de abscesos mamarios causados por *C. pseudotuberculosis*, y los abscesos superficiales estuvieron entre las mayores causas de disminución de valor de la piel. La enfermedad causa emaciación progresiva y abscesos en linfonodos externos como se ha comprobado en borregos de 2 años de edad con LC clínica, donde se aisló *C. pseudotuberculosis* en 98.3% de los casos. Durante el sacrificio de borregos emaciados se demostró abscesos en órganos internos y el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* en el 93% de los animales (8,9).

Agente etiológico.

El género *Corynebacterium* es un grupo heterogéneo de bacterias cuyas especies comparten características similares, son referidas como bastones, Gram positivos, redondeados, inmóviles, no esporulados, que contienen irregularmente gránulos metacromáticos, su tamaño es de 1-3 μm de largo y de 0.5-0.6 μm de ancho. En el frotis con tinción de Gram las bacterias presentan arreglos angulares o de empalizada con características de reja o letras chinas. Con base en las características de la pared celular, las corinebacterias son agrupadas con las micobacterias, nocardias y rodococos,

en el grupo "CMRN", los cuatro géneros tienen paredes celulares ricas en componentes lipídicos complejos, el más conocido es un ácido graso comúnmente llamado ácido micólico, el cual es considerado como el factor más importante en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Los lípidos de la pared celular constituyen el 11.3% del peso total de la célula bacteriana, su naturaleza hidrofóbica es la causa del crecimiento de *C. pseudotuberculosis* en una película, en caldo de cultivo (10,11,12,13,14).

C. pseudotuberculosis es un anaerobio facultativo que crece relativamente lento en agar sangre, produciendo colonias blanco-amarillentas, reseca, opacas, planas, a las 24 a 48 horas las colonias están rodeadas por una zona de hemólisis completa, son positivos a la prueba de catalasa, fermentan la glucosa, son negativos a la prueba de Voges Proskauer y positiva a la prueba de rojo de metilo (14, 15, 16).

Barakat et al., en 1984 (17), han descrito dos biotipos de *C. pseudotuberculosis* con base en su habilidad para reducir nitratos, con diferente distribución por especie, cepas nitrato positivas en bovinos y equinos y nitrato negativas en ovinos y cabras. Analizando fragmentos de restricción, se encontraron diferencias genéticas entre estos dos grupos, así mismo, se buscaron relaciones genéticas, fenotípicas de *C. pseudotuberculosis* con *C. ulcerans*, *Actynomices pyogenes* y *Rhodococcus equi* pero no se encontraron patrones comunes entre ellos (18).

Los antibióticos a los cuales *C. pseudotuberculosis* es sensible in vitro incluyen: ampicilina, cloranfenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina G, sulfametoxacina con trimetoprim, entre otros, sin embargo es resistente a la estreptomina (19,20).

Un factor que se considera importante en la patogenicidad de *C. pseudotuberculosis*, es la producción de una poderosa exotoxina, la fosfolipasa D (FLD). Esta es capaz de inhibir la hemólisis por la β -lisina de *Staphylococcus aureus*, una esfingomielinasa, por ocupación competitiva del sitio de reconocimiento sobre la membrana del eritrocito, esta propiedad ha sido utilizada en la prueba de la inhibición de la beta-hemolisina, para la detección de anticuerpos contra la exotoxina; la hemólisis sinérgica ocurre cuando la FLD del *C. pseudotuberculosis* actúa en conjunto con ciertos tipos de fosfolipasa C, como la exotoxina de *Rhodococcus equi*, en este caso las dos

toxinas actúan sinérgicamente, la degradación de esfingomielina a ceramida da como resultado la desorganización de la membrana y causan lisis celular, esta hemólisis sinérgica por las dos exotoxinas, es útil en la identificación de otras especies y constituye la base de la prueba de la inhibición de la hemólisis (PIH), que puede ser usada para detectar anticuerpos contra la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* (21,22).

La producción de la FLD es un componente importante de los mecanismos patogénicos de *C. pseudotuberculosis*, esta exotoxina es una fosfatidilcolina fosfatido hidrolasa, estructuralmente la exotoxina es una glicoproteína, se encuentra en el citoplasma y en pequeñas cantidades en la pared celular, puede ser purificada fácilmente a partir de sobrenadantes de cultivos, es estable en líquido, pero se inactiva por calor a 60°C en 10 minutos a 37°C en dos semanas o a 25°C en tres meses, así como en un pH ácido o formalina (22).

La bacteria *Arcanobacterium haemolyticum* (antes *Corynebacterium*) produce también FLD y se ha comparado con la producida por *C. pseudotuberculosis* y *Corynebacterium renale* encontrándose homología parcial y esto sugiere que la FLD de este género bacteriano tiene una estructura común con pequeñas variaciones entre especies (23,24).

C. pseudotuberculosis sobrevive por largos periodos en suelos contaminados con exudado purulento y fue aislado a partir de exudados purulentos localizados en áreas sombreadas de un corral hasta por veinte semanas. Experimentalmente, fue demostrada su sobrevivencia por ocho meses en suelos inoculados con descargas purulentas y expuestos a una variedad de temperaturas ambientales, subsecuentemente a la contaminación con material purulento, el organismo es capaz de sobrevivir en fomites, como en superficies de madera, paja y heno, por una, tres y ocho semanas respectivamente, paradójicamente, los intentos de aislar *C. pseudotuberculosis* de suelos de áreas enzoóticas han sido infructuosos (25, 26).

Transmisión de la enfermedad.

Se han investigado las formas de transmisión en las ovejas y se considera que la contaminación por las heridas de trasquila es la de mayor importancia. Esto ocurre cuando las navajas contaminadas con exudado

purulento se utilizan nuevamente, lesionando la piel y provocando una vía de entrada para el microorganismo, presente en el ambiente o en la cuchilla; se ha visto que la incidencia de la enfermedad aumenta cuando los animales recién trasquilados se mantienen en condiciones de hacinamiento (3,12,27).

Experimentalmente se aplicó exudado purulento en heridas frescas de trasquila que resultaron en un absceso en 26 de 30 borregos tratados, la infección también se indujo colocando caldo de cultivo en la piel recién trasquilada, siete de 21 borregos desarrollaron abscesos en linfonodos superficiales, también se produce la infección por la aplicación de baños de inmersión, posteriores a la trasquila. Probablemente la infección es favorecida si la piel tiene heridas que no se ven a simple vista (28).

En borregos inoculados subcutáneamente en la oreja, empleando 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de *C. pseudotuberculosis*, se desarrollaron lesiones en los linfonodos locales, parotídeo o prescapular y en los pulmones. Los títulos de anticuerpos medidos, por la prueba de ELISA, fueron altos hasta 3 meses después de la inoculación, la infección primaria por este método, protegió a los animales de una segunda infección, limitando su diseminación (29,30,31).

Se han probado numerosas rutas de infección experimental en borregos, incluyendo intradérmica, intratraqueal, subcutánea, intravenosa e intravaginal y cada uno de estos métodos produce abscesos en los linfonodos locales. La administración intravenosa da como resultado la formación de abscesos viscerales, la mayoría de ellos en el parénquima pulmonar y en los linfonodos torácicos (32,33,34).

En borregos y cabras se observa un pico de la enfermedad durante fines de verano, otoño y principios de invierno, el pico se mantiene durante la máxima actividad de insectos, y por esto se ha investigado su papel como posibles vectores; pero han sido poco exitosos los esfuerzos por recobrar el organismo a partir de moscas y garrapatas, que afectaban a los rebaños en el campo. Pero, moscas contaminadas experimentalmente fueron reconocidas como vectores potenciales hasta por tres días (12,35,36,37,38,39).

Se ha estudiado el posible papel de las garrapatas que afectan a los ovinos como vectores en la transmisión de LC, se evaluó la prevalencia de LC

y la infestación con garrapatas en cuatro rebaños de borregos, sin embargo los cultivos a partir de las piezas bucales y saliva de las garrapatas, provenientes de 70 animales con abscesos, dieron crecimientos positivos a *Staphylococcus* spp, *Bacillus* spp y *Pseudomonas* spp, pero *C. pseudotuberculosis* sólo fue aislado a partir de las piezas bucales de dos garrapatas, se concluyó que no había relación entre la severidad de la infestación con garrapata y la presencia de LC, por lo que la transmisión por garrapatas se considera un mecanismo poco probable (34).

En cabras, las abrasiones de piel o heridas de peleas se consideran vías de entrada para el organismo, la presencia de lesiones en la porción anterior del cuerpo han motivado a algunos autores a sugerir que el frotamiento de la cabeza y cuello contra los postes y las cercas, los cuales pueden estar contaminados con material purulento, son importantes en la transmisión, las lesiones pueden persistir en el mismo sitio del cuerpo por muchos años y desaparecer únicamente para desarrollarse en otro sitio (4,5,40,41).

Otros sugieren que los traumatismos de la mucosa bucal son un medio de entrada para el organismo, la inoculación subgingival dio como resultado la infección de las cabras, y determinó abscesos en linfonodos regionales en todos los animales (37,39,40,41,42).

La inoculación intradérmica produjo abscesos en la cavidad torácica, así como en linfonodos locales en todos los animales, en la infección experimental pueden pasar varios meses antes de formarse abscesos en los linfonodos (37,39,40,41,42).

En borregos y cabras con la forma visceral de LC, hay una alta presencia de lesiones pulmonares y torácicas, indicando la posible transmisión aérea (3,38).

La presencia de la lesión pulmonar, cuando las lesiones internas se presentan, sugiere que el tracto respiratorio puede ser una ruta de entrada, la inoculación de caldo de cultivo intratraqueal en borregos da como resultado abscesos pulmonares diseminados, sin embargo, la administración de organismos por vía intravenosa o intradérmica también resulta en abscesos en el pulmón. Se considera que la distribución de abscesos pulmonares en casos de campo, ocurre por vía sanguínea o linfática, más bien que en forma

acrógena; algunos autores actualmente sostienen que los borregos que presentan lesiones de LC en pulmones son capaces de diseminar la enfermedad por vía aérea sobre las lesiones recientes de trasquila en la piel (41,43,44,45).

Los signos clínicos y el curso de la enfermedad en cabras y borregos infectados experimentalmente varían de acuerdo a la dosis y la ruta de infección, cuando un cultivo de *C. pseudotuberculosis* es aplicado en abrasiones de piel, los animales presentan una ligera elevación de la temperatura por unos pocos días (6,33).

Las inoculaciones subcutáneas, causan toxemia aguda y muerte, a dosis de 1×10^{20} UFC y a dosis de 1×10^8 UFC los animales presentan un cuadro febril y una reacción inflamatoria marcada durante los primeros días posteriores a la inoculación, gradualmente los síntomas agudos decrecen y la enfermedad progresa hacia un estado supurativo crónico, por otro lado, se ha concluido que la inoculación subcutánea con *C. pseudotuberculosis* puede ser un sistema de desafío apropiado para estudiar la eficacia de la vacunación contra la linfadenitis caseosa en borregos y cabras (6,33).

Las heridas superficiales son reportadas como la ruta de infección más importante de *C. pseudotuberculosis* y la falta de inmunidad puede resultar en síntomas agudos en animales de rebaños recién infectados, el desarrollo de inmunidad reduce los síntomas agudos y la enfermedad se vuelve crónica (6,33,46).

Patogenia y respuesta inmunc.

La patogenia de la LC en borregos y cabras no está bien definida, pero dos factores parecen jugar un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad, el primero, la alta cantidad de lípidos en la pared de *C. pseudotuberculosis* que permite que el microorganismo resista la digestión por las enzimas de los macrófagos, persista como un parásito intracelular facultativo y se involucre en la formación de abscesos y segundo, la capacidad de producir toxinas citotóxicas que causan necrosis. En macrófagos, que fueron infectados con *C. pseudotuberculosis*, la multiplicación bacteriana intracelular comenzó inmediatamente, formando varias generaciones en las siguientes cinco horas, los macrófagos infectados fueron degenerando cuando el número de

microorganismos alcanzó a 30 o 40 por macrófago, las bacterias libres fueron subsecuentemente fagocitadas por nuevas células. A la multiplicación por progresión geométrica, siguió la rápida muerte de los macrófagos y el incremento de bacterias en el cultivo; esta habilidad de *C. pseudotuberculosis* de resistir la digestión por fagocitos, se considera de gran importancia en la formación de los abscesos (12).

En el hospedador los organismos pueden proliferar localmente y viajar dentro de los macrófagos hacia el linfonodo, los macrófagos mueren y se lisan liberándose también mediadores químicos, los organismos son fagocitados por otros macrófagos que repiten el ciclo, para eventualmente producir un absceso en el lugar (3,12,27).

Una toxemia aguda y la muerte ha sido reportada en borregos seronegativos después de aplicar material purulento en heridas de piel y en cabras seronegativas después de la inoculación subcutánea de altas dosis de caldo de cultivo bacteriano (47).

Se aplicaron a borregos tres inóculos, uno silvestre y dos de laboratorio, de *C. pseudotuberculosis*, que diferían en virulencia por producción de FLD y se midió la producción de citocinas. No existieron diferencias significativas en la concentración de citocinas en relación a la virulencia del inóculo; sin embargo se encontraron altas concentraciones de las citocinas inflamatorias IL 1, IL 8 y TNF α , en el sitio de la inoculación, así como, altas concentraciones de citocinas derivadas de células T en el linfonodo regional. Por otro lado se demostró una vez más, que la FLD es un factor que facilita la diseminación de la bacteria, ya que el extracto silvestre, a diferencia de los otros dos, afectó el ganglio regional adyacente al sitio de inoculación. La FLD no influyó en la formación del granuloma, pero si en su persistencia, por su producción dentro del mismo, algunas citocinas inflamatorias también juegan un papel importante en el desarrollo de granulomas (IFN- γ , TNF α) lo que resulta importante para evitar la diseminación de la bacteria (1,2).

Se han separado los componentes de *C. pseudotuberculosis* por sonicación y electroforesis, se evaluaron por inmunotransferencia con sueros de ovinos seropositivos a LC y se encontró respuesta a once fracciones bacterianas de diferente peso, en especial una fracción de 31.6 kd, que se identificó como la FLD. La FLD se encuentra en el citoplasma y en pequeñas

cantidades en la pared celular, causa una degradación masiva de esfingomielina a ceramida en las células endoteliales y en las membranas de eritrocitos, provocando lisis celular, además de su efecto citotóxico, limita la opsonización bacteriana, incrementa la permeabilidad vascular y la diseminación de la bacteria al permitir que escape de los neutrófilos. Adicionalmente altera la quimiotaxis de los neutrófilos hacia el sitio de infección (22,48,49,50,51,52).

En ovinos inoculados intravenosamente con un extracto de *C. pseudotuberculosis* (ATCCA410), se comprobó, al valorar sus eritrocitos con microscopía electrónica de transmisión, que a los 30, 60, 120 y 180 minutos después de la inoculación, se presentaban cambios con aumento de la presencia de vacuolas hasta la lisis de los mismos, a los 30 minutos postinoculación ocurría esferomastocitos con invaginaciones en su superficie (aspecto de vacuolas periféricas); a los 60 y 120 minutos, las invaginaciones aumentaban de tamaño y a los 180 minutos, los eritrocitos se lisan (53).

Ocurren pequeñas variaciones en las cantidades de exotoxina producida por diferentes cepas, con evidencia de que la producción de exotoxina afecta la virulencia; en 25 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* se encontró una correlación significativa entre la producción de exotoxina y la severidad de la enfermedad subaguda (abscesos) en ratones y en borregos, los extractos con el más alto nivel de producción de toxina fueron los que determinaron más abscesos (21).

Algunos autores concluyen que tanto la inmunidad celular como la humoral participan en la protección contra LC, la respuesta humoral es antitóxica y la celular restrictiva de la proliferación bacteriana (54,55).

Signos clínicos y lesiones.

Aunque el *C. pseudotuberculosis* se ha aislado a partir de abscesos y otros procesos supurativos en una variedad de especies animales; se reconoce como la causa de enfermedades específicas en sólo tres especies, en borregos y cabras como linfadenitis caseosa. Los equinos son la tercera especie afectada en forma específica con el cuadro conocido como linfangitis ulcerativa, con escoriación e inflamación supurativa de los linfonodos de las porciones distales de los miembros. Se ha documentado un solo caso de aborto a los 254

días de gestación en una yegua de 9 años de edad, que no presentó signos clínicos, el feto presentó lesiones macroscópicas en el hígado y otros órganos con lesiones inflamatorias de 3-5 mm, así como en linfonodos locales sugestivas de linfadenitis caseosa y el cultivo bacteriano fue positivo a *C. pseudotuberculosis* (3,12,28,35,36,42,56,57,58,59).

C. pseudotuberculosis se aísla esporádicamente de procesos supurativos en otra variedad de mamíferos. En vacas, *C. pseudotuberculosis* se ha detectado en leche de animales con mastitis o en abscesos con varias localizaciones, principalmente subcutáneos o dentro de linfonodos. Se han reportado casos de linfadenitis caseosa visceral en *Antilope cervicapra*, ciervo de cola blanca, ciervo barbecho y en ciervo mula (60,61,62).

En no rumiantes hay informes de aislamiento en cerdos, nutria, ratón de laboratorio y erizo, así mismo, se reporta el caso de un felino doméstico de medio ambiente urbano, que presentó una lesión purulenta asimétrica en la nariz, provocada por *C. pseudotuberculosis* (63).

En humanos ha ocurrido la infección en pastores y trabajadores de rastro. Se ha comunicado un caso urbano después de la ingestión de leche cruda de cabra y otro de infección de tracto respiratorio, en un estudiante de veterinaria, posiblemente después del contacto con el organismo en un laboratorio de bacteriología, ambos eran adultos sanos; la infección siempre se manifestó con abscesos en linfonodos maxilares o inguinales superficiales. En el caso urbano se desarrolló un absceso en el linfonodo cervical y en el estudiante la enfermedad adoptó la forma de neumonía y respondió a la eritromicina (64).

En Australia se reportaron 10 casos de linfadenitis caseosa en humanos de 1985 a 1992, nueve de los cuales fueron relacionados con personas que trabajan en contacto directo con borregos y el caso de una mujer de 53 años de edad, habitante urbana, de la cual no se estableció el mecanismo de infección. Todos los pacientes infectados fueron de diferente sexo y edad, así como la localización de los linfonodos infectados fue variable, los pacientes recibieron tratamiento con antimicrobianos después de drenar la lesión o escindir el linfonodo. Entre los años de 1966 a 1986 se reportaron 12 casos de linfadenitis caseosa en humanos, en las mismas condiciones que los

presentados en Australia, pero en otros países: Panamá, Francia, E.U.A. y Nueva Zelanda. (65).

Histológicamente, las lesiones de LC están rodeadas por una cápsula fibrosa de alrededor de 300 μm , constituida por colágena y presentan una capa de tejido linfático entre la cápsula y el centro de tejido necrótico caseoso, conformada por células intactas y digeridas, con fuerte respuesta para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II; la región que rodea esta zona, contiene una alta proporción de linfocitos T y en la región entre la zona de linfocitos T y la cápsula se encuentran células CDR45+ que corresponden a linfocitos B, esta contiene gran número de vénulas; los macrófagos son numerosos en la zona de íntimo contacto con el material necrosado y en menor grado se observan en la zona de linfocitos T, los eosinófilos son observados ocasionalmente en el tejido que rodea la cápsula. (3,4,5,6).

Se ha señalado que la vacunación de borregos no previene la formación de abscesos en los pulmones después de desafiarlos intravenosamente con *C. pseudotuberculosis*, sin embargo si presentan menos cantidad de abscesos que aquellos no vacunados. En borregos no inmunizados e inoculados intravenosamente con diferentes dosis de *C. pseudotuberculosis*, se demostró que dosis que contenían 10^5 y 10^6 unidades formadoras de colonias, resultaron en toxemia aguda y muerte. Por otro, lado borregos y cabras inoculados intravenosamente con exotoxina purificada de *C. pseudotuberculosis* presentaron anemia hemolítica severa, ictericia, hemoglobinuria, neumonía aguda y muerte a las 18 horas posteriores a la inoculación. Sin embargo, la inoculación intravenosa con *C. pseudotuberculosis* no se considera un sistema de desafío adecuado para estudiar la eficacia profiláctica de la vacunación contra linfadenitis caseosa en las cabras. Pero todos estos métodos experimentales de desafío explican sólo parcialmente la ocurrencia natural de la enfermedad (31,33,48)

Diagnóstico de la LC

Numerosas pruebas se han ideado para el diagnóstico de la LC en sus formas subclínicas, la mayoría de esas pruebas miden la respuesta humoral a la exotoxina. La superficie externa de *C. pseudotuberculosis* es rica en lípidos, la autoaglutinación de las bacterias ocurre fácilmente en forma espontánea, lo que complica el uso de pruebas de aglutinación, pero lavando

las bacterias en solución salina con 1% de Tween 80, se evita la autoaglutinación, el antígeno preparado en esta forma es indicado para usarse en las pruebas de aglutinación bacteriana (PAB), otros autores preparan el antígeno en forma similar y realizan la prueba de microaglutinación (6.54).

Se ha observado que los eritrocitos de vacas, borregos, cabras y conejos tratados con metabolitos de *C. pseudotuberculosis* y *Corynebacterium equi*, fácilmente se hemolisan, en la prueba de inhibición de la hemólisis (PIH) se aplica este principio. La especificidad y sensibilidad de las pruebas de aglutinación bacteriana e inhibición de la hemólisis son del 96%, por lo que ambas pruebas pueden ser usadas para el diagnóstico serológico de *C. pseudotuberculosis*, con una diferencia importante a considerar, los anticuerpos contra la bacteria se detectan más tempranamente con PAB que con PIH en infecciones experimentales y naturales. Se deben tener presentes las reacciones cruzadas entre *C. pseudotuberculosis* y *Corynebacterium renale*, así como también el que algunos animales infectados, producen anticuerpos contra la bacteria y no presentan abscesos (66,67,68).

Se ha desarrollado, una prueba cutánea para *C. diphtheriae*, en la cual una pequeña cantidad de toxina diftérica necrozante se inyecta intradérmicamente, en presencia de anticuerpos circulantes, los efectos de la toxina son neutralizados inmediatamente y no hay reacción, sin los anticuerpos protectores hay un enrojecimiento difuso e inflamación visible por varios días. Con esta idea se inyectaron pequeñas dosis de la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* en cien borregos con LC, pero las reacciones fueron irregulares y aisladas (69).

Utilizando las propiedades de la exotoxina de inhibición de la lisis de eritrocitos por la beta-lisina estafilocócica, se desarrolló la prueba inhibición-beta-hemólisis (AHÍ o BHI). Las diluciones del suero de prueba son incubadas con una cantidad estándar de exotoxina y eritrocitos bovinos y se adiciona hemolisina estafilocócica, en ausencia de anticuerpos contra la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* no ocurre el efecto hemolítico de la betalisisina, este método tiene niveles de sensibilidad y especificidad del 92% y 96%, respectivamente (70).

La prueba de ELISA ha sido también usada para detectar inmunidad humoral en LC, en la cual se describe hasta un 100% de efectividad, pero con

algunos resultados positivos en animales que no presentan linfadenitis crónica, comparándose con una prueba de inmunodifusión que resulta menos efectiva, dando incluso resultados falsos negativos (71,72).

Los abscesos tuvieron al *C. pseudotuberculosis* como agente primario de infección con una infección o contaminación secundaria por otras bacterias tales como *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium pyogenes*. (43,73).

Sin embargo, en un estudio de campo realizado en 104 ovejas utilizando la técnica de ELISA y PHI se encontró que de 33 ovejas que mostraban linfadenitis caseosa clínica típica, 32 de ellas (97%) fueron seropositivas, comprobando la eficacia de ambas pruebas, 46 de las ovejas que no presentaron signos fueron consideradas como posibles falsos positivos. Se comprobó que no existe relación alguna entre los títulos de anticuerpos específicos contra *C. pseudotuberculosis* y la extensión de las lesiones (54).

Control y profilaxis

Bacterinas. La enfermedad es difícil de erradicar una vez que se vuelve endémica, por esto varias pruebas de vacunación contra la infección por *C. pseudotuberculosis* han sido llevadas a cabo en borregos y cabras, encontrando que las bacterinas no previenen el desarrollo de abscesos, luego de la inoculación intravenosa del organismo, por lo que se ha sugerido la vacunación con bacterias atenuadas en contra de la linfadenitis caseosa. Sin embargo, el uso de bacterinas tienen efecto protector en inoculaciones subcutáneas e intradérmicas, ambas en borregos y cabras, estas bacterinas tienen el inconveniente de que inducen la formación de lesiones supurativas en el sitio de inyección y si bien reducen el índice de contagio, no se recomiendan como medida de protección contra la linfadenitis caseosa en animales infectados naturalmente (43,74,75,76).

La inoculación de borregos Merino con una bacterina de *C. pseudotuberculosis* y el desafío subsecuente intravenoso con un cultivo de la bacteria, demostró que la vacunación protegió contra la muerte aguda y subaguda, pero no previno el desarrollo de abscesos (77,78).

Una bacterina de *C. pseudotuberculosis* que incluía muramyl dipéptido, se utilizó para proteger borregos contra la aparición natural de abscesos, la

bacterina produjo altos niveles de anticuerpos, pero la protección contra la aparición de abscesos fue poco clara, se concluyó que el problema no es la bacterina, sino el diseño experimental en la prueba de campo. Primero, la linfadenitis caseosa es una enfermedad crónica y la aparición de abscesos en animales no vacunados ocurre en 15-16 meses; segundo, no todos los abscesos son debidos a la infección por *C. pseudotuberculosis* y por lo tanto no fueron afectados por la vacuna y en tercer lugar, interfirió la dificultad por conservar animales por largos periodos de tiempo, debido a la actividad comercial de los rebaños (79).

Usando una bacterina de células completas de *C. pseudotuberculosis* ATCC19410 (1mg/ml) y dipéptido murámico (50 µg), la misma estructura esencial de la micobacteria, para los efectos de su uso como adyuvante completo de Freud, más 10% de aceite mineral, se logró en animales de laboratorio, altos títulos de anticuerpos al desafío, sin producir abscesos pulmonares o en el sitio de la inoculación. En condiciones de campo, a 18 meses del desafío, se observó la presencia de abscesos subcutáneos en 5% de los borregos vacunados y en 23% de los no vacunados (80).

Las propiedades inmunizantes de células completas y paredes celulares fueron comparadas en corderos privados de calostro. Corderos de 5 semanas de edad, fueron inoculados con células muertas completas de *C. pseudotuberculosis* o con fragmentos homogeneizados de paredes celulares y desafiados por vía intravenosa, un mes más tarde, los animales se sacrificaron y se encontraron abscesos en los pulmones y el hígado que fueron molidos y sembrados, para conteo bacteriano. Se observaron pocos abscesos y microorganismos en los animales vacunados, los corderos vacunados con la preparación de paredes celulares tuvieron significativamente menos lesiones, que aquellos vacunados con células completas (81).

Toxoides. Explorando la posibilidad de los efectos protectores de un toxoide, se inmunizaron 24 borregos destetados, estos se desafiaron colocando material purulento sobre heridas frescas de la piel. Todos los animales, vacunados y controles, desarrollaron lesiones supurativas en el sitio de la inoculación, dos animales control murieron con anemia hemolítica en las 24 horas posteriores al desafío. Los animales restantes se sacrificaron dos semanas después del mismo, todos los controles presentaron múltiples abscesos; de los 24 animales inmunizados, sólo tres tuvieron lesiones, se

concluyó que la respuesta inmune a la exotoxina juega un papel importante en la resistencia a la enfermedad (30).

La inmunización a partir de FLD inactivada (toxoides), combinadas con antígenos clostridiales y antígenos clostridiales + selenio, proporcionan el mismo grado de inmunidad (91%) en relación a la producción de anticuerpos, aplicándolas subcutáneamente en dos dosis 28 y 16 días antes del desafío con material caseoso proveniente de lesiones de *C. pseudotuberculosis* (82).

Se inmunizaron cabras subcutáneamente con un toxoide y se desafiaron con la aplicación de caldo de cultivo sobre heridas en la piel, solo 3 de 20 animales inmunizados, comparadas con 10 de los 10 controles, tuvieron abscesos 3 meses después del desafío. Por otro lado, se inmunizaron subcutáneamente 10 cabritos con toxoide y adyuvante incompleto de Freud y se desafiaron con la inoculación de organismos vivos, trece semanas más tarde, 2 de 10 cabritos inmunizados presentaron lesiones diseminadas, comparados con 4 de los 5 controles no vacunados (55).

La inmunización con toxoide en los meses 2, 4 y 5 de la preñez, determina protección contra el desafío, en cabritos castrados y amamantados durante la primera semana de vida. En los cabritos desafiados a la semana de edad, con alta inmunidad pasiva, sólo 1 de 8 presentó un absceso, comparado con 7 de 8 que presentaron abscesos, en el grupo de cabritos que provenían de madres no inmunizadas (83,84).

Por otra parte, la inmunización de corderos con toxoide a las 2 y 8 y a las 8 y 14 semanas de edad, demostró menores títulos de anticuerpos, cuando la inmunidad materna era alta. Sin embargo, si estos corderos son vacunados a las 14 y 18 semanas de edad, la respuesta en los títulos de anticuerpos se afecta. Pese a lo anterior, la vacunación de las madres antes del parto no se asoció con el decremento de la inmunidad en sus corderos, aunque la vacunación de 2-8 semanas de edad fue menos efectiva, que la de 8-14 semanas de edad (85).

Vacunas recombinantes. Se probó en borregos la inmunización subcutánea con un cultivo negativo a la producción de la FLD, este solo produjo lesión en el sitio de la inoculación y no en el ganglio regional, como ocurrió con un cultivo productor de FLD (49).

Con una mutación dirigida al gen de la FLD se producen cepas variantes, las cuales resultan en la menor producción de una FLD inactiva. Se necesita lograr una mutante que produzca FLD inactiva en grandes cantidades, para lograr la producción de una vacuna comercial, que pudiera resultar en una respuesta inmune protectora. En experimentos de vacunación con mutantes de *C. pseudotuberculosis*, que no producen FLD y desafiando los animales vacunados con estas mutantes y con cepas de campo, se ha observado que la FLD es un factor de virulencia que incrementa la persistencia y la diseminación de la bacteria (86,87).

Vacunas por antígenos particulados. Utilizando una proteína de 40 kd que es secretada por *C. pseudotuberculosis* como inmunogeno, inoculada en borregos, se logró un 82% de reducción de animales infectados y un 98% de reducción en lesiones pulmonares. Posteriormente la proteína se caracterizó en el laboratorio, encontrándose que tiene las características de una enzima proteolítica y se le dio el nombre de proteasa corinebacterial 40, pero su función real no ha sido reconocida, la respuesta inmune por vacunación hacia la proteína de 40 kd, no ha sido bien caracterizada, pero si su efecto protector (88,89).

Se ha demostrado que la proporción de animales seropositivos decrece con la edad durante los primeros meses de vida y esto puede ser debido a la desaparición de anticuerpos maternos, así mismo, las condiciones ambientales pueden ser determinantes con respecto a la reducción del riesgo de infección. Se ha propuesto el aislamiento de las crías hasta que puedan consumir pasto, con poco contacto con los animales adultos durante los primeros meses de vida. El incremento de los títulos de anticuerpos con la edad es probablemente el resultado de una estimulación antigénica prolongada; por lo anterior, cualquier medida inmunoproláctica contra la linfadenitis caseosa en animales pequeños, puede ser llevada a cabo antes de que los animales alcancen la edad de 4 meses, pero estimar una edad precisa de vacunación es difícil, ya que los anticuerpos maternos pueden influir el efecto de la vacunación (6).

El control de la LC ha sido la mayor preocupación en la industria del borrego y la cabra. Una vez establecida la enfermedad es casi imposible de erradicar porque los antibióticos son incapaces de penetrar a los macrófagos

para destruir al microorganismo y tampoco penetran la cápsula de los abscesos. Hasta ahora no hay vacunas comerciales totalmente eficaces, debido al largo periodo de incubación de la enfermedad y a la ausencia de lesiones visibles entre periodos de formación de abscesos, que determina que sea clínicamente difícil distinguir entre animales infectados y no infectados (19,25).

En los Países Bajos en 1984, detectaron la introducción de linfadenitis caseosa, por la importación de cabras clínicamente enfermas y se implementó un sistema para la erradicación de la enfermedad. Se identificaron todos los animales de 46 hatos (11 000 cabras aprox.) y con la prueba de ELISA de doble anticuerpo, se examinó a todas las cabras mayores de 6 meses, los cabritos menores de 6 meses se cuarentenaron y privaron de calostro. Para corroborar los resultados de la prueba de ELISA se realizó la prueba de inmunotransferencia. Los animales fueron examinados serológicamente cada 6 meses, los reactores positivos fueron eliminados, cuando resultaron negativos dos veces consecutivas se declararon libres de linfadenitis caseosa, pero para mantener esta condición se hicieron pruebas serológicas cada 12 meses y posteriormente a los 24 meses, al cabo de seis años de instituirse el programa, se redujo a 0 el porcentaje de hatos y cabras infectadas. El programa de erradicación abarcó las siguientes condiciones: identificación y registro de todas las cabras; el uso de pruebas serológicas de alta especificidad y sensibilidad; sacrificio de todos los animales reactores positivos y clínicamente enfermos y la participación y convicción de todos los productores de que el programa de erradicación se justificaba (90).

Justificación

Pese a la importancia de la linfadenitis caseosa (LC) dada su amplia distribución, sus efectos sobre la capacidad productiva de los pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) y la posibilidad de que ocurran decomisos en el rastro, la enfermedad presenta hasta hoy diversos aspectos oscuros, en cuanto a su transmisión, respuesta inmune y patogenia, elementos todos que resultan críticos para poder establecer medidas adecuadas de control y profilaxis. Por lo anterior el trabajo se orienta a la búsqueda de información adicional, que mejore la comprensión de estos aspectos.

Hipótesis

La linfadenitis caseosa tiene dos presentaciones, la cutánea y la visceral, el metabolismo y antígenos en las aislamientos involucradas en estas presentaciones son diferentes.

Objetivo general

Caracterizar aislamientos de *C. pseudotuberculosis* involucrados en las dos presentaciones de la linfadenitis caseosa en ovinos.

Objetivos particulares

- 1. - Obtener muestras sospechosas de LC (visceral y cutánea), de ovinos, aislar e identificar los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de las muestras.**
- 2. - Determinar el mejor método de conservación para los aislamientos de *C. pseudotuberculosis*.**
- 3. - Caracterizar metabólicamente los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de las dos principales presentaciones clínicas.**
- 4. - Agrupar los aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, con base a sus características metabólicas.**
- 5. - Cuantificar la producción de toxina (FLD) de los aislamientos provenientes de las dos principales presentaciones de la enfermedad.**
- 6.- Determinar si existen diferencias electroforéticas en las proteínas somáticas de los aislamientos provenientes de las dos presentaciones de la enfermedad (cutánea y visceral).**
- 7.- Analizar si existen diferencias antigénicas entre los aislamientos aisladas.**

Materiales y métodos

Obtención de muestras.

Las muestras se obtuvieron de 6 rebaños en el Estado de México donde los borregos presentaron problemas de lesiones en linfonodos, y también de órganos y linfonodos de animales sacrificados en el rastro de Tlalnepantla Estado de México.

Se inspeccionó una población aproximada de 1500 cabezas de ganado y para fines probabilísticos se trató de igualar el número de muestras de origen cutáneo y visceral. Con base en datos de frecuencia de aislamiento obtenidos por Barrientos et al. en 1996 (27) que fue del 10.6%, se realizó mediante el programa Statistic, el cálculo del tamaño de la muestra.

Para las muestras de linfonodos que se obtuvieron de ranchos, se realizó la inspección o palpación de nódulos explorables con alteración de tamaño: submaxilares, parotídeos, prescapulares y prefemorales y se tomó una muestra, para lo cual se siguieron los siguientes pasos, que se emplearon en un experimento previo (27).

- a) Se determinó anatómicamente el linfonodo afectado.
- b) Se rasuró y limpió la piel por encima y alrededor del linfonodo.
- c) Se obtuvo una muestra del contenido del linfonodo por los siguientes procedimientos:
 - I.- Se hizo antisepsia de la zona con yodo al 2%.
 - II.- Se puncionó el linfonodo con aguja hipodérmica calibre 16 estéril, durante la punción se dirigió la aguja en forma de abanico.
 - III.- Se colocó la aguja hipodérmica en un tubo de ensayo con 5 ml. de caldo nutritivo.

Si el linfonodo presentaba un absceso blando:

- IV.- Se realizó una incisión sobre la piel del linfonodo afectado.
- V.- Se introdujo un hisopo estéril y se tomó una muestra de exudado a partir de las paredes del linfonodo.

VI.- El hisopo se introdujo en un tubo con 5 ml. de caldo nutritivo.

VII.- Al linfonodo se le retiró el exudado y se desinfectó con yodo al 2%.

- d) Las muestras, en tubos con caldo nutritivo, se transportaron a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la FES-Cuautitlán para su análisis.

Las muestras de vísceras se obtuvieron en el rastro, cuando el cadáver se colgaba en la línea y antes de ser eviscerado, utilizando bolsas de plástico estériles, en las cuales se colocaron fragmentos grandes de órganos y linfonodos afectados con la finalidad de transportar las muestras en refrigeración a la UIMSA y posteriormente tomar la muestra bacteriológica bajo condiciones de laboratorio.

De los animales inspeccionados en campo, solo se muestrearon lesiones cutáneas y no fue posible determinar si presentaban lesiones viscerales. En los animales inspeccionados en el rastro, no fue posible determinar si además de presentar lesiones viscerales, también presentaban lesiones cutáneas, por la metodología de matanza en el rastro, que avanzaba tan rápido que apenas daba tiempo de muestrear vísceras, por otra parte los matanceros eliminaban los linfonodos subcutáneos.

Aislamiento e identificación.

En el laboratorio se procedió al aislamiento y la identificación bacteriana, cada muestra se trabajó en condiciones de esterilidad y se sembraron en agar nutritivo, agar MacConkey, agar sangre al 10% y agar sangre al 10% más telurito de potasio; incubándolas a 37°C de 24-48 h en presencia de oxígeno, además se les realizó tinción de Gram, prueba de oxidasa, catalasa y fermentación de glucosa en medio base de CTA, con la finalidad de conocer los géneros bacterianos involucrados. A los aislamientos sospechosos de pertenecer al género *Corynebacterium* se les realizó además, prueba de Voges Proskauer y producción de ácido sulfhídrico en medio base de TSI, para diferenciar de otros géneros como *Listeria* y *Kurthia* (15,16,91).

Una vez identificado el género se realizaron las siguientes pruebas para identificar la especie (15,16,91):

- a) Tinción de Albert para gránulos metacromáticos.
- b) Fermentación de galactosa y maltosa.
- c) Hidrólisis de la arginina.
- d) Urea

De cada aislamiento de *C. pseudotuberculosis* se sembraron 5 colonias en agar sangre para proceder a su conservación.

Conservación de aislamientos.

A partir de un aislamiento caracterizado por la M en C Laura Hernández en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (CENID-INIFAP) de *C. pseudotuberculosis*, se realizó una curva de crecimiento, con un cultivo en 3 ml de caldo brucela más suero al 10% durante toda la noche a 37°C, se tomó 1 ml y se adicionó a un matraz Nefelométrico con caldo brucela más suero al 10%, a un volumen final de 50 ml. Una vez homogenizado se procedió a tomar la primera lectura en el fotocolorímetro Klett Summerson con filtro rojo, se incubó a 37°C, se homogenizó la muestra y se tomaron lecturas durante 32 h a diferentes intervalos (15,16).

Los resultados fueron graficados y se calculó la línea de tendencia con la cual se determinó la velocidad de crecimiento (92).

Con la finalidad de determinar el mejor medio de cultivo, se tomaron al azar y sin considerar ninguna característica en particular 10 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* y se sembraron en placas de agar sangre, incubándose a 37°C durante 24 a 48 h para obtener un crecimiento abundante en todas las cajas, posteriormente se realizó un cultivo durante toda la noche a 37°C en tubos con 3 ml de caldo soya tripticaseína más suero al 10%, cada uno de ellos fue vaciado en 5 ml de caldo brucela más suero al 10%, y en 5 ml de caldo Todd-Hewitt más suero al 10%. Una vez homogenizados se procedió a tomar la primera lectura en el fotocolorímetro Klett Summerson con un filtro rojo, se incubó a 37°C y a intervalos de 30 minutos se homogenizó la muestra y se tomó lectura, durante 6 horas (13 determinaciones) (93).

Los resultados fueron graficados y se calculó la línea de tendencia con lo cual se definió el mejor medio de cultivo.

Para evaluar la conservación en distintos medios, cada aislamiento de *C. pseudotuberculosis* se sembró en tubos con 3 ml de caldo brucela más suero al 10%, se incubó a 37°C durante 15 h (1.4×10^7 ufc/ml) y se almacenaron en refrigeración y ultracongelación, utilizando diferentes medios: agar sangre, huevo de Dorset y caldo brucela glicerol (15,16).

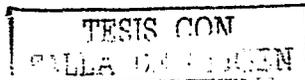
a) Refrigeración

Agar sangre.- Los aislamientos se sembraron en placas de agar sangre, incubándose a 37°C durante 24 a 48 h para obtener un crecimiento abundante en todas las cajas y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4°C (15,16).

Se realizaron resiembras en placas de agar sangre durante los días 1,3,5,7,9 y 11 de refrigeración.

Los aislamientos se sembraron en medio huevo de Dorset, incubándose a 37°C durante 24 a 48 h. y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4°C. El medio se preparó en condiciones de esterilidad, lavando primeramente 16 huevos con alcohol al 70%, con un cuchillo se les rompió el cascarón, se vaciaron en un matraz, se le adicionó solución salina al 9%, se agitó para romper la yemas y homogenizar el medio, vaciándose 2 ml en tubos de 5 ml con tapón de rosca. Los tubos se colocaron de manera inclinada en el autoclave y se esterilizaron a 121°, 15 libras de presión, durante 10 minutos, posteriormente se incubaron 24 horas a 37°C como prueba de esterilidad (15,94,95).

Se realizaron resiembras en placas de agar sangre durante los días 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23 y 25 de refrigeración.



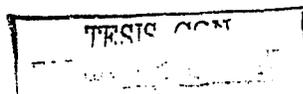
b) Ultracongelación:

Cada aislamiento se sembró en tubos con 3 ml de caldo brucela más suero al 10% y se incubó a 37°C, durante 15 h (1.4×10^7 ufc/ml), el tubo se centrifugó a 3900 g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se conservó el paquete celular. Se preparó una solución de glicerol al 20% con caldo brucela, depositándose 0.5 ml en tubos Eppendorf y se esterilizó a 121°, 15 libras de presión, por 15 minutos, para utilizarlo como protector de congelación. Al tubo con el paquete celular se le adicionó 0.5 ml de caldo brucela más suero al 10% y se mezcló perfectamente, se tomaron los 0.5 ml y se depositaron en los tubos Eppendorf que contenían los 0.5 ml de glicerol al 20% con caldo brucela. De esta manera quedaron los tubos Eppendorf a un volumen final de 1 ml en glicerol al 10%, se identificaron y se colocaron en gradillas, se colocaron primeramente en refrigeración (4°C) durante 1 h., en congelación (-4°C) durante 1 h., en congelación industrial (-20°C) durante 1 h., y posteriormente se introdujeron en un ultracongelador de la marca REVCO a -70°C (94,95).

Para probar la efectividad del método de conservación, la viabilidad de los aislamientos y la pureza del cultivo, se sacó un tubo 1 h después de haberse colocado en el ultracongelador, al 3 y 7mo día, a la 2da y 4ta semanas, al 2, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24^{vo} mes. Se colocaron 1 h., a 37°C y posteriormente se sembraron en tubos con 2 ml de caldo brucela más suero al 10% y en cajas de agar sangre que se incubaron a 37°C durante 24 a 48 h (94,95).

Caracterización de los aislamientos.

Se realizó la caracterización fenotípica con base al comportamiento metabólico de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de las diferentes presentaciones clínicas. A los diferentes aislamientos se les realizaron, por triplicado, las siguientes pruebas de caracterización bioquímica en función de su capacidad para utilizar los sustratos de acuerdo a los métodos bacteriológicos convencionales (15,16,91).



- 1.- Almidón
- 2.- Celobiosa
- 3.- Glucosa
- 4.- Dulcitol
- 5.- Fructuosa
- 6.- Galactosa
- 7.- Inositol
- 8.- Lactosa
- 9.- Maltosa
- 10.- Manitol
- 11.- Manosa
- 12.- Rafinosa
- 13.- Salicina
- 14.- Trehalosa
- 15.- Xilosa
- 16.- Prueba de Urea
- 17.- Hidrólisis de la Arginina
- 18.- Prueba de Catalasa
- 19.- Prueba de Oxidasa
- 20.- Voges - Proskauer
- 21.- TSI (H₂S)

Agrupamiento de aislamientos.

Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* caracterizados, se agruparon con base a los resultados de las pruebas bioquímicas, de acuerdo al órgano de procedencia, tipo de presentación clínica y los diferentes biotipos formados como resultado de la utilización de carbohidratos.

Producción de toxina.

Se calculó de manera cualitativa y cuantitativa, la producción de toxina de los aislamientos provenientes de las dos presentaciones clínicas de la enfermedad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cualitativamente:

Se tomaron aleatoriamente 60 aislamientos del ultracongelador (-70°C) de *C. pseudotuberculosis* provenientes de las dos presentaciones clínicas de la enfermedad (30 cutáneas y 30 viscerales) y se colocaron 1 h. a 37°C, posteriormente se sembraron en tubos con 2 ml de caldo brucela más suero al 10% y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se sembraron en cajas de agar sangre, se incubaron a 37°C durante 24 - 48 horas y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

Se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* Cowan 1, alta productora de beta hemolisina, se sembraron 10 cajas de agar sangre, se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron en refrigeración hasta su uso (92,70).

Se realizó la prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson inversa (CAMP inversa) en cajas de agar sangre, se sembró al centro una estria de *Staphylococcus aureus* a lo largo de toda la caja; en forma horizontal, dos de lado izquierdo y dos de lado derecho, se sembraron los aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, se incubaron a 37°C durante 24 h. y posteriormente se realizó el análisis de la inhibición de la hemólisis a simple vista (96).

Cuantitativamente:

Se estandarizó la prueba de inhibición de la beta-hemolisina para determinar la producción de toxina producida por los diferentes aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de manera cuantitativa (92,70), para tal fin, se prepararon eritrocitos de carnero al 1%. Se extrajeron 5 ml de sangre con anticoagulante, se tomó 1 ml y se diluyó con 4 ml de solución salina fisiológica al 85% centrifugándose a 950 g por minuto, durante 10 minutos y el sobrenadante se eliminó por decantación; este proceso se realizó por triplicado. Una vez lavados, se tomó 0.1 ml del paquete globular y se diluyó en 0.9 ml de solución salina fisiológica.

Se cultivó la cepa de *Staphylococcus aureus* Cowan 1 en medio de BHI a 37°C durante 24 horas, se centrifugó a 3,900 g, a 6°C, durante 15 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se mantuvo congelado a -10 °C hasta su uso. Se realizaron diluciones dobles de la hemolisina (sobrenadante) en microplacas

de 96 pozos, con un volumen final de 100 μ l, se agregaron 100 μ l de eritrocitos de carnero al 1%, se agitaron y dejaron en incubación durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se realizó la lectura de las microplacas en un Multiskan Ascent V1.22, a 405 nm (92,70).

Se obtuvo un cultivo en medio de caldo brucela más suero al 10%, de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* seleccionados, se centrifugaron a 3,900 g a 6°C durante 15 min. , se obtuvo el sobrenadante (FLD) y se trabajó la prueba en microplaca para la cuantificación de la toxina (92,70).

Se realizaron diluciones dobles del sobrenadante (FLD) en las microplacas de 96 pozos, a volumen final de 100 μ l, se agregaron los 100 μ l de glóbulos rojos de carnero al 1%, se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C, se adicionaron 100 μ l de la hemolisina de la cepa *Staphylococcus aureus* Cowan 1 previamente titulada, se incubó a temperatura ambiente 1/2 h y posteriormente 18 h a 4°C.

Se incluyeron como testigos: un pozo con solo eritrocitos en solución salina fisiológica, otro con eritrocitos más el sobrenadante (FLD) y uno con eritrocitos y hemolisina (blanco). Se realizó la lectura de las microplacas en un Multiskan Ascent V1.22, a 405 nm. Con las absorciones y los porcentajes se realizó una curva contra dilución del sobrenadante (92,70).

Electroforesis.

Para la separación analítica de las proteínas, se utilizó PAGE-SDS por el método de Laemmli, las diferentes proteínas en el gel se separan en función de sus pesos moleculares (97,98,99).

Se tomaron aleatoriamente 8 aislamientos de cada grupo (4 cutáneas y 4 viscerales), se obtuvo de cada uno un cultivo en caldo brucela más suero al 10%, se centrifugaron a 3,900 g a 6°C durante 15 min., se retiró el sobrenadante y el sedimento se restituyó en 5 ml de solución salina fisiológica al 85% y se sonicó a 45-90 hertz por 60 segundos en 5 ciclos, con la finalidad de destruir los cuerpos bacterianos y liberar las proteínas somáticas.

Las soluciones sonicadas se centrifugaron a 5,000 g por minuto a 6°C durante 15 min, posteriormente se les retiró el sobrenadante y se usó para determinar la cantidad total de proteínas por el método de Bradford y se calculó el volumen necesario a utilizar en el corrimiento electroforético (97,98,99,100).

Corrimiento electroforético: 50 µg de proteínas de cada muestra se mezclaron con 200 µl de buffer de muestra (4ml de agua destilada, 1ml de Tris – HCl al 0.5M y a un pH de 6.8, 0.8 ml de glicerol, 1.6 ml de duodecilsulfato de sodio al 10%, 4ml de 2b-mercaptoetanol y 0.2 ml de azul de bromofenol al 0.5%) y se sometieron a ebullición (aprox. 95°C) durante 1 minuto. Se adicionó a cada carril 10 µl de la muestra haciéndola correr en PAGE-SDS al 12.5%. En un canal se depositó la solución con los marcadores de peso molecular. El corrimiento se realizó a 80 volts la primera hora y 120 volts en la segunda, en el buffer de corrimiento (97,98,99).

De cada muestra se realizaron dos geles, uno para ser teñido con nitrato de plata y otro para realizar la inmunotransferencia. Una vez finalizado el tiempo de corrida, uno de los geles se fijó con una solución de metanol al 10%, y ácido acético al 0.5% por media hora, posteriormente el gel se sumergió en una solución de nitrato de plata 0.011 M en agitación constante y en oscuridad, se realizaron tres lavados de un minuto con agua desionizada y se sumergió el gel en una solución reveladora en agitación constante hasta que desapareció el precipitado sobre el gel, cuando aparecieron las bandas y el gel comenzó a oscurecerse, se sacó de la solución de revelado y se fijó con metanol al 10% y ácido acético 0.5% (97).

El peso molecular de las bandas fue estimado con el programa Syngene, comparándolo con el estándar de proteínas de peso molecular conocido.

Inmunotransferencia.

Se estableció bajo métodos estandarizados un calendario de inmunización en conejos (101), se utilizaron 4 conejos, los cuales fueron inoculados con el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* proporcionado por el CENID-INIFAP para obtener suero hiperinmune y utilizarlo en la inmunotransferencia (cuadro 1).

Cuadro 1. Calendario de inmunización en conejos para la prueba de inmunotransferencia.

Día	Vía	Cantidad	Observación
1	SC	1 ml de bacterina + 0.3 de adyuvante completo de Freud	Sangrado antes de inocular.
5	IM	1 ml de bacterina + 0.3 de adyuvante incompleto de Freud	
15	IM	1 ml de bacterina + 0.3 de adyuvante incompleto de Freud	Sangrado antes de inocular
20	IM	1 ml de bacterina sin adyuvante	
25	IM	1 ml de bacteria viva	Sangrado antes de inocular
30	Sangría blanco		

Después de separar las proteínas por PAGE-SDS, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por electrotransferencia a 80 volts, y 400 mA durante una hora (99,102).

La membrana de nitrocelulosa fue tratada por 24 horas, con leche descremada al 5% con la finalidad de bloquearla, se lavó la membrana en tres ocasiones con PBS-Tween 20 por 15 minutos y se procedió a cortarla en tiras de aproximadamente 5 milímetros de ancho, las cuales fueron depositadas en placas con canales, a los que se les adicionaron 7 mililitros de suero hiperinmune con PBS+Tween 20+leche descremada al 5% y se incubó en agitación durante dos horas a 37°C o toda la noche a 4°C (99,102).

A continuación las tiras se lavaron en tres ocasiones con PBS+Tween 20 durante 15 minutos y finalmente se incubaron con proteína A conjugada con peroxidasa a una dilución de 1:2000, en agitación por dos horas, a 37°C o toda la noche a 4°C (99,102).

Nuevamente se hicieron tres lavados de 15 minutos cada uno con PBS-Tween 20 y finalmente dos más con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Para el revelado de la membrana se utilizó Diaminobenzidina (DAB) al 0.05%, 20 µg de DAB en 40 mililitros de ácido fosfórico 50 mM a pH 7.4, agitándose por 40 minutos y finalmente se filtró. A esta solución se agregó lentamente 1.2 mililitros de solución NiCo (15 mg de NiCl₂ y 15 mg de CoCl₂) y 400 µl de

H₂O₂. Una vez que se prepararon estas soluciones se agregaron a las tiras en agitación y la reacción se terminó al obtener la intensidad deseada de las bandas en agua (99,102).

Resultados

Obtención de muestras.

Se obtuvieron 241 muestras en total y el porcentaje de las mismas obtenidas entre las dos presentaciones es muy similar, como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Muestras de lesiones sugestivas de linfadenitis caseosa obtenidas de animales provenientes de rebaños y de rastro.

Presentación clínica	Cantidad	Porcentaje
Cutánea (rebaños)	106	43%
Visceral (rastros)	135	56%
Total:	241	100%

Por otro lado las muestras que se obtuvieron por órgano de cada presentación clínica, muestran una clara distribución preferencial por el linfonodo parotideo en la cutánea y por el pulmón en la visceral como se muestra en el cuadro 3. No se observaron lesiones clínicas a la inspección y palpación de riñón, linfonodo prescapular y linfonodo precrural.

Identificación.

En el cuadro 4 se observa el total de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* que se lograron por cada órgano y también por cada presentación, el cuadro muestra además la cantidad de aislamientos negativos y los pertenecientes a otras bacterias.

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

Cuadro 3. Muestras obtenidas por órganos de cada presentación clínica.

Cutánea		n (%)
Linfonodo parotideo		65 (61)
Linfonodo submandibular		39 (37)
Otros		2 (2)
	Total:	106 (100)

Visceral		n (%)
Pulmón		87 (64)
Linfonodo pulmonar		28 (21)
Hígado		20 (15)
	Total:	135 (100)

Cuadro 4. Aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de las muestras sospechosas de linfadenitis caseosa en ovinos.

Cutánea	<i>C. pseudotuberculosis</i>		Otras	Negativas	Total
	No.	(%)			
Linf. Parotideo	17	(26)	21	(32)	65
Linf. Submandibular	11	(28)	26	(67)	39
Otros	1	(50)	1	(50)	2
Total:	29	(27)	48	(46)	106
Visceral	<i>C. pseudotuberculosis</i>		Otras	Negativas	Total
	No.	(%)			
Pulmón	29	(33)	48	(54)	88
Linf. Pulmonar	11	(38)	15	(52)	29
Hígado	5	(28)	13	(72)	18
Total:	45	(33)	76	(57)	135

Se realizó una prueba de X^2 utilizando el programa STATISTIC, entre los aislamientos positivos de *C. pseudotuberculosis* y las dos presentaciones de la enfermedad, donde no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Conservación.

Para determinar el mejor medio de cultivo para el crecimiento de *C. pseudotuberculosis* se utilizaron dos medios diferentes, el caldo Todd-Hewitt

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y el caldo brucela, y se calculó su velocidad de crecimiento mediante la pendiente de la gráfica.

Cuadro 5. Velocidad de crecimiento de dos aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en caldo Todd-Hewitt y caldo brucela.

Aislamiento	Todd-Hewitt	brucela
Aislamiento No. 32 (absceso linfonodo submandibular)	$m = 3.7648$	$m = 3.3571$
Aislamiento No. 48 (absceso linfonodo submandibular)	$m = 1.1044$	$m = 2.4571$

Se realizó la curva de crecimiento en caldo brucela para el aislamiento donado por el CENID-INIFAP de *C. pseudotuberculosis*, calculando la velocidad mediante la pendiente de la gráfica ($m = 5.7583$) como se muestra en la figura 1.

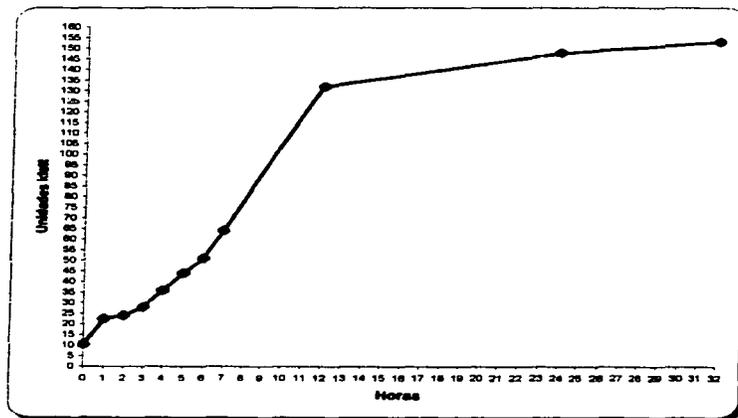


Figura 1. Curva de crecimiento en caldo brucela para *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Mediante el uso de diferentes métodos de conservación y en diferentes medios, se determinó el más adecuado para conservar los aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Viabilidad de aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en diferentes métodos de conservación.

Método de conservación	Viabilidad
Agar sangre	7 – 10 días
Medio huevo de Dorset	20 – 23 días
Ultracongelación	> 2 años

Caracterización.

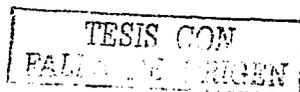
Se realizaron una serie de pruebas bioquímicas a los aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, en las cuales se encontraron algunas diferencias en relación a lo mencionado por Bergey et, al. en 1994 (16) para los azúcares maltosa, glucosa, galactosa y gránulos metacromáticos (Albert)(cuadro 7).

Agrupamiento.

Se estableció la relación entre la utilización de los tres carbohidratos con la forma de LC, de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* y el órgano de procedencia (cuadro 8).

Se realizó una prueba de hipótesis para dos proporciones de grupos independientes ($p < 0.05$), utilizando el programa estadístico Microstat, los asteriscos indican diferencias significativas (cuadro 9).

Con base en los resultados de la utilización de los diferentes carbohidratos los aislamientos se agruparon en diferentes biotipos, mostrándose los datos de el número de los aislamientos y sus frecuencias en el cuadro 10.



Cuadro 7. Resultados de las pruebas bioquímicas para los aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

PRUEBA	POSITIVO	%	NEGATIVO	%	Bergey et. al. 1994
CATALASA	253	100	0	0	+
ALMIDÓN	253	100	0	0	+
FRUCTUOSA	253	100	0	0	+
MANOSA	253	100	0	0	+
UREA	253	100	0	0	+
ARGININA	253	100	0	0	+
MALTOSA	194	77	59	23	+
GLUCOSA	143	57	110	43	+
GALACTOSA	130	51	123	49	+
ALBERT	132	52	121	48	+
OXIDASA	0	0	253	100	-
VP	0	0	253	100	-
H ₂ S	0	0	253	100	-
CELOBIOSA	0	0	253	100	N/D ¹
DULCITOL	0	0	253	100	N/D ¹
INOSITOL	0	0	253	100	N/D ¹
LACTOSA	0	0	253	100	-
MANITOL	0	0	253	100	-
RAFINOSA	0	0	253	100	-
SALICINA	0	0	253	100	-
TREHALOSA	0	0	253	100	(-) ²
XILOSA	0	0	253	100	-

¹ No se encontraron datos de evaluación de estos carbohidratos.

² Ocasionalmente aislamientos positivos.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Cuadro 8. Relación de las pruebas bioquímicas variables de *C. pseudotuberculosis* con el órgano de procedencia.

Cutánea					
Carbohidratos	Resultado	Parotideo No.-(%)	Submandibular No.-(%)	Otros No.-(%)	Total No.-(%)
Glucosa	Positivo	6 (10%)	9 (23%)	5 (100%)	20 (19%)
	Negativo	56 (90%)	30 (77%)	0	86 (81%)
Galactosa	Positivo	5 (8%)	9 (23%)	5 (100%)	19 (18%)
	Negativo	57 (92%)	30 (77%)	0	87 (82%)
Maltosa	Positivo	38 (61%)	24 (62%)	5 (100%)	67 (63%)
	Negativo	24 (39%)	15 (38%)	0	39 (37%)

Visceral					
Carbohidratos	Resultado	Parotideo No.-(%)	Submandibular No.-(%)	Otros No.-(%)	Total No.-(%)
Glucosa	Positivo	75 (76%)	33 (97%)	15 (100%)	123 (83.7%)
	Negativo	23 (24%)	1 (3%)	0	24 (16.3%)
Galactosa	Positivo	73 (75%)	28 (82%)	10 (67%)	111 (75.5%)
	Negativo	25 (25%)	6 (18%)	5 (33%)	36 (24.5%)
Maltosa	Positivo	79 (81%)	33 (97%)	15 (100%)	127 (86.4%)
	Negativo	19 (19%)	1 (3%)	0	20 (13.6%)

Cuadro 9. Análisis estadístico de la presentación cutánea y visceral, con los tres carbohidratos variables.

Carbohidratos	Resultado	Cutánea	Visceral	P < 0.05
Glucosa	Positivo	20 (19%)	123 (83.7%)	0.0001*
	Negativo	86 (81%)	24 (16.3%)	0.0001*
Galactosa	Positivo	19 (18%)	111 (75.5%)	0.0037*
	Negativo	87 (82%)	36 (24.5%)	0.0002*
Maltosa	Positivo	67 (63%)	127 (86.4%)	0.057
	Negativo	39 (37%)	20 (13.6%)	-0.57

* Diferencias estadísticas significativas (p<0.05).

TRABAJOS CON
ORIGEN

Cuadro 10. Frecuencias de los diferentes biotipos.

Biotipo	No. aislam	Frecuencia (%)
GLU + GAL + MAL +	123	48.62
GLU - GAL - MAL -	56	22.13
GLU - GAL - MAL +	49	19.37
GLU + GAL - MAL +	17	6.72
GLU - GAL + MAL +	5	1.98
GLU + GAL + MAL -	2	0.79
GLU + GAL - MAL -	1	0.40
GLU - GAL + MAL -	0	0.00
Total:	253	100

Por otro lado se graficaron los datos en el programa excel, donde en el eje de las X se colocaron los biotipos obtenidos de los diferentes aislamientos de *C. pseudotuberculosis* y en el eje de las Y las frecuencias de los mismos, obteniendo una grafica como se muestra en la figura 2.

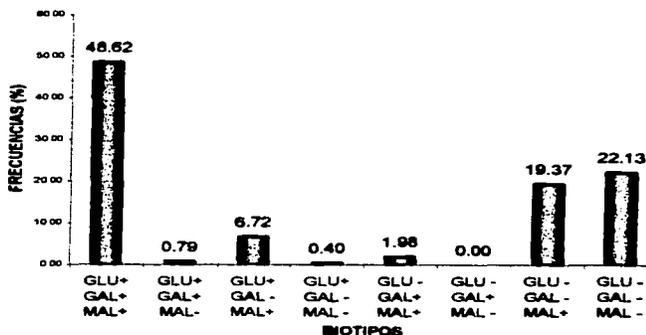


Figura 2. Gráfica de frecuencias de los diferentes biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Considerando la frecuencia elevada de ciertos biotipos, se procedió a separarlos por el tipo de presentación clínica cuadro 11 y graficado en la figura 3.

Cuadro 11. Diferentes biotipos y sus frecuencias en la presentación cutánea y visceral.

Biotipo	No. aislam	Cutánea	Visceral
GLU + GAL + MAL +	123	14	109
GLU - GAL - MAL -	56	38	18
GLU - GAL - MAL +	49	48	1
GLU + GAL - MAL +	17	0	17
GLU - GAL + MAL +	5	5	0
GLU + GAL + MAL -	2	0	2
GLU + GAL - MAL -	1	1	0
GLU - GAL + MAL -	0	0	0
Total:	253		

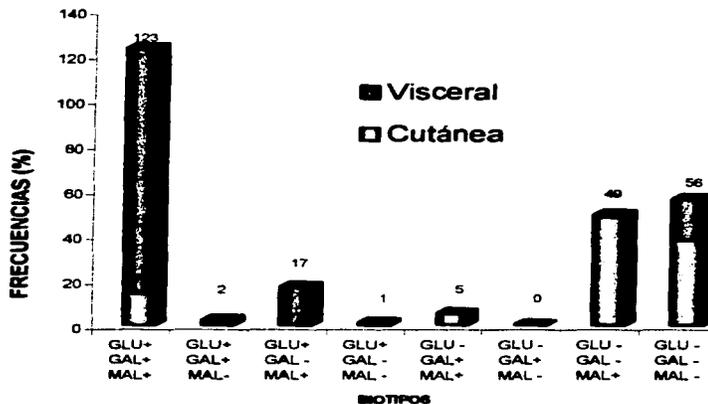


Figura 3. Frecuencias cutánea y visceral de los diferentes biotipos.

Producción de toxina.

En la prueba de CAMP inversa se evaluó de manera cualitativa (a simple vista) la producción de FLD, no existieron diferencias significativas en los resultados para los aislamientos evaluados. De los resultados de la titulación de la hemolisina del *S. aureus* Cowan 1, se definió una unidad hemolítica (1 UH), como la dilución que causó lisis del 50% de los eritrocitos y que resultó en la dilución 1/325. Para la cuantificación de la FLD se utilizaron 2 UH para obtener resultados más confiables.

En el cuadro 12 se muestran los resultados de la titulación de la fosfolipasa D, mediante la inhibición de la hemólisis de la beta lisina producida por el *S. aureus* Cowan 1. Se realizó una prueba de t de Student para dos proporciones de grupos independientes entre las dos presentaciones donde no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 12. Unidades de fosfolipasa D que bloquean el efecto de 2 unidades hemolíticas de *Staphylococcus aureus* Cowan 1*.

Cutánea		Visceral	
Aislamiento	UFLD	Aislamiento	UFLD
12	1/3200	1	1/1600
16	1/1600	8	1/1600
26	1/1600	22	1/1600
45	1/1600	43	1/1600
47	1/1600	58	1/1600
61	1/3200	66	1/1600
92	1/1600	88	1/800
102	1/1600	110	1/1600
112	1/1600	156	1/1600
118	1/1600	162	1/800
120	1/1600	175	1/1600
129	1/1600	188	1/1600
133	1/1600	200	1/1600
149	1/1600	206	1/1600
189	1/1600	212	1/800

* Una unidad de FLD se define como, la dilución de FLD que bloquea 2 UH de la hemolisina del *S. aureus* Cowan 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Electroforésis.

En la figura 4 se muestran los geles del corrimiento electroforético tanto para los aislamientos de la presentación cutánea como para la presentación visceral, los cuales fueron analizados por medio del programa Syngene para la obtención de los pesos moleculares.

Los patrones de separación de proteínas en geles resultaron idénticos para los aislamientos estudiados, independientemente de la forma de presentación de la enfermedad (cutánea o visceral) o del biotipo considerado (patrón fermentativo).

No se observaron diferencias en las proteínas fraccionadas en los 17 aislamientos evaluados, se separaron 8 proteínas de pesos: 69.62, 57.91, 53.26, 47.78, 35.97, 33.84, 31.96 y 23.46 kDa respectivamente..

Inmunotransferencia

Se utilizó el suero hiperinmune del conejo desafiado con el aislamiento del CENID-INIFAP, contra los tres diferentes biotipos y las dos presentaciones clínicas, en todos los casos el suero reconoció la misma proteína de 69.62 PM (figura 5).

En las 6 muestras ensayadas y en la muestra homóloga (CENID-INIFAP), el suero de conejo reconoció a la proteína fraccionada de mayor peso molecular 69.62 kDa.

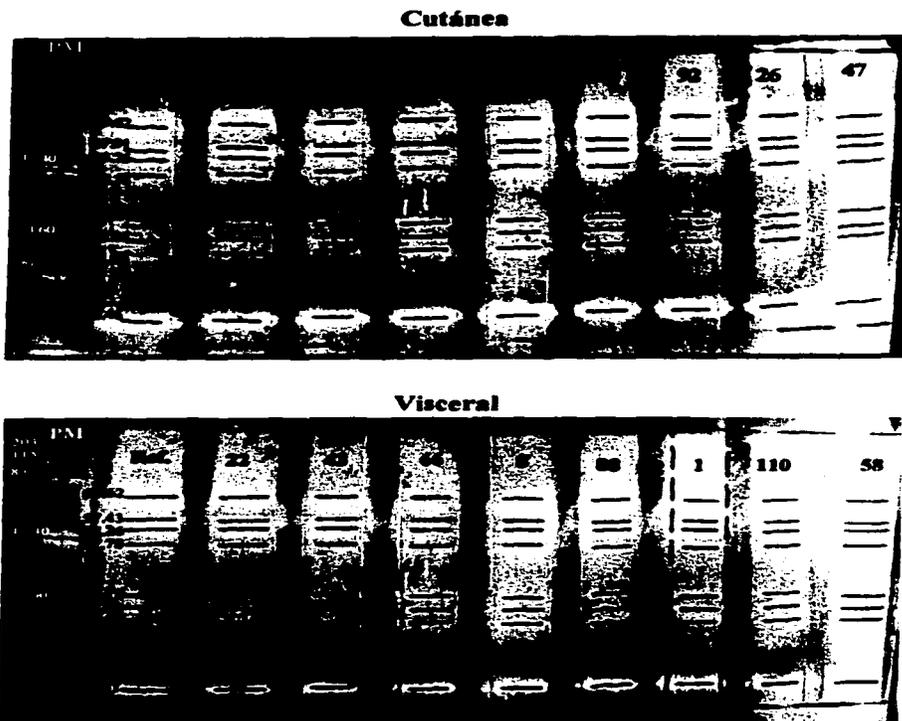


Figura 4. Corrimiento electroforético de las cepas de la presentación cutánea y visceral, el peso molecular de las bandas fue estimado con el programa Syngene, comparándolo con el estándar de proteínas de peso molecular conocido.

TECNOLOGÍA
FALLA DE ORIGEN

Biotipo	Identificación
GLU + GAL + MAL +	1
GLU + GAL + MAL -	2
GLU - GAL - MAL -	3



- c = presentación cutánea.
- v = presentación visceral.

Figura 5. Inmunotransferencia de los aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión

Se muestrearon 190 animales, se obtuvieron 241 muestras en total, de linfonodos y vísceras con lesiones sugestivas de LC. Estos 190 casos de 1500 cabezas inspeccionadas, implicó una frecuencia clínica de 12.6 %, no se tienen datos de frecuencia clínica a nivel de rastro, Barrientos et, al. en 1996 (27) a nivel de campo, reportaron una frecuencia clínica, en un estudio longitudinal de 17 meses, de 6.4 % (11/170), estas bajas frecuencias pueden explicarse parcialmente por el comportamiento epidemiológico cíclico de 3 a 5 años, señalado para la LC por Richard et, al., en 1979 (103). Es probable además que los productores consideren la observación de lesiones como un criterio más en la toma de decisión para eliminar animales, aunque las muestras de rastro correspondieron a formas viscerales de LC, también por el hecho de que en la actualidad se han reforzado las medidas para evitar el sacrificio y el expendio de carne proveniente de animales sacrificados clandestinamente, por lo que hay mayor demanda de carne proveniente de rastro y por lo tanto un mayor número de animales son sacrificados en él.

Del total de muestras de presentación cutánea, 65 de 106 correspondieron al linfonodo parotideo, mientras que 39 de 106 se obtuvieron del linfonodo submandibular. Estos datos difieren de lo reportado por Barrientos et, al. en 1996 (27), donde no existieron diferencias significativas en la distribución de las lesiones de los linfonodos de la cabeza. En cabras también se ha observado, en particular en rebaños lecheros, una mayor presentación en nódulos de cabeza y cuello. Esta distribución en borregos pudiera corresponder a lesiones en la competencia por los comederos, en los modelos con suplementación en corral y pudiera reforzar el planteamiento de la patogenia de esta enfermedad provocada por lesiones traumáticas durante la pelea; ello sin dejar de tomar en cuenta que la vía de entrada puede representar la zona primordial de lesiones nodulares (104).

De la presentación clínica visceral, 87 de 135 correspondieron a pulmón, siguiéndole 28 de 135 del linfonodo pulmonar y 20 de 135 al hígado. Estos resultados no concuerdan con lo reportado en trabajos previos en los cuales se menciona que la presentación visceral en pulmones y los linfonodos mediastínicos y bronquiales ocurre con una frecuencia del 25%, que contrasta con el 85% de este trabajo. Cabe mencionar que algunos de estos trabajos son modelos de experimentación para detectar vías de diseminación del

microorganismo. Esta mayor frecuencia de lesiones pulmonares puede deberse a las neumonías que son comunes en los rebaños mexicanos, actuando el foco neumónico como concentrador de macrófagos infectados por *C. pseudotuberculosis* (12, 26, 30, 31, 32, 34, 37, 41, 44, 45, 54, 79, 80).

El muestreo realizado en el rastro (n = 135), fue sesgado ya que se realizó sobre la línea de vísceras y no fue revisada la canal para descartar la posibilidad de la presentación cutánea, o mixta. Por otro lado, el muestreo en las explotaciones tuvo una inducción, ya que sólo se puede evaluar clínicamente (por palpación) la presentación cutánea, no pudiendo descartar en el momento una presentación visceral. A pesar de estas divergencias del muestreo, éste se realizó así, debido a que nuestro objetivo primordial era tener aislamientos con una certeza alta del sitio y presentación de la enfermedad.

En la presentación cutánea, el linfonodo parotídeo se logró en 17 de 65 muestras el aislamiento positivo de *C. pseudotuberculosis* en el linfonodo submandibular resultaron positivas 11 de 39, estos datos son similares a lo reportado por Barrientos et. al. en 1996 (27).

La presentación visceral guardó la misma relación que la presentación cutánea, en pulmón 29 de 88 resultaron positivas, en el linfonodo pulmonar 11 de 29 y en hígado 5 de 18 respectivamente. Se considera que la vía de diseminación son los macrófagos infectados, diseminándose por sangre o linfa, con la entrada del microorganismo por heridas de piel. Lesiones neumónicas o de hepatitis de diferente origen podrían localizar los macrófagos infectados en estos parénquimas (12, 26, 30, 31, 32, 34, 37, 41, 44, 45, 54, 79, 80).

Del total de muestras trabajadas se logró un mayor número de aislamientos de otros géneros bacterianos (*Bacteroides spp.*, *Bacillus spp.* y *Streptococcus spp.*) esto indica que de las lesiones clínicas de linfadenitis a nivel de campo no todas corresponden a *C. pseudotuberculosis*, o bien estas lesiones inician con la presencia de *C. pseudotuberculosis* y otros piógenos y estos últimos resisten por más tiempo las condiciones del foco mucopurulento.

C. pseudotuberculosis mostró una velocidad de crecimiento, calculada mediante la pendiente de la gráfica de $m = 5.7583$ y no presentó fase de

latencia, porque se utilizó el mismo medio de cultivo para el preinoculo, por lo tanto las bacterias no sufrieron de condiciones desfavorables y se adaptaron rápidamente. La curva muestra desde un inicio, una fase de crecimiento exponencial con una duración de 12 h aproximadamente. Posterior a las 12 horas, se puede asumir que la bacteria entra en una fase estacionaria, en la cual la tasa de crecimiento es decreciente o de cero, en esta fase se encontró la mayor cantidad de bacterias en el medio (92).

La viabilidad de los aislamientos en los diferentes sistemas de conservación, indicó que, las placas de agar sangre, mantuvieron viables no más de 10 días las bacterias en refrigeración, siendo un método de conservación poco recomendable para periodos largos, pero adecuado para el manejo de los aislamientos en experimentación. El medio Huevo de Dorset, mantuvo las células viables hasta los 23 días en refrigeración, si bien permitió conservar los aislamientos por un periodo mayor que el agar sangre, sin embargo la dificultad en la preparación de este medio, puede complicar su uso en la conservación y manejo de *C. pseudotuberculosis*. El método de ultracongelación encambio, permitió conservar los aislamientos por periodos de más de 2 años y se acerca a las características de un método de conservación ideal, considerado por algunos autores como aquel que mantiene una viabilidad alta, no genera cambios en la población por selección, no ocurren cambios genéticos, se mantiene la pureza y no implica costos excesivos. También el liofilizado ha sido señalado como un método de conservación eficiente para esta bacteria (94, 95).

Como resultado de la caracterización metabólica de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, se encontró que de las 22 pruebas realizadas, en cuatro, los resultados fueron diferentes a lo señalado por Bergey et. al. en 1994 (16). Estas pruebas fueron, la utilización de los carbohidratos maltosa, glucosa y galactosa y la tinción de Albert para gránulos metacromáticos.

Sugiriendo que los aislamientos evaluados son diferentes, o bien que existen diferentes biotipos, con la posibilidad de que existan aislamientos que cambian su metabolismo, en base al medio ambiente en el que se encuentran, lo cual podría explicar su diferente capacidad patógena y las variaciones anotadas en la patogenia de la enfermedad. Es probable que las condiciones de presión de O_2 , de CO_2 y de concentración de nutrientes en el tejido linfoide de los linfonodos y en los parénquimas, modifique los patrones fermentativos.

En la utilización de los carbohidratos celobiosa, dulcitol e inositol, no se encontraron datos de su evaluación y el total de los aislamientos trabajados (n = 253) dio resultado negativo. Así mismo, en la utilización de trehalosa la bacteria se reporta como ocasionalmente positiva (16) y en este trabajo el total de los aislamientos fueron negativos.

Con base en los resultados de las pruebas bioquímicas de comportamiento metabólico variable, se agruparon los aislamientos, de acuerdo a la presentación y al órgano de procedencia. En los aislamientos de casos de presentación cutánea, la mayoría no utiliza glucosa 81% (86:101) y galactosa 82% (87:106) pero para maltosa, la mayoría fueron positivos 63% (67:106). Para los aislamientos de la presentación visceral, los resultados fueron inversos, la mayoría fueron positivos a la glucosa 83.7% (123:147) y la galactosa 75.5% (111:147) y con la maltosa 86.4% (127:147) se comportaron de manera similar a las de la presentación cutánea. Soportando la posibilidad de selección de diferentes biotipos del microorganismo influidos por el medio ambiente tisular en el que se encuentra la bacteria.

El análisis estadístico, con la prueba de hipótesis para dos proporciones de grupos independientes, comparando los aislamientos de presentación cutánea contra las viscerales, en relación a la positividad o negatividad para cada uno de los tres carbohidratos, indicó que existen diferencias significativas entre las dos presentaciones para glucosa y galactosa ($p < 0.05$), pero no para maltosa.

Por otro lado, se agruparon los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* en los posibles diferentes biotipos, en base a los tres carbohidratos variables y se encontró que el biotipo GLU+GAL+MAL+ fue el de mayor frecuencia (48.62 %), correspondiendo a lo que sería una cepa clásica de *C. pseudotuberculosis*, no así, los biotipos, GLU-GAL-MAL- (22.13 %) y GLU-GAL-MAL+ (19.37 %), donde la diferencia la hace la utilización de la maltosa.

Cuando se compararon los diferentes biotipos, entre las dos presentaciones se encontró que el biotipo clásico de GLU+GAL+MAL+ se encuentra con mayor frecuencia en la presentación visceral, por otra parte los biotipos GLU-GAL-MAL- , GLU-GAL-MAL+ tienen mayor frecuencia en la presentación cutánea.

Como se puede analizar de los resultados del cuadro de biotipos, Glu⁺-Gal⁺ se encontró con una frecuencia de 49.4 % (125/252) y el biotipo Glu⁻-Gal⁻ con 41.5% (105/252) lo que indica claramente que estos dos marcadores genéticos se encuentran ligados, por lo que una alteración puede causar el cambio fenotípico de ambos marcadores.

Las posibilidades para este resultado pueden ser que el defecto, en el fenotipo no fermentador se deba a:

- a) Es posible que los dos carbohidratos empleen el mismo transportador para ingresar a la célula (105) por lo que el defecto tendrá que ser el gen que codifica para la proteína transportadora o fosforiladora (106).
- b) Debido a que nuestras determinaciones evaluaron la capacidad de fermentar los carbohidratos y que se ha descrito que la galactosa tiene que ser transformada a fructuosa 1-6 difosfato para ingresar a la glicólisis (107), por lo que cualquier alteración genética en las proteínas que participan en el proceso fermentativo, posteriormente a la ruta común, pueden provocar el cambio fenotípico de ambos marcadores a la vez.

Para poder definir de cual alteración se trata, es necesario realizar estudios con otros carbohidratos afines y definir si la glucosa y la galactosa son capaces de penetrar a la célula en ambos biotipos.

El caso de la maltosa es diferente ya que se observó que el 76.7% de los aislamientos fueron maltosa positivas no existiendo diferencias en este fenotipo con respecto a los dos biotipos anteriormente descritos. Debido a que la maltosa es el disacárido formado por dos glucosas, existen dos posibilidades para la alteración, la primera es que tenga un transportador diferente al de la glucosa y la galactosa (106), por lo que puede ingresar independientemente del daño de los otros biotipos. La otra posibilidad es que el daño se encuentre en alguna enzima extracelular o intracelular que realiza la hidrólisis de la maltosa, por lo que se requiera el rompimiento para ingresar a la célula o ser utilizada en las rutas fermentativas.

Para poder dilucidar cual alteración tienen los dos biotipos principales es necesario realizar estudios de crecimiento microbiano en presencia de estos carbohidratos, debido a que es posible que la bacteria si crezca pero no fermente. Este hecho parece ser reforzado por la observación de que no existieron diferencias aparentes en los patrones antigénicos de ambos biotipos y muchos de los antígenos de la pared y la membrana celular están compuestos por galactosa y glucosa.

No se encontró en la literatura revisada, información sobre estos cambios en los parámetros fermentativos de carbohidratos, aunque se han señalado modificaciones en utilización de nitritos, entre aislamientos obtenidos de diferentes especies animales y se consideran indicadores de variaciones biotípicas (17). En el futuro sera necesario evaluar las posibles correlaciones en estos indicadores bioquímicos, pues en este trabajo, quizás por solo trabajar con muestras de origen ovino, no se encontraron variaciones en la utilización de nitratos entre aislamientos de diferentes formas clínicas de LC.

Al evaluar de manera cuantitativa la producción de FLD, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos de cada presentación. Esto sugiere de que independientemente del biotipo de que se trate, la FLD es un elemento constante en el fenotipo de los aislamientos. Se ha implicado a la FLD como UN factor de virulencia en el *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por los resultados, la FLD no parece definir el camino que siga la bacteria en el desarrollo de la enfermedad posterior a la infección de los animales. Considerando que la presentación cutánea y visceral tienen diferente patogenia entonces la FLD no participa fuertemente en ella, en cambio los biotipos se relacionaron estadísticamente con estas dos presentaciones (12,39,52).

Llama la atención que con el procedimiento empleado solo se lograron separar 8 proteínas de relativamente bajo peso molecular, menos de 69.62 kDa. Esto difiere de lo reportado por Ellis et, al. en 1991 (51), los cuales obtuvieron aproximadamente 35 proteínas, sin embargo estos autores utilizaron un gel de 17.5%, que separó proteínas en un rango de 14 a 200 kDa, mientras que en este trabajo se empleó el gel al 12.5% que permitió observar fracciones desde 24 a 203 kDa. En el espacio de 14 a 24 kd, el trabajo de Ellis et, al. en 1991 (51) localiza 12 de las 35 proteínas observadas por estos

autores. Por otra parte en este trabajo se cultivó la bacteria en un medio adicionado con Tween 80 al 0.05%, que probablemente redujo la aglutinación espontánea de la bacteria y facilitó su disgregación en el proceso de sonicación que fue más extenso que el empleado en este trabajo, 15 minutos contra 15 segundos en tres oportunidades en este ensayo. Aunque la descripción de procedimientos en particular sonicado y resultados en las proteínas obtenidas, no está suficientemente detallada, el trabajo de Walker et. al. en 1994 (89), logra separar en un gel de 12.5% aproximadamente 18 proteínas.

Es posible que los tiempos de sonicación no fueron suficientes para separar los componentes de la compleja pared de la bacteria y que la mayor parte de las proteínas identificadas puedan corresponder al citosol, lo que también explicaría que solo una proteína fue reconocida por el suero de conejo en la inmunotransferencia.

La proteína de 69.2 kDa reconocida por los anticuerpos del conejo, coincide por otra parte, con una de las seis proteínas que en el trabajo de Ellis et. al. en 1991 (51) fueron reconocidas en la inmunotransferencia, empleando sueros de ovinos infectados naturalmente, que seguramente montan una respuesta más compleja, que la que se podía esperar con la aplicación de la bacteria inactivada al conejo, como se hizo en este ensayo.

Los resultados de producción de toxina, caracterización proteica e inmunotransferencia, indican que no existieron diferencias relevantes entre los aislamientos estudiados de *C. pseudotuberculosis* que pudieran influir su diferente comportamiento patogénico en las dos presentaciones de la enfermedad. Sin embargo, las diferencias observadas en la fermentación de azúcares, son sugestivas de factores auxiliares de virulencia diferentes para ambos biotipos.

Si consideramos que las diferencias repercuten prioritariamente sobre los aspectos metabólicos de la bacteria, existe la posibilidad de que la bacteria defina el camino o la ruta a seguir después de la infección, condición que estaría relacionada a la mayor sobrevivencia y adaptación al ambiente extracelular o intracelular (dentro del macrófago), observándose que aparentemente el biotipo Glu⁺-Gal⁺ tiene mayor capacidad de realizar una

diseminación, fundamentalmente asociada a los macrófagos (108), que el biotipo Glu⁻Gal⁻.

Este hecho pudiera tener relación con el tipo de macrófagos que controlan el problema, por lo que parece ser que los macrófagos fijos, son únicamente capaces de controlar al biotipo Glu⁻Gal⁻, en cambio los macrófagos de reacción generalizada (circulantes y reclutados) no pueden destruir al biotipo Glu⁺Gal⁺ eficientemente por lo que es más fácil su diseminación.

Si esto es cierto, entonces la alteración genética puede estar condicionando una mayor adaptabilidad al ambiente intracelular y eventualmente una mayor capacidad de sobrevivencia.

También es posible que exista algún otro factor auxiliar de virulencia, aún no detectado, que requiera la expresión ligada con el fenotipo Glu⁺Gal⁺ y a su vez éste condicione la diferencia en mecanismo de patogenicidad de los dos biotipos principales.

Definitivamente, una forma de elucidar la causa de la diferencia puede ser mediante la inoculación, por diferentes rutas de ambos biotipos y el posterior análisis de la presentación y localización desarrollada.

Conclusiones

- 1.- A nivel de campo los linfonodos de la cabeza son los más afectados y en este trabajo el linfonodo parotideo fue el más se afecto.
- 2.- Las lesiones clínicas de linfadenitis, no corresponden todas a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, jugando un papel importante otros géneros bacterianos.
3. – La ultracongelación con glicerol al 10% fue el método de conservación más adecuado de los evaluados en este trabajo.
4. – La presentación visceral presentó el biotipo $GLU^+ - GAL^+ - MAL^+$ (109/123) y la presentación cutánea $GLU^- - GAL^- - MAL^-$ (38/56).
5. – No existen diferencias relevantes en la producción de toxina, caracterización proteica e inmunotransferencia, en los aislamientos estudiados.

Bibliografia

- 1.- Walker, J. (1991) Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. *Clin. Exp. Immunol.* **86**, 13-18.
- 2.- Pépin, M.; Seow, H.F.; Corner, L.; Rothel, J.S.; Hodgson, A.L.M.; Wood, P.R. (1997) Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.* **28**, 149-163.
- 3.- Zaitoun, A.M.; Bayoumi, A.H. (1994) Some epidemiological studies on ovine pseudotuberculosis. *Assiut Vet. Med. J. Vol.* **31**, 61.
- 4.- Ashfaq, M. K.; Campbell, S. G. (1980) Experimentally Induced caseous lymphadenitis in goats. *Am. J. Vet. Res.* **41**, 1789-1792.
- 5.- Burrell, D.H. (1981) Caseous lymphadenitis in goats. *Aust. Vet. J.* **57**, 105-110.
- 6.- Holstad, G. (1986) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats I. Evaluation of two serological diagnostic tests. *Acta Vet. Scand.* **27**, 575-583.
- 7.- Literak, I.; Skalka, B.; Rychla, R. (1994) Danger for sheep farming. Caseous lymphadenitis (pseudotuberculosis) of sheep also in the Czech Republic. *Veterinarstvi.* **4**, 149-151.
- 8.- Paton, M.W., et, al. (1994) New Infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, reduces wool production. *Aust. Vet. J.* **2**, 47-49.
- 9.- Sayed, A.M.; Abdel-Fattah, A.M.; Manaa, A.M.; Sayed, A.M. (1995) Caseous lymphadenitis of sheep at Assiut Governorate: disease prevalence, lesion distribution, and bacteriological. *Assiut Vet. Med. J. Vol.* **33**, 65.
- 10.- Goodfellow, M.; Minnikin, D. E. (1981) Introduction to the coryne from bacteria. In: *The Prokaryotes. Vol. II. Edited by Starr and col. New York.* 1811-1826.

- 11.- Jawetz, L.D.; Melnick, J.; Adelberg, E. (1982) Review of medical microbiology. **Lange Medical Publication, Los Altos, California.**
- 12.- Brown, C.C.; Olander, H. J.; Alves, S.F. (1987) Caseous lymphadenitis of goats and sheep. A review. **Vet. Bull. 57:1.**
- 13.- Barksdale, L. (1981) The genus *Corynebacterium* "The prokaryotes, Vol. II", edited by M. P. Starr New York .1872-1839.
- 14.- Ionedá T.; Silva, C.L. (1979) Purification of 1-monoacylglycerols containing alpha-branched-beta-hydroxylated fatty acids from lipids of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Chem. Phys. Lipids 12, 1098-1103.**
15. – Cowan, S.T., (1979). Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. **319.**
16. – Bergey, et. al., (1994) Manual of Systemic Bacteriology. **Vol 2, 1216-1282**
- 17.- Barakat, A.A.; Selim, S.A.; Atef, A.; Saber, M.S.; Nafic, E.K.; El-Ebeedy, A.A. (1984) Two serotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different animal species. **Rev. Sci. Tech., Off Internat. Epizootics 3, 151-163.**
- 18.- Sutherland, S.S.; Hart, R.A., Buller, N.B. (1996) Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. **Veterinary Microbiology 49, 1-9.**
- 19.- Ashfaq, M. K.; Campbell, S. G. (1979) A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. **Vet. Med. Small Anim. Clin. 74, 1161-1165.**
- 20.- Muckle, C.A.; Gyles, C.L. (1982) Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Can. J. Comp. Med. 46, 206-208.**

- 21.- Muckle, C.A.; Gyles, C.L. (1984) Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **Am. J. Vet. Res.** **44**, 1149-1153.
- 22.- Bernheimer, A.W.; Linder, R.B.; Avigad, L.S. (1980) Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. **Infec. Immun.** **29**, 123-131.
- 23.- Knight, H.D. (1978) A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **Cornell vet.** **68**, 220-237.
- 24.- Cuevas, W.A.; Songer, J.G. (1993) *Arcanobacterium haemolyticum* Phospholipase D Is Genetically and Functionally Similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D. **Infection and Immunity**, **4310-4316**.
- 25.- Augustine, J.L.; Renshaw, H.W. (1982) *Corynebacterium pseudotuberculosis* survival in soil samples amended with water. Proceedings 3rd International Conference on Goat production and Disease, Tucson, Arizona p. 526.
- 26.- Nairn, M.E.; Robertson, J.P. (1982) The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. Proceedings International Conference on Goat Production and Disease, Tucson, Arizona 455-457.
- 27.- Barrientos, P.J.; Garcia, G.D. (1996) Estudio Clínico-patológico de la Linfadenitis Caseosa en un rebaño ovino comercial. **FESC.** **80**.
- 28.- Paton, M.; Rose, I.; Hart, R.; Sutherland, S.; Mercy, A.; Ellis, T. (1996) Post-shearing management affects the seroincidence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks. **Preventive Veterinary Medicine** **26**, 275-284.
- 29.- Williams, C. S. F. (1980) Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. **VM/SAC.** **75**, 1165-1169.

- 30.- Nairn, M.E.; Robertson, J.P. (1977). The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination. Proceedings 54th Annual Conference of the Australian Veterinary Association pp. 159-161.
- 31.- Brogden, K.A.; Cutlip, R.C.; Lehmkuhl, H.D. (1984) Comparison of protection induced in lambs by *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell and cell wall vaccines. **Am. J. Vet. Res.** **45**, 2393-2395.
- 32.-Brogden, K. A.; Cutlip, R. C.; Lehmkuhl, H. D. (1984) Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in lambs. **Am J. Vet. Res.** **45**, 1532-1534.
- 33.- Holstad, G.; Teige, J. (1988) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats VI. Clinical and Pathological Changes after Intravenous Inoculation of the Organism. **Acta. Vet. Scand.** **29**, 281-286.
- 34.- Nagi, G. (1971) Ticks and caseous lymphadenitis in sheep preliminary observations. **J. South African Vet. Med. Ass.** **42**, 227-232.
- 35.- Alonso, J.L.; Simon, M.C.; Girones, O.; Muzquiz, J.L.; Ortega, C.; García, J. (1992) Caseous lymphadenitis. I. Economic and public health importance. **Med. Vet.** **9:3**, 135-148.
- 36.- Alonso, J.L.; Simon, M.C.; Girones, O.; Muzquiz, J.L.; Ortega, C.; García, J. (1992) Caseous lymphadenitis II. Clinical course, diagnosis, treatment and prophylaxis. **Med. Vet.** **9:3**, 149-155.
- 37.- Brown, C.C.; Olander, H.J.; Biberstein, E.L.; Moreno, D. (1985) Serologic response and lesions in goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* of caprine and equine origins. **Am. J. Vet. Res.** **46**, 2322-2326.
- 38.- Brown, C.C.; Olander, H. J.; Biberstein, E.L.; Morse, S.M. (1985) Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Am. J. Vet. Res.** **46**, 2380-2388.

- 39.- Brown, C.C.; Olander, H. J.; Zometa, C.; Alves, S.F. (1985) The synergistic hemolysis inhibition test for serologic detection apparent caseous lymphadenitis in goats and sheep. **Am. Vet. Res.** **46**, 2230-2242.
- 40.- Augustine, John L.; Renshaw, Harland H.W. (1986) Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. **Am J Vet Res**, Vol. **47**, 4.
- 41.- Hein, W.R.; Cargill, C.F. (1981) An abattoir survey of diseases of feral goats. **Aust. Vet. J.** **57**, 498-503.
- 42.- Poonacha, K.B.; Donahue, J.M. (1995) Abortion in a mare associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **J Vet Diagn Invest** **7:563-564**.
- 43.- Paton, M.W.; Sutherland, S.S.; Rose, I.R.; Hart, R.A.; Mercy, A.R.; Ellis, T.M. (1995) The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Australian Veterinary Journal** Vol. **72**, 7.
- 44.- Stoops, S.G.; Renshaw, H.W.; Thilsted; J.P. (1984) Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. **Am. J. Vet. Res** **45**, 557-561.
- 45.- Ellis, J.A.; Campos, M.; Snyder, M.; Chelak, B.; Haines, D.M. (1995) Local production of tumor necrosis factor-alpha in corynebacterial pulmonary lesions in sheep. **Vet. Pathology.** **1**, 68-71.
- 46.- Nagy, G. (1976) Caseous lymphadenitis in sheep-methods of infection. **J. S. Afr. Vet. Ass.** **47**, 197-199.
- 47.- Pépin, M.; Pardon, P.; Marly, J.; Lantier, F. (1988) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. **Am J Res.** Vol. **49**, 4.

- 48.- Hsu, T.Y.; Livingston, C.W. (1985) *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxina fatal haemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. **Am. J. Vet. Res.** **46**, 1206-1211.
- 49.- Hodgson, A.L.M.; Tachedjian, M.; Corner, L.A.; Radford, A.J. (1994) Protection of Sheep against Caseous Lymphadenitis by Use of a Single Oral Dose of Live Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, 5275-5280.
- 50.- Bernheimer, A. W.; Campbell, B.J.; Forrester, L.J. (1985) Comparative toxicology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Science** **228**. 590-591.
- 51.- Ellis, J. A.; Hawk, D.A.; Mills, K.W.; Pratt, D.L. (1991) Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** **28**. 289-301.
- 52.- Carne, H. R.; Onon, E. O. (1978) Action the *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. **Nature**. **271**, 246-248.
- 53.- Brogden, K.A.; Engen, R.L. (1990) Alterations in the phospholipid composition and morphology of ovine erythrocytes after intravenous inoculation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Am J Vet Res**, Vol. **51**, 6.
- 54.- Ellis, J.A.; Hawk, D.A.; Holler, L.D.; Mills, K.W.; Pratt, D.L. (1990) Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. **JAVMA**, Vol. **196**, 10.
- 55.- Eggleton, D.G.; Middleton, H.D.; Doidge, C.V.; Minty, D.W. (1991) Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Aust. Vet. J.** **68**:10, 317-319.

- 56.- Institute of Zootechnical and Veterinary Research Centre, P.O. Box 125, Mankon, Bamede-Cameroon; Institute of Zootechnical and Veterinary Research Station, P.O. Box 80, Bambui-Cameroon (1994) Caseous lymphadenitis in sheep and Goats in Mankon Cameroon **Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.** **42**, 163-166.
- 57.- Lloyd, S.; Lindsay, H.J.; Slater, J.D.; Jackson, P.G.G. (1990) Caseous lymphadenitis in goats in England. **Vet. Rec.** **127(19)**: 478.
- 58.- Lindsay, H. J.; Lloyd, S. (1991) Diagnosis of caseous lymphadenitis in goats. **Vet. Rec.** **128(4)** 86.
- 59.- Aleman, M.; Sharon, J.S.; Wilson, D.; Doherr, M. (1996) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982-1993). **JAVMA**, Vol. **209**, 4.
- 60.- Foreyt, W.J.; Jessup, D.A. (1982) Fatal pneumonia of bighorn sheep following association with domestic sheep. **J. Wild. Dis.** **18**, 163-168.
- 61.- Kariuki, D.P.; Poulton, J. (1982) Corynebacterial Infection of cattle in Kenya. **Trop. Anim. Health. Prod.** **14**, 33-36.
- 62.- Chakraborty, A.; Chaudhury, B.; Sarma, D.K. (1994) Pseudotuberculosis in a Black Buck (*Antilope cervicapra*). **Indian Vet. J.** **71**, 839-841.
- 63.- Malik, R.; Martin, P.; Davis, P.E.; Love, D.N. (1996) Localised *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a cat. **Aust. Vet. Practit.** **26**, 27.
- 64.- Goldberger, A.C.; Lipsky, B.A.; Plorde, J.J. (1981) Suppurative granulomatous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ovis*. **Am. J. Clin. Pathol.** **76**, 486-490.
- 65.- Peel, M.M.; Palmer, G.G.; Stacpoole, A.M.; Kerr, T.G. (1997) Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. **Clinical Infectious diseases** **24**, 185-191.

- 66.- Keskintepc, H. (1976) Stabilization of *Corynebacterium ovis* antigens for serum agglutination test. **Firat Univ. Vet. Fak. Derg.** **3**, 84-93.
- 67.- Knight, H. D. (1978) A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **Cornell. Vet.** **68.220-237.**
- 68.- Lund, A. T.; Almid, H. J.; Larsen & T, S. (1982) Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. **Acta Vet. Scand.** **23**, 473-482.
- 69.- Kuria, J.K.; Hostad, G. (1989) A seroepidemiological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks in southern Norway. **Acta-Veterinaria-Scandinavica.** **30**, 107-108.
70. – Valdivia, A.G., (1992). Cuantificación de la toxina de *Corynebacterium pseudotuberculosis* utilizando una técnica de inhibición de la hemolisina beta. **Reunion de investigación pecueria.** **277.**
- 71.- Chikamatsu, S.; Zhao, H.K.; Kikuchi, N.; Hiramunc, 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.
- 72.- Laak, E.A. ter.; Bosch, J.; Bijl, G.C.; Schreuder, B.E.C. (1992) Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assat and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **Am J Vet Res.** **Vol. 53**, 7, 1125-1132.
- 73.- Ramirez, C.I.C.; Valero, E.G.; Pijoan, A.C. (1992) Infección experimental de linfadenitis caseosa en ovinos. **Téc. Pec. Méx.** **Vol. 30**, 2.
- 74.- LeaMaster, B. R.; Shen, D. T.; Gorham, J. R.; Leathers, C.W.; Wells, H.D. (1987) Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for immunoligy protection of sheep against development caseous lymphadenitis. **Am. J. Vet. Re.** **48(5)** 869-872.

- 75.- Holstad, G.; Teige, J.; Jorgen, L. H. (1989) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats VIII. The Effect of Vaccination against Experimental Infection. **Acta. Vet. Scand.** **30**, 275-283.
- 76.- Holstad, G. (1989) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats IX. The Effect of Vaccination against Natural Infection. **Acta. Vet. Scand.** **30**, 285-293.
- 77.- Simon, V.M.; Alonso, M.J.; Girones, P.O.; Muzquiz, J.J.; Ortega, M.C.; Garcia, S.J. (1992) Vaccination against caseous lymphadenitis in sheep. Study of the efficacy of four vaccines tested in mice. **Rec. Med. Vet.** **1**, 35-41.
- 78.- Prodhon, M.A.M.; Olander, H.J.; Gardner, I.A. (1993) A comparison of Dot-Blot Assay with the Synergistic Haemolytic Inhibition Test in goats naturally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Research Communications** **17**, 193-196.
- 79.- Brogden, K.A.; Glenn, J.S.; East, N.; Audibert, F. (1996) A *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterub with muramyl dipeptide induces antibody titers, increases the time of onset, and decreases naturally occurring external abscesses in sheep and goats. **Small Ruminant Research** **19**, 161-168.
- 80.- Brogden, Kim A.; Audibert, Francoise (1994) Development of vaccines containing muramyl dipeptide for the prevention of caseous lymphadenitis and pneumonic pasteurellosis in sheep. **National Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, IA and VACSYN S.A., "Les Chevrons" 33, boulevard du General Martial Valin, 75015 Paris, France.**
- 81.- Uysal, A.; Ak, S.; Bese, M. (1993) Studies on the immunity induced against caseous lymphadenitis in sheep by BCG vaccine. **Pen. Vet. Mikrobiyoloji-Dergisi.** **1**, 95-106.

- 82.- Eggleton, D.G.; Doidge, C.V.; Middleton, H.D.; Minty, D.W. (1991) Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. **Australian Veterinary Journal, Vol. 68, 10, 320-321.**
- 83.- Anderson, V. M.; Nair, M. E. (1984) Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In "Les maladies de la chevre". Les Colloques de l'Institute National de la Recherche Agro-nomique, Paris No. 28 605-609.
- 84.- Anderson, V.M.; Nair, M. E. (1984) Role of maternal immunity in the prevention of caseous lymphadenitis in kids. In "Les ma ladies de la chevre". Les Colloques de l'Institute National de la Recheche Agronomique. Paris No. 28. 601-604.
- 85.- Paton, M.W.; Mercy, A.R.; Sutherland, S.S.; Ellis, T.M.; Duda,S.R. (1991) The effect of antibody to caseous lymphadenitis in ewes on the efficacy of vaccination in lambs. **Australian Veterinary Journal Vol. 68,4.**
- 86.- McNamara, P.J.; Bradley, G.A.; Songer, J.G. (1994) Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology 12 (6), 921-930.**
- 87.- Tachedjian, M.; Krywult, J.; Moore, R.J.; Hodgson, A.L.M. (1995) Caseous lumphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. **Vaccine Vol. 13, 18 . 1785-1792.**
- 88.- Wilson, M. J.; Brandon, M. R.; Walker, J. (1995) Molecular and Bochemical Characterization of a Protective 40-Kilodalton Antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity, 206-211.**
- 89.- Walker, J.; Jackson, H.J.; Eggleton, D.G.; Mccusen, E.N.T.; Wilson, M.J.; Brandon, M.R. (1994) Identification of a Novel Antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* That Protects Sheep against Caseous Lymphadenitis. **Infection and Immunity, 2562-2567.**

- 90.- Dercksen, D.P.; Laak, E.A. ter; Schreuder, B.E.C. (1996) Eradication programme for caseous lymphadenitis in goats in the Netherlands. **Veterinary Record 138(10): 237.**
91. - Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias. (1997). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. **145.**
92. - Jawetz, E., 1998. Microbiología Médica. **Ed. Manual Moderno. 617.**
93. - Frobisher, M., (1964). Microbiología Médica. **Ed. Salvat. 3ª edición. 225-241.**
94. - Gallardo, R.R., (1993). Mantenimiento y Preservación de Cepas Microbianas. Secretaría de Salud. **30.**
95. - De la Cruz, G.R., (1982). Conservación de Microorganismos. **Infectología, Vol. 8. 519-522.**
96. - Barksdale, L.; Linder, R.; Sulea, I.T.; Pollice, M. (1981) Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within genus *Corynebacterium*. **J. Clin. Microbiol. Vol. 13, 335-343.**
97. - Valdivia, A.G.; Martínez, R.A.; Muñoz, G.M., (1999). Curso Teórico-Práctico de Pruebas Inmunoquímicas. **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. 1-16.**
98. - Biorad., (1999). Instruction Manual Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell. **1-26.**
99. - Lacmml, W.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature. Vol. 227: 680-685.**
100. - Harlow, E.; Lane, D. (1988). Antibodies a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory. 670.**

101. - Morilla, G.A., (1986). Manual de Inmunología. Ed. Diana. 432.
102. - Pandher, K.; Murphy, L.G., (1996). Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. **Veterinary Microbiology. Vol. 51: 331-341.**
103. - Richard, Y.; Fontaine, M.; Oudar, J. y Fontaine, M.P (1979). Contribution a l'etude de l'epidemiologie et de la pathogenie de la maladie des abcès du mouton. **Comm. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 2:125-148**
104. - González, R.J.; Cano, G.L.J.; Tórtora, P.J. (1989). Prevalencia de lesiones sugestivas de linfadenitis caseosa en caprinos en dos sistemas de manejo productivo en Izucar de Matamoros, Pue. **VI Congreso Nacional Azteca. 38-40**
105. - Bruce, A.; et, al. (1994). Biología molecular de la célula. Editorial Omega, Tercera edición, 633-758.
106. - Domínguez, H. and N.D. Lindley. (1996). Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in *Corynebacterium glutamicum* to ensure phosphorylation of liberated fructose. **Appl. Environ. Microbiol. Vol. 62, No. 10: 3878-3880.**
107. - Cossart, P. and P. Boquet. (2000). Cellular Microbiology. Edit. ASM, E.E.U.U. 210.
108. - Funke, G.; Graevenitz, A von.; Clarridge, J.E. and Bernard, K.A. (1997). Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clinical Microbiology Reviews. Vol. 10, No. 1: 125-159.**