



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“PRODUCCIÓN DE ANTÍGENO DE *Corynebacterium
pseudotuberculosis* AISLADO DE MUESTRAS DE
ABSCESOS EN OVINOS”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:
ERÉNDIRA DE LA FUENTE MANCERA

ASESOR: MVZ. SUSANA ELVIRA GARCÍA VÁZQUEZ
COASESOR: DRA. VIRGINIA CITLALI HERNÁNDEZ VALLE



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.

ÍNDICE

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
III. Objetivos.....	15
IV. Material y Métodos.....	16
V. Resultados.....	24
VI. Discusión.....	31
VII. Conclusiones.....	34
VIII. Bibliografía.....	35

I. RESUMEN

La Linfadenitis Caseosa es responsable de importantes pérdidas económicas en la industria ovina y cuyo diagnóstico superficial se hace en base a la exploración y palpación minuciosa de los linfonodos superficiales, esto puede tener poco valor en la detección de lesiones tempranas y en los casos en los que se presenten lesiones viscerales sin antecedentes clínicos de infección periférica; detectándose casi siempre la enfermedad a nivel de rastro con la presencia de linfonodos voluminosos con exudado purulento y caseoso.

La cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se obtuvo a partir del aislamiento de muestras provenientes de ovinos de unidades productivas en Irapuato, Guanajuato las cuales tuvieron las siguientes características: a) sistema cero pastoreo es decir estabulado, b) razas de pelo o medio pelo, c) unidades dedicadas al abasto y pie de cría y d) clínicamente positivos a linfadenitis caseosa e inoculados en cajas de Agar Sangre, la identificación del género y especie se realizó por medio de pruebas bioquímicas de acuerdo a Chirino – Zárraga, 2006. El antígeno bacteriano (extracto bacteriano) fue obtenido mediante el cultivo de la cepa pura de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en medio agar y caldo de PPLO (Organismos Parecidos a Pleuropneumonía), a éste extracto se le determinó la cantidad de proteína por medio de la prueba de Bradford encontrándose en agar PPLO 847.59 miligramos por mililitro y en caldo PPLO 5814.34 miligramos por mililitro, la cual fue evaluada posteriormente por Western Blot para conocer sus partes antigénicas, dándonos un resultado varias bandas principalmente de 35 y 70 kD.

Este trabajo se realizó con el objeto de emplear en un estudio serológico la prueba de ELISA Indirecta, que utiliza un anti- IgG de ovino marcado con una enzima, para detectar anticuerpos en contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Se estudiaron 102 sueros de ovinos procedentes de Irapuato, Guanajuato. En el estudio serológico de los ovinos del extracto de agar PPLO el 48.07 % fueron encontrados positivos, el 42.15 % como negativos y el 9.8 % como sospechosos; mientras que en el extracto decaldo PPLO encontramos que el 44.11 % fueron positivos, el 41.17 % negativos y el 14.7 % resultaron sospechosos.

II. INTRODUCCIÓN

Linfadenitis Caseosa (LC)

Es una enfermedad contagiosa de curso crónico, producida por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que afecta fundamentalmente a ovejas y cabras, sin embargo se han reportado aislamientos en otras especies como caballos, bovinos, llamas y alpacas; además la infección se ha reportado en los humanos, siendo una infección zoonótica. Se caracteriza por la aparición de lesiones caseosas en linfonodos, en cabras principalmente en la cabeza (parotídeo, retrofaríngeos laterales y mandibular) y cuello (cervical superficial) y en el ovino puede ser en cualquier linfonodo superficial (parotídeo, retrofaríngeos laterales, mandibular, cervical superficial, isquiático, poplíteo e inguinal) y, ocasionalmente, en otras vísceras, puede manifestarse también mediante casos graves de toxemia y anemia con emaciación que incluso conduce a la muerte (Baid, 2007; Dorella, 2006; Fontaine 2008; Ruiz, 2007; León, 2002).

LC es una enfermedad de importancia económica, principalmente en los pequeños rumiantes, las pérdidas incluyen disminución en la producción de leche, desórdenes reproductivos, decomiso a las canales y depreciación de la piel. También se reporta en borregos pie de cría, lo que afecta negativamente el valor económico de estos animales o por la importancia en la diseminación de la enfermedad hacia rebaños donde ingresen estos animales como reproductores (Baird, 2007; Seyffert, 2010; Binns, 2007; Miranda, 2010). Está presente en los cinco continentes y casi en todas las zonas geográficas definidas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE). Siendo identificada en Europa, Australia, América, África y en Medio Oriente (Baird, 2007; Fontaine, 2008; Ruiz, 2007).

Etiología

El género *Corynebacterium* es miembro de la rama filogenética del orden Actinomycetales. En base a la composición de su pared y los lípidos, mantiene estrecha relación con los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, asociándose en el grupo CMNR (Dorella, 2006).

Corynebacterium pseudotuberculosis es una bacteria Gram positiva, con forma bacilar corta y delgada o pleomórfica (0.5 a 0.6 μm x 1.0 a 3.0 μm), se dispone aislada o agrupadas en parejas formando V, en empalizadas o letras chinas. Es intracelular facultativa, y en agar sangre presenta β hemólisis, puede crecer bajo condiciones aerobias o anaerobias. En medios sólidos, las colonias son secas y friables. Después de una incubación por 24 hrs, se observan pequeñas colonias blanco amarillentas, que crecen e incrementan su diámetro de 1 -2 mm después de 48 h. El desarrollo de la bacteria se beneficia al agregar suero o sangre al agar (Baird, 2007; Dorella, 2006).

Factores de Virulencia

Fosfolipasa D (PLD)

Es una potente exotoxina producida por la bacteria y capaz de hidrolizar la esfingomielina, responsable de la hemólisis en agar sangre y la acción patógena sobre las membranas de los fagocitos. La significancia como factor de virulencia, es la actividad de incrementar la permeabilidad en la membrana endotelial vascular y permitiendo la invasión de *Corynebacterium* en el drenaje linfático (Baird, 2007; Ruiz, 2007; Dorella, 2006).

Pared celular (ácidos micólicos)

Elemento quimiotáctico de atracción para los fagocitos, en especial para los neutrófilos. Efecto leucotóxico, que origina degeneración y lisis de macrófagos y polimorfonucleares. Además le da resistencia al medio ambiente, como en el exudado purulento; contribuye así a la formación de los abscesos e induce una resistencia a las enzimas líticas lisosomales (León, 2002; Baird, 2007; Binns 2007).

Patogenia

La infección crónica en pequeños rumiantes resulta en la formación de piogranulomas, presentándose en dos diferentes formas: a) la externa, conocida como cutánea o superficial, siendo característica la formación de abscesos en linfonodos superficiales o tejido subcutáneo (más común en caprinos), y b) la segunda forma es visceral, caracterizada por lesiones no observables externamente (más común en ovinos) (Baird 2007), es decir que afecta comúnmente los linfonodos internos (principalmente los mediastínicos), originándose frecuentemente metástasis a órganos parenquimatosos como: pulmón, hígado, riñón, glándula mamaria o testículos y menos frecuente corazón, cerebro, médula espinal, útero y articulaciones. (Fontaine 2008)

El criterio para diagnóstico confirmatorio de LC es el aislamiento e identificación de *C. pseudotuberculosis*, a partir del exudado de los abscesos. (Baird 2007)

Inmunidad

C. pseudotuberculosis es una bacteria intracelular, frente a la que se desarrolla una respuesta inmunitaria muy compleja, de carácter humoral y celular que no recae sobre un único antígeno, sino que es producto de la configuración antigénica de la pared bacteriana y de la Fosfolipasa D (Ruiz, 2007; Urquiza, 2007; Ellis, 1988).

El conocimiento referente a los mecanismos por lo que la LC se establece, se basan en estudios experimentales. Se ha podido demostrar que la infección en ovinos se asocia con el aumento transitorio de temperatura, inflamación localizada y formación de abscesos en el sitio de infección y es probable que la bacteria se replique extracelularmente en el sitio de infección antes de localizarse en linfonodos. (Pepin, 1991a; Pepin, 1994).

Estas bacterias Gram (+) son resistentes a los efectos líticos del complemento, probablemente como consecuencia de su gruesa capa de peptidoglicanos que previenen el acceso de C5b – 9 a la membrana interna. (Quinn, 2002; Playfair, 1992; Gershwin, 1995). El receptor del complemento tipo 3 (CR3) desempeña un papel importante en la

defensa del hospedador contra la infección primaria y secundaria causadas por *C. pseudotuberculosis* (Lan, 1998; Miranda, 2010).

El INF – g tipo II (interferón γ), es producido por linfocitos T cooperadores, después de la estimulación por un antígeno, activa a los macrófagos. El factor de necrosis tumoral (TNF) es producido por macrófagos después de ser estimulados por lipopolisacáridos bacterianos, provoca efectos como la activación de neutrófilos, estimulación de macrófagos, incremento de adhesión de leucocitos e incremento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). También puede causar la inducción de la fiebre, síntesis de proteínas de la fase aguda y activación del sistema de coagulación (Gershwin, 1995).

Los niveles de expresión génica para el TNF - α y el INF – γ son más elevados en el día 7 post-inoculación de tiempo corresponde a una fase de amplificación en la formación de piogranulomas, destacando macrófagos y linfocitos. También se puede reconocer la fase de iniciación caracterizada con la llegada de neutrófilos al sitio de inoculación y a linfonodos, así como la fase de estabilización se caracteriza por la maduración y persistencia del piogranuloma (Guilloteau, 1990; Pepin, 1991a; Pepin, 1992; Pepin, 1994). Estas citocinas son importantes para la resistencia del hospedador contra crecimiento de patógenos facultativos intracelulares. (Lan, 1998).

La respuesta de macrófagos tiende a ser inespecífica, de modo que una vez activados son capaces de destruir una amplia variedad de bacterias normalmente resistentes. El desarrollo de macrófagos activados es por la activación con INF – γ e interleucina 2 (IL – 2). Se ha observado que aquellos macrófagos no inmunizados, al ingerir muchas bacterias sufren una degeneración (primeras 6 h), mientras las células polimorfonucleares (PMN) (hasta las 20 h) en cambio los macrófagos inmunizados resistieron por el incremento de gránulos lisosomales (Ayers, 1977).

Otro aspecto de interés, es que la transferencia calostrala de anticuerpos protectores ha sido demostrada a nivel de campo y de laboratorio. El nivel de anticuerpos séricos disminuyen hasta los dos meses y medio, explicando el hecho que rara vez se infectan animales menores de tres meses (Burrell, 1980a; Hsu, 1985; Brown, 1986; Miranda, 2010).

La presencia de inmunoglobulina tipo A en el suero de animales con la LC, se explica por la destrucción tisular de la barrera sangre – linfa de los linfonodos afectados. Normalmente, los anticuerpos producidos contra *C. pseudotuberculosis* y su exotoxina son de tipo IgG e IgM (Husband, 1977).

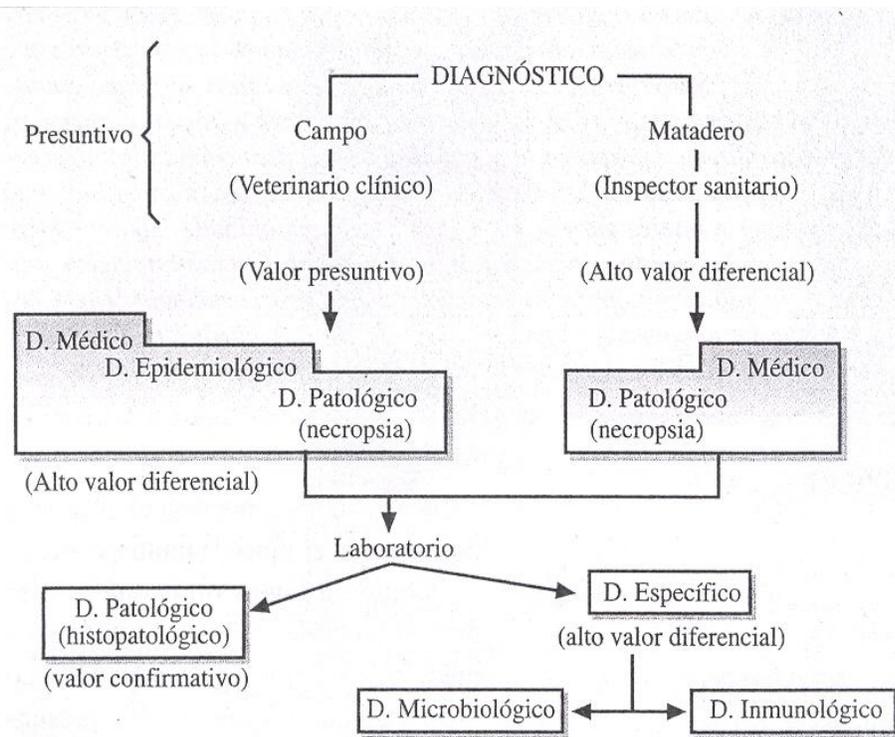
Una observación interesante es el hecho de que la respuesta inmune celular tiende a estar en relación inversa a la respuesta de anticuerpos. Este fenómeno, conocido como nicho ecológico se manifiesta con una respuesta celular baja y un nivel elevado de títulos serológicos de anticuerpos. Sabemos que los animales jóvenes normalmente presentan una concentración menor de proteínas totales que los adultos, y los animales afectados por LC presentan una concentración total mayor por un aumento significativo de la fracción gamma- globulínica (Hard, 1970; Husband, 1977; Desiderio, 1979; Renshaw, 1979; Gillespie, 1983).

Diagnóstico

Como en tantas otras enfermedades infecciosas, el diagnóstico clínico proporciona una concepción presuntiva de LC. Por lo que se hace preciso en todos los casos el diagnóstico confirmatorio con los resultados de laboratorio (bacteriología e inmunología) (Ayers, 1977; Baird, 2007; Fontaine, 2008; Ruiz, 2008).

La linfadenitis caseosa presenta dos formas clínicas (cutánea y visceral), donde la cutánea puede ser fácilmente diagnosticada al realizar el aislamiento de *C. pseudotuberculosis*, al extraer el contenido de abscesos. Siendo de mayor dificultad diagnosticar aquellos animales que tienen la forma visceral, que son diagnosticados hasta la revisión de la canal (Baird, 2007; Fontaine, 2008; Ruiz, 2008).

Figura 1.- Esquema de las fases diagnósticas de la linfadenitis caseosa (Ayers, 1977).



Diagnóstico clínico

La LC se asocia a tres síndromes: linfadenitis piógena, respiratorio posterior y caquetizante. Para el síndrome abscedativo subcutáneo se consideran LC (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), piobacilosis (*Arcanobacterium pyogenes*) y enfermedad de los abscesos (*Staphylococcus aureus* subesp. *anaerobicus*). Por el síndrome respiratorio posterior, en especial el síndrome de caquexia, es necesario diferenciar tuberculosis y LC, se debe realizar el diagnóstico anatomopatológico pero no es concluyente (Baird, 2007; Fontaine, 2008; Ruiz, 2008).

Para el diagnóstico morfológico la lesión representada por una laminación concéntrica de la necrosis caseificante “lesión de cebolla”, debe considerarse altamente presuntiva de LC. Abscedación con exudado purulento cremoso de tonalidad verdosa amarillenta. (León, 2002).

Tabla 1.- Relación de los abscesos con el cuadro clínico (Baird, 2007; Fontaine, 2008; Ruiz, 2008; León, 2002).

LC superficial	LC visceral
<ul style="list-style-type: none"> • Lesión focalizada en un nódulo. • Reacción necrótica hacia la fluidificación del exudado purulento, al crónico con caseificación laminar concéntrica. • En la cabra la reacción caseosa aparece dominada por el componente exudativo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Necropsia o hallazgo en el rastro por síndrome respiratorio posterior y oveja o cabra seca. • Lesión focal de necrosis caseosa con laminación concéntrica y encapsulamiento fibroso. Ocurre confusión con tuberculosis, en ovinos escasamente prevalente pero frecuente en caprinos.

Algunos de los parámetros epidémicos en la evolución temporal de un foco de LC, incluyen:

- Lapso desde la primoinfección hasta la aparición de los primeros casos de hasta 4 – 6 meses.
- Período de incremento de la prevalencia de tres a cinco años.
- Los brotes se dan después de la esquila, intervenciones quirúrgicas colectivas o posterior a la incorporación de nuevos animales.
- La edad de los enfermos son principalmente adultos.

(Baird, 2007; Fontaine, 2008; Ruiz, 2008)

Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico específico de LC viene definido por el aislamiento e identificación del agente causal. En los focos de infección, el exudado presenta gran abundancia de corinebacterias, en lesiones más avanzadas es posible que el agente causal esté ausente, dominando la reacción exudativa piógena sobre la proliferativa celular. (Baird, 2007; León, 2002; Miranda, 2010)

Como medio de aislamiento puede emplearse el agar sangre, donde existirán colonias móviles, presentan una tenue protuberancia (botonadas) y son opacas, con un borde liso, rodeadas de un halo de beta hemólisis. También se pueden emplear medios selectivos

como: Corinebacterium selective agar (Merck), Muller tellurite agar (Difco) y agar chocolate – telurito, son medios enriquecidos con suero bovino o equino sangre, suplementados con telurito de potasio, en los que las colonias aparecen de color negro (Ruiz, 2008; Dorella, 2006; Baird, 2007).

El sistema integrado de identificación microbiológica API, API Coryne (Atom) se muestra eficaz en la identificación y diferenciación (Dorella, 2006).

La reacción de CAMP es otra prueba en la cual se observa un sinergismo entre la hemolisina (factor equi) de *Rhodococcus equi* y *C. pseudotuberculosis*. En contraste existe la inhibición de hemólisis (inhibición de CAMP) en donde la PLD de *C. pseudotuberculosis* y la β hemolisina de *Staphylococcus aureus*. (Baird, 2007; Dorella, 2006)

Diagnóstico inmunológico

El diagnóstico definitivo queda establecido al demostrar la presencia del agente causal. Siendo la obtención de material purulento factible en aquellos casos donde sean accesibles los abscesos o en dado caso hasta la necropsia, dejando sin diagnóstico aquellos animales que no presenten signos clínicos por ser portadores de lesiones internas o bien en periodo de incubación. Al ser una bacteria intracelular facultativa da una respuesta inmunitaria tanto humoral como celular y por la liberación de una exotoxina inmunógena (Miranda, 2010; Dorella, 2006).

Prueba cutánea

Método empleado para verificar infecciones causadas por microorganismos intracelulares y estado inmunológico mediado por células. (Hard, 1975). Donde se induce la formación de una población de células mononucleares especializadas en fagocitar y destruir microorganismos (Mackanness, 1970). El primero en intentarlo fue Cesari (1930), que inoculó y cultivó un filtrado de la corinebacteria en cobayos, proponiendo su uso para el diagnóstico de la enfermedad en carneros. Carne (1932), realizó la prueba con toxina teniendo reacciones irregulares y concluyendo no ser adecuada para el diagnóstico de LC. Alves en 1999 concluye, que es fundamental la purificación del antígeno para la prueba intradérmica de LC y el uso de un antígeno

especifico puede favorecer el diagnóstico a nivel del campo, y así poder detectar la enfermedad subclínica en rebaños.

Prueba de aglutinación

Está basada en las aglutininas que aparecen pronto tras la infección. Cameron (1940) empleó la prueba, con resultados poco alentadores. Más adelante Award (1960), empleando una cepa de corinebacteria, con menor grado de aglutinación alcanzó buenos resultados.

Fijación de complemento (CF)

Igual que la aglutinación, los animales infectados seroconvierten con precocidad, por lo que no es recomendable para el diagnóstico de LC crónica. Siendo una prueba con la facilidad de detectar anticuerpos rápidamente después de una semana post infección. (Miranda 2010).

Inhibición de la β hemolisina (I.B.H.)

Se incubaba el suero problema con PLD, eritrocitos de bovino y la hemolisina del estafilococo. Los anticuerpos específicos de la toxina de la corinebacteria presentes en el suero neutralizan la exotoxina, la hemolisina del estafilococo en ausencia lisan los eritrocitos (Zaki, 1968).

Inhibición de la hemólisis para la detección de anticuerpos contra la exotoxina de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Consiste en la inhibición de la actividad hemolítica de la exotoxina, por el suero inmune de ovinos, pudiendo detectar animales afectados subclínicamente y antitoxina en el suero de corderos amamantados por hembras que presenten títulos positivos al momento de realizar la prueba (Burrell, 1980a)

Prueba de inhibición de la hemólisis sinérgica (I.H.S.)

Detecta anticuerpos formados contra la exotoxina de *C. pseudotuberculosis*, originalmente inventada para caballos, utilizando la PLD en eritrocitos tratados previamente con un filtrado estéril de la fosfolipasa C producida por *Rhodococcus equi*. Mostrando ser un indicador confiable de la infección activa, y que además podía ser útil

para emplearse en los esquemas de control de la enfermedad en caprinos (Brown, 1986a).

Prueba de hemoaglutinación indirecta (IHA), aglutinación en tubo (TA)

Se basa esta técnica en la propiedad que muestran los eritrocitos de cordero sensibilizados con formol y bis – dia-zobencidina de aglutinar en presencia de anticuerpos de la corinebacteria. Pudiendo diagnosticar infecciones precoces como también las crónicas. (Ruiz 2002)

Técnica de inmunodifusión doble

Se realiza en gel agarosa, donde se hacen pozos, uno central (antígeno) y seis alrededor del central (sueros). Como antígeno utilizado la exotoxina (sobrenadante no concentrado) y el suero problema como reactivos. Dando como positivo aquellos sueros donde se produzca una línea de precipitación. Probando ser un método económico y práctico, pudiendo tener resultados a las 24 h (Urquiza, 2007; Burrell, 1980b).

Inmunoensayos (ELISA)

Basados en los principios de interacción anticuerpo- anticuerpo en placas de plástico. El principio básico del método indirecto de la prueba de ELISA es un antígeno en la placa, dilución del suero, un anti- anticuerpo y un sustrato, obteniendo una coloración la cual es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo (Baird, 2007).

Se han utilizado como antígenos de fase sólida (Kaba, 2001) como: la pared celular (Shen, 1982), células íntegras o sonificadas (Maki, 1985). También se ha utilizado el antígeno fase líquida como la toxina (Chikamatsu, 1989; Ter Laak, 1992).

Las pruebas de ELISA realizadas, se han utilizado para caprinos y ovinos, teniendo resultados prometedores y recomendadas como una buena alternativa del diagnóstico de la infección. En varias ocasiones, hasta se ha podido emplear para obtener una prevalencia y hasta poder erradicar la LC de rebaños (Ruiz, 2008; Ter Laak, 1992; Schreuder, 1994; Binns, 2007; Dorella, 2006).

Resonancia de plasmones superficiales (SPR)

Los plasmones superficiales interactúan con la luz, produciendo un color. Utilizando esto para la detección de anticuerpos contra diferentes bacterias. Para *C. pseudotuberculosis* es para detectar anticuerpos específicos contra la fosfolipasa D (Stapleton, 2009; Miranda 2010).

Detección de respuesta de interferón gamma (IFN – γ)

Ensayo basado en la detección de respuesta a antígenos celulares completos. Teniendo pruebas tanto para ovinos y caprinos. Observando, que la inmunización por la vacuna no interfiere, sugiriendo que la prueba tiene valor para detectar la infección y ser utilizada en los programas de control de la LC (Prescott, 2002; Menzies, 2004).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Permite la amplificación directa de segmentos de ADN específicos sin necesidad de clonación. Se ha utilizado la amplificación de un fragmento con 815 pares de bases, desarrollando un gen (16S rRNA). (Çetinkaya 2002; Baird 2007) También se ha empleado una prueba de PCR múltiple (mPCR) empleando tres genes (16S rRNA, *rpoB*, y *pld*) (Pacheco, 2007; Baird, 2007).

Tratamiento

El tratamiento con antibiótico parenteral no es efectivo por la fibrosis presentada en los abscesos, la presencia del exudado purulento y la naturaleza intracelular de la bacteria. Por lo que, el tratamiento se realiza localmente (cuando se trata de la LC de tipo superficial) y se puede hacer por medio de la debridación del absceso retirando el contenido purulento, o realizando una disección de toda la lesión y se retira quirúrgicamente (Baird, 2007; O'Reilly, 2010; Fontaine, 2008).

Prevención

Para evitar la exposición del rebaño a la infección, los animales que se vayan a introducir, se deberán mantener aislados y puestos en observación, es decir hacer una identificación de animales afectados. En caso de ser ovinos de lana, curar las lesiones causadas por la esquila y dar una limpieza y desinfección al instrumento, cada vez que se utilice. A su vez, mejorar la higiene de los corrales y en caso de pastoreo, realizar una rotación periódica (Baird, 2007; Fontaine, 2008; Dorella 2006; Miranda, 2010).

Control

El control se vuelve vital dentro del rebaño, ya que el exudado purulento cuenta con un concentración de 1×10^6 a 5×10^7 unidades formadoras de colonias por gramo (c.f.u./g), la ruptura del absceso es suficiente para la contaminación del ambiente. La capacidad de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir en la tierra y en los fómites; asegura la continua presencia del mismo (Ruiz, 2008; Fontaine, 2008).

Lo primero que se recomendaría, sería la medicación con antibacterianos, pero ésta es ineficaz, debido a que no pueden difundirse por el absceso entre el material purulento y otro factor a considerar es que la corinebacteria es intracelular. Debido a esto, se deben de llevar acabo otras estrategias, como las que a continuación se mencionan (Baird, 2007; Fontaine, 2008; Dorella 2006; O'Reilly, 2010)

La mayor recomendación es la debridación del absceso retirando el contenido purulento, o realizando una disección de toda la lesión y se retira quirúrgicamente (Baird, 2007; O'Reilly, 2010).

Separar a las crías de sus madres después del parto y alimentarlas con calostro y leche sustituta. Manejar a las crías en un rebaño independiente, con la finalidad de disponer de animales de reposición seronegativos. (Cubero, 2002)

En varios países la principal forma de control es la vacunación, como es el caso de Australia donde han disminuido hasta un 20% la prevalencia. En algunos de estos países tiene acceso a vacunas comerciales como sería Glanvac – 6, la cual contiene la corinbacteria y diferentes clostridios. También se utilizan suspensiones de la bacteria inactivada por formalina. Aunque su utilización no elimina la enfermedad dentro del rebaño y se puede tener portadores asintomático, además en México no se cuenta con alguna vacuna comercial (Fontaine, 2008; Ruiz, 2008; Cubero, 2002).

El programa de saneamiento sería: detectar los animales infectados, eliminar todo animal positivo al diagnóstico con o sin signos, vacunación de aquellos en riesgo y medidas generales de higiene (Ruiz, 2008; Cubero, 2002; Dorella, 2006; Gaabary, 2010).

Existen variantes para el control de LC dependiendo del rebaño, es por esto que se han diseñado modelos matemáticos para poder observar el impacto de cada estrategia en el rebaño. Siendo el diagnóstico serológico una fuerte arma para combatir esta enfermedad (Fontaine, 2008; O'Reilly, 2010).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Producir un antígeno de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aisladas a partir de muestras de abscesos superficiales en ovinos.

Objetivos particulares

- A partir de casos clínicos obtener muestras de contenido de abscesos superficiales en ovinos.
- Aislar e identificar cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- Obtener suero de los ovinos muestreados.
- Producción de antígeno de la corinebacteria.
- Comprobar la funcionalidad (eficacia y confiabilidad) del antígeno producido, empleando la prueba de ELISA.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Biológico:

- Ovinos de unidades productivas en Irapuato, Gto. las cuales tuvieron las siguientes características: a) sistema cero pastoreo es decir estabulado, b) razas de pelo o medio pelo, c) unidades dedicadas al abasto y pie de cría y d) clínicamente positivos a linfadenitis caseosa.
- Cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (obtenida a partir de muestras clínicas de ovinos).
- Suero de ovinos de las unidades productivas en Irapuato, Gto.

Reactivos:

A) Aislamiento:

Agar Sangre.

Medio PPLO sólido y en caldo.

B) Caracterización Bioquímica:

Oxidación - Fermentación (O-F)

Caldo Urea

Rojo de Metilo-Voges Proskaver (MR- VP)

Nitratos

Sulfhídrico-Indol-Motilidad (SIM)

C) Azúcares con base de agua peptonada:

Glucosa

Maltosa

Trehalosa

Xilosa

Manitol

D) Tren de tinción de Gram:

Cristal Violeta

Lugol
Acetona
Safranina

Equipo:

Cajas de Petri de 10 ml, estériles
Tubos de ensaye de 5 y 10 ml, estériles
Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml, estériles
Viales estériles
Mecheros Bunsen
Estufa bacteriológica
Agitador
Centrífuga
Microscopio compuesto
Autoclave
Espectrofotómetro
Jeringas de 10 ml
Espátula
Asa bacteriológica
Placas de poliestireno
Micropipetas
Micropipeta multicanal
Puntas para micropipeta

MÉTODOS

Recolección de muestras

A partir de cuatro unidades productivas de ovinos en Irapuato, Guanajuato, se inspeccionaron y diagnosticaron clínicamente con LC según Baird, 2007. Obteniendo un total de 73 muestras de la debridación (con bisturí se realizó un corte en el absceso, el exudado se colocó en una bolsa cerrándola herméticamente, se lavó con yodo y se le puso sulfato de zinc) o punción del absceso superficial (se limpió el absceso con alcohol y con una jeringa se puncionó el absceso) (Chirino – Zárraga, 2006). A estos mismos animales se les tomó 10 ml de sangre, por venopunción de la yugular (se limpió con alcohol la canaladura de la yugular, se puso torniquete, se puncionó con jeringa la

yugular) y se recolecto en tubos vacutainer sin anticoagulante, en total 97 de los cuales 73 son animales con abscesos y 24 sospechosos a LC. Separando el suero y poniéndolo en viales. Tanto el exudado purulento (diagnostico y producción del antígeno) y el suero (ELISA) se identificaron con números consecutivos, se metieron a una hielera en refrigeración para su transportación y en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se congelaron hasta su uso.

Cuadro 1.- Información de las unidades productivas.

Unidad Productiva	Total de animales	% y # de hembras	% y # de corderos	# hembras sin cordero	% y # de machos	# hembras / macho
1	741	68%	30.2%	280	1.8%	38.76
		504	224	504 - 224	13	
2	324	65%	33%	104	2%	35.16
		211	107	211 - 107	6	
3	258	70.5%	28%	110	1.5%	45.5
		182	72	182 - 72	4	
4	224	73%	25.5%	107	1.5%	54.6
		164	57	164 - 57	3	

Aislamiento

Las muestras se inocularon en agar sangre y agar PPLO por la técnica Americana y se incubaron a 37° C por 48 hrs (Chirino – Zárraga, 2006).

Identificación

Aquellas colonias características de *C. pseudotuberculosis* se les realizó tinción de Gram, al observar al microscopio bacterias Gram (+), puras, con morfología

característica y agrupadas en letras chinas, se procedió a la realización de pruebas primarias y secundarias (Chirino – Zárraga, 2006).

Elaboración de antígeno

Se realizaron dos métodos para la obtención de antígeno (extracto de bacteria), utilizando una cepa purificada e identificada de *C. pseudotuberculosis* de acuerdo a Kaba et al, 2001 con algunas modificaciones.

A) Extracto de bacteria en caldo PPLO.

1. Se cultivo en Agar sangre la cepa a 37° C por 48 h.
2. De 3 a 5 colonias se sembraron en 250 ml de caldo PPLO + 0.1% Tween 20 a 37° C por 72 h.
3. Se transfirió el caldo obtenido a 250 ml de caldo PPLO + 0.1% Tween 20 incubando a 37° C por 48 h.
4. Se centrifugó a 6000rpm / 15 min / 4° C y el pellet se resuspendió en PBS (phosphate buffer saline).
5. Se lavó 3 veces centrifugando a 10000 rpm / 10 min / 4°C. siendo el pellet resuspendido en cada lavado.
6. El pellet se resuspendió en 1ml de buffer de preparación de antígeno.
7. Se hirvió a 100 -110° C / 5 min.
8. Se centrifugo a 10000 rpm / 10 min
9. Se obtuvo el sobrenadante y se congeló a -20° C, hasta su uso.

B) Extracto de bacteria en medio PPLO.

1. Se cultivo en Agar sangre la cepa a 37° C por 48 h.
2. Se sembró en 20 cajas de agar PPLO utilizando una técnica de estría cerrada incubando a 37° C por 48 h.
3. Se cosecharon las colonias y fueron resuspendidas en PBS (phosphate buffer saline).
4. Se lavó 3 veces centrifugando a 10000 rpm / 10 min / 4°C. siendo el pellet resuspendido en cada lavado.
5. El pellet se resuspendió en 1ml de buffer de preparación de antígeno.
6. Se hirvió a 100 -110° C / 5 min.
7. Se centrifugó a 10000 rpm / 10 min

- Se obtuvo el sobrenadante y se congeló a -20°C , hasta su uso.

Determinación de proteínas

Se realizó la técnica de Bradford en microplaca y leída en espectrofotómetro.

- En siete viales se colocó PBS y/o albúmina serica bovina (BSA).

1	2	3	4	5	6	7
PBS 1000 μl	PBS 990 μl BSA 10 μl	PBS 980 μl BSA 20 μl	PBS 960 μl BSA 40 μl	PBS 940 μl BSA 60 μl	PBS 920 μl BSA 80 μl	PBS 900 μl BSA 100 μl

- En otros tres viales se colocó la muestra de antígeno pura, una dilución 1/10 y otra dilución de 1/100.
- En una placa plana se hizo una curva por triplicado de los siete viales (PBS/BSA) y por duplicado los otros tres viales (antígeno y diluciones de antígeno), poniendo 50 μl de cada uno de los viales en los pozos.
- A cada pozo se le agregaron 200 μl del reactivo de Bradford.
- Se realizó la lectura en espectrofotómetro con un filtro de 620nm.

Western Blot (Kaba 2001)

- Preparación de la muestra
 - En tubos eppendorf se colocaron 10 μl de buffer muestra.
 - Se agregaron 20 μl del extracto bacteriano a los tubos.
 - La preparación se hirvió a 69°C por 10 min.
- Electroforesis (Gel SDS – PAGE)
 - Se prepara el gel resolving, sirviéndose más isopropanol 80% esperando hasta que polimerizara.
 - Se preparó el gel starcking sirviéndose en las placas, inmediatamente se pusieron los peines. Esperando a que polimerizara.
 - Las placas se colocaron en el tanque, el cual se llenó con buffer tank 1X y se quitaron los peines.

4. En los canales se pusieron las muestras (10 μ l) y el marcador de peso molecular (5 μ l).
 5. Se corrió a 180 V / 35 min.
- Electrotransferencia
 1. Del polo negativo al positivo se colocó una esponja, papel filtro, gel, membrana activada, papel filtro, esponja, papel filtro, gel, membrana activada, papel filtro y esponja. Y se lleno de buffer transfer.
 2. Se montaron los electrodos en la caja y se lleno con agua y hielo.
 3. Se corrió a 30 V / 75 min / 400 Amp.
 4. Al término, la membrana se colocó en leche al 3%. Se refrigeró toda la noche.
 5. La membrana se pasó a una bolsa + el antígeno primario, sellándola y metió a la estufa bacteriológica 37° C / 2 h
 6. Se pasó la membrana en tres lavados con Tris NaCl pH 7.4.
 7. Se colocó en otra bolsa la membrana + antígeno secundario, en la estufa bacteriológica a 37° C / 1 h.
 8. Se sacó la membrana y se le dio 3 lavados con Tris NaCl pH 7.4
 9. La membrana se mete en buffer de revelado en un cuarto oscuro hasta que aparezcan las líneas de reacción.
 10. La reacción se detuvo lavando con agua. Revisando las líneas con el marcador de peso molecular.

Sueros control

El suero control positivo fue obtenido de un ovino con diagnostico bacteriológico positivo a LC y el negativo, de un ovino sin diagnostico clínico ni bacteriológico positivo a esta enfermedad, los cuales se pasaron a viales y congelados hasta su uso.

ELISA

Se realizó, de acuerdo a Kaba et all 2001 con modificaciones. Primero se realizaron pruebas de estandarización (ver en que dilución de antígeno y de suero para establecer la concentración adecuada).

a) Fijación del antígeno en la placa

1. Con diluciones dobles seriadas se agregó el antígeno, las diluciones se hicieron con buffer carbonato.

A	1:1
B	1:2
C	1:4
D	1:8
E	1:16
F	1:32
G	1:64
H	1:128

2. Se cubrió con papel aluminio y se colocó en agitación durante 5min.
3. Las placas se refrigeraron a 4° C durante toda la noche.
4. Se descartó el líquido de la placa y se realizaron 4 lavados con PBS – Tween (PBS-T).
5. Se agregó 100 µl / pozo de solución de albúmina al 1% preparada al momento.
6. Se cubrió nuevamente con papel aluminio y se metió a la estufa bacteriológica a 37° C / 1 h.
7. Se descartó el líquido de la placa y se realizaron 4 lavados con PBS-T.
8. Secadas bien las placas se taparon y se metieron al congelador.

b) Corrimiento de ELISA

1. Con diluciones dobles seriadas se agregó el suero control (la dilución fue con buffer de citratos). Dividiendo la placa por la mitad.

1	2	3	4	5	6
1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800

2. Se cubrieron las placas, dejando incubar por 30 min a temperatura ambiente y en agitación.
3. Se descartó el líquido de la placa y se realizaron 4 lavados con PBS-T.
4. Se agregaron 100 µl / pozo del conjugado específico (anti IgG ovino) siendo 10 ml de PBS y 2.5 µl de anticuerpo.
5. Se cubrieron las placas y se dejó incubando 30min, a temperatura ambiente y en agitación.
6. Se descartó el líquido de la placa y se realizaron 4 lavados con PBS-T.
7. Se depositaron 100 µl / pozo de ABTS (2,2'-azino-di {3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid}).
8. Se cubrió la placa y se dejó incubando 30min a temperatura ambiente y en agitación.
9. La placa se leyó en el espectrofotómetro de 8 canales usando un filtro de 405nm.

Los resultados generados por ELISA se convertirán en unidades de actividad de anticuerpos.

El número de unidades de actividad de anticuerpos por cada suero será determinado por la fórmula:

$$\frac{A2 \quad (\text{suero de prueba a } 450 \text{ nm})}{A1 \quad (\text{absorbancia de } 450 \text{ nm del control positivo})} \times 100$$

El suero que dé menor o igual a 110 % será considerado como negativo.

El suero que dé entre 110 % y 120 % se considerará sospechoso.

El suero que dé mayor o igual a 120 % será considerado positivo

Al tener en que diluciones tanto del antígeno como del suero se obtenía buena diferenciación entre el control positivo y el negativo, se procedió a la fijación del antígeno a la placa (según dilución) en toda la placa y se corrió (según dilución). Siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado.

V. RESULTADOS

Recolección de muestras

Se recolectaron 73 muestras de las cuatro unidades productivas, se diagnosticaron clínicamente positivos a LC. Se obtuvieron 102 sueros problema de las cuatro unidades.

Cuadro 2.- Casos clínicos en las unidades productivas

Unidad Productiva	# Animales totales	# Casos clínicos	Morbilidad
1	741	36	4.85%
2	324	18	5.55%
3	258	9	3.48%
4	224	10	4.46%

Aislamientos e Identificación

Se lograron aislar y purificar 13 cepas, las cuales pasaron a caracterización bioquímica, dando como resultado: *C. pseudotuberculosis* De éstas se utilizó 1 cepa identificada como C-11. Ver cuadro 3

Cuadro 3.- Pruebas realizadas para la identificación.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción de Gram	Bacilos, Gram (+), formación en letras chinas
Agar sangre	β hemolisis
SIM	(-)
MR	(+)
VP	(-)
O/F	F(+)
Urea	(+)
Nitrato	(-)
Xilosa	(-)
Dulcitol	(-)
Maltosa	(+)
Glucosa	(-)
Trehalosa	(-)

Determinación de proteína

Se realizó la técnica de Bradford para la determinación de proteína, los resultados fueron:

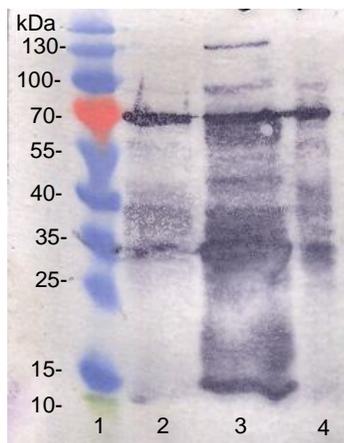
	Microgramos por mililitro (mg/ml)
Extracto bacteriano en caldo PPLO	847.59
Extracto bacteriano en agar PPLO	5814.35

Western Blot

Se utilizó el suero control (+) EA y el suero control (-) 2. Los extractos bacterianos (cepa C-11) tanto en caldo como en agar PPLO y también se realizó con la cepa de referencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ATCC 439224.

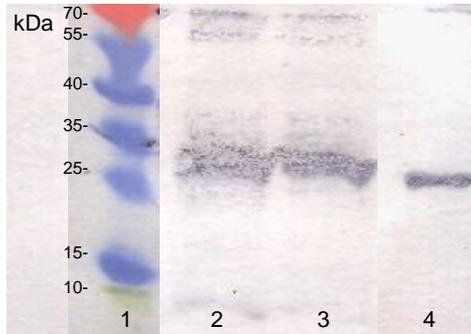
Observándose varias bandas, principalmente 70 y 35 kD.

WESTER BLOT SDS-PAGE



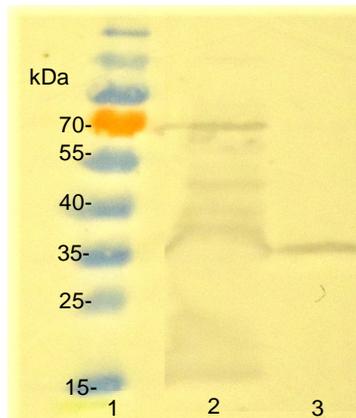
1. Marcador de peso molecular.
2. ATCC (extracto agar PPLO)
3. C11 (extracto agar PPLO)
4. ATCC (extracto agar PPLO)

WESTER BLOT SDS-PAGE



1. Marcador de peso molecular.
2. ATCC (extracto agar PPLO)
3. C11 (extracto agar PPLO)
4. ATCC (caldo PPLO)

WESTER BLOT SDS-PAGE



1. Marcador de peso molecular.
2. C11 (extracto agar PPLO).
3. C11 (extracto caldo PPLO).

ELISA

En la prueba de estandarización de dilución de antígeno y suero, se obtuvo que en la dilución de antígeno 1:64 y en la dilución de suero 1:25 se logra tener diferenciación entre positivos y negativos.

Antígeno Extracto de Bacteria (caldo PPLO)

Promedio suero 12A (+)

	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
1	0.453	0.481	0.317	0.282	0.222	0.120
1/2	0.654	0.490	0.367	0.439	0.324	0.329
1/4	0.735	0.499	0.381	0.426	0.271	0.254
1/8	0.669	0.398	0.355	0.308	0.244	0.215
1/16	0.620	0.440	0.297	0.270	0.220	0.209
1/32	0.322	0.430	0.342	0.300	0.227	0.210
1/64	0.520	0.397	0.311	0.269	0.199	0.198
1/128	0.550	0.346	0.240	0.235	0.217	0.213

Promedio suero 2 (-)

	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
1	0.346	0.336	0.313	0.309	0.224	0.235
1/2	0.229	0.247	0.225	0.182	0.175	0.137
1/4	0.156	0.190	0.171	0.147	0.135	0.132
1/8	0.236	0.236	0.199	0.184	0.163	0.122
1/16	0.224	0.203	0.210	0.177	0.147	0.123
1/32	0.224	0.168	0.184	0.144	0.140	0.100
1/64	0.172	0.158	0.129	0.135	0.123	0.095
1/128	0.359	0.217	0.191	0.168	0.159	0.091

Antígeno Extracto de Bacteria (agar PPLO)

Promedio suero 12A (+)

	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
1	0.598	0.325	0.274	0.188	0.177	0.190
1/2	0.585	0.397	0.346	0.330	0.331	0.209
1/4	0.747	0.359	0.366	0.386	0.218	0.175
1/8	0.628	0.418	0.328	0.299	0.348	0.210
1/16	0.559	0.522	0.342	0.263	0.317	0.212
1/32	0.630	0.394	0.303	0.360	0.306	0.201
1/64	0.786	0.352	0.285	0.218	0.202	0.173
1/128	0.649	0.470	0.414	0.275	0.323	0.201

Promedio suero 2 (-)

	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
1	0.224	0.218	0.228	0.167	0.171	0.176
1/2	0.247	0.222	0.202	0.262	0.204	0.162
1/4	0.289	0.209	0.260	0.270	0.185	0.150
1/8	0.214	0.189	0.178	0.166	0.158	0.153
1/16	0.207	0.210	0.207	0.167	0.158	0.146
1/32	0.218	0.185	0.180	0.157	0.180	0.130
1/64	0.228	0.194	0.207	0.151	0.137	0.129
1/128	0.230	0.179	0.232	0.148	0.086	0.129

En la prueba de ELISA de los sueros problema se obtuvieron los siguientes resultados:

Suero	PPLO Agar	PPLO Caldo
1	-	+
2	+	+
3	-	-
4	+	+
5	-	-
6	+	S
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	S	-
13	+	S
14	S	-
15	-	S
16	+	-
17	+	+
18	+	+
19	-	+
20	+	+
21	+	-
22	+	+
23	-	-
24	+	+
25	-	+
26	+	+
27	-	+
28	+	+
29	-	-
30	-	-
31	S	+
32	+	+
33	-	+
34	-	-
35	-	-
36	-	-
37	+	+
38	+	+
39	-	-
40	S	-
42	+	-
43	S	+
44	S	+
45	+	-
46	-	S
47	-	+
48	+	+
49	-	-
50	+	S

51	+	-
52	-	-
53	+	-
54	-	+
55	-	S
56	-	-
57	S	-
58	-	-
59	+	S
60	-	-
61	-	-
62	-	+
63	+	+
64	+	S
65	+	S
66	+	+
67	-	-
68	+	S
69	S	+
70	-	-
71	-	-
72	-	-
73	-	-
74	+	-
75	-	-
76	+	+
78	+	+
79	+	S
81	S	-
82	+	S
83	+	+
84	S	+
85	+	+
86	+	+
86	+	+
87	-	+
88	+	S
90	-	+
91	+	+
92	+	S
93	-	+
94	+	+
95	-	+
(-1)	-	-
24A	+	-
27A	-	-
32A	+	-
33A	-	+
36A	+	-
CLAVE	+	S

Por lo tanto podemos decir que:

	+	-	S
PPLO AGAR	48.03% (n= 102)	42.15% (n=102)	9.8% (n=102)
PPLO CALDO	44.11% (n=102)	41.17% (n=102)	14.7% (n=102)

(+) = positivos

(-) = negativos

(S) = sospechosos

VI. DISCUSIÓN

El aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no presenta mucha dificultad cuando se utiliza agar sangre, las colonias fueron características (pequeñas, redondeadas, blanco cremoso y fácil desplazamiento y fragmentación) lo cual es parecido a lo reportado por García, 1988. En éste trabajo el medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano fue el medio PPLO sólido y líquido, observándose un crecimiento bacteriano también aceptable.

En éste trabajo para la preparación de antígeno se utilizó la metodología de Kaba (2001) la cual indica que se debe incubar *C. pseudotuberculosis* en medio de PPLO, posteriormente centrifugar y el pellet obtenido fue utilizado para las pruebas de ELISA indirecta y Western Blot.

Como cualquier sustancia, el extracto bacteriano de *Corynebacterium pseudotuberculosis* posee partes antigénicas, para conocer dichas partes de éste extracto bacteriano en el presente trabajo, se recurrió al uso de Western Blot, encontrándose diferentes bandas antigénicas, que incluyen: p15, p35, p45, p55, p70 p100 y p130 kD en el extracto bacteriano de agar PPLO y p35 y p70 kD en el caldo de PPLO. Teniendo bandas más marcadas con el peso de 35 y 70 kD, sugiriendo que estas bandas corresponden a la base antigénica de los extractos bacterianos obtenidos.

De acuerdo a Navarrete (1988), menciona que la exotoxina bacteriana (Fosfolipasa D) producida y que difunde al medio, es un polipéptido de 10 a 90 kD. Urquiza (2006), para conocer el peso de la exotoxina, utilizó electroforesis, encontrando diferentes bandas de componentes estructurales: p29, p31.5, p35, p45, p60 y p190 kD. Proponiendo que las bandas obtenidas en éste trabajo corresponderían a fases antigénicas de la Fosfolipasa D, al encontrar concordancia con el peso de 35 y 45 kD, al igual que lo mencionado por Navarrete.

Kaba *et al*, 2001, al realizar Western Blot con un extracto de pared bacteriana obtuvo bandas desde 16.5 a 108 kD. A su vez realizó la tinción de Coomassie Blue del extracto, teniendo bandas con pesos de 15, 25, 35, 50.9 y 80 kD.

Igualmente en este trabajo indica que, por si solo el extracto de la bacteria posee varias bandas, y a su vez estas son antigénicas, pudiendo tener relación con los pesos moleculares obtenidos por Kaba, sería importante investigar en estudios posteriores exactamente a que corresponde cada banda y de acuerdo a esto trabajar con éstas u otras pruebas inmunodiagnósticas y de acuerdo a su sensibilidad y especificidad, poder trabajar también con estos extractos para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa.

El método de ELISA es una prueba de gran utilidad para el diagnóstico, utilizando sobre todo antígenos de naturaleza proteica. Se han realizado investigaciones utilizando diversos componentes como bacteria completa, pared celular, exotoxina (Fosfolipasa D) y exotoxina recombinante (Çetinkaya *et al*, 2002). Maki *et al*, 1985 comparó la exotoxina cruda y diferentes formas de lisados celulares, observando que la exotoxina fue más sensible como antígeno de fase sólida que el mejor sonificado celular (obtenido de células suspendidas en extracto de éter). Sutherland *et al*, 1987 comparó toxina cruda y células de la pared bacteriana purificadas mostrando que éste último presenta elevada sensibilidad (86%) pero baja especificidad (68%) con respecto al examen de pulmones y linfonodos de animales revisados post mortem.

Kaba *et al*, 2001 usó un lisado celular de bacterias enteras como antígeno de fase sólida mostrando una sensibilidad del 85% y una especificidad del 96%. Siendo sustentado por Sting *et al*, 1998 quien utilizó antígenos de la pared celular y exotoxina para la detección de anticuerpos específicos en una prueba de ELISA, encontrando una sensibilidad del 96% y una especificidad del 76% para ésta prueba.

Ellis *et al*, 1990 realizó una prueba de ELISA usando como antígenos a la pared celular y la exotoxina para detectar anticuerpos en el suero de borregos adultos con linfadenitis caseosa adquirida naturalmente. La ELISA para pared celular detectó anticuerpos en 96.9% de los borregos con lesiones de linfadenitis caseosa, mientras que la ELISA para exotoxina detectó anticuerpos en 84.8% de los borregos positivos en el mismo grupo.

En éste trabajo se utilizó el extracto de bacteria como antígeno de fase sólida y se muestra el uso de una ELISA Indirecta como herramienta para el diagnóstico de linfadenitis caseosa en ovinos.

Cabe mencionarse que Kaba *et al*, 2001 relaciono sus resultados de ELISA indirecta con Western Blot, utilizando el mismo antígeno de fase sólida. Justificando un diagnóstico bueno de LC a nivel individual y posiblemente en programas basados en serología.

Investigaciones realizadas por Chikamatsu *et al*, 1989, usando Inmunodifusión (ID) y comparándola con ELISA mostraron que ELISA detecta mas positivos que ID pero da ocasionalmente reacciones no específicas; ID es menos sensitiva que ELISA para detectar anticuerpos pero no da ninguna reacción no específica.

Ter Lak *et al*, 1992 realizó una ELISA sándwich utilizando a la exotoxina como antígeno, encontrando una sensibilidad y una especificidad de casi 100%.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas que detectan anticuerpos específicos se debe a la cantidad y calidad de los antígenos utilizados esto con el fin de evitar resultados falsos positivos. La prueba de ELISA presenta alta sensibilidad y especificidad además de una aceptable reproductibilidad.

Habrá que tomar en cuenta que sería importante realizar mas investigaciones para determinar la sensibilidad y especificidad de diferentes antígenos en pruebas de diagnóstico en México para el control y erradicación de enfermedades como la linfadenitis caseosa en los rebaños.

VII. CONCLUSIONES

1. Se considera a la linfadenitis caseosa como una de las enfermedades infecciosas que afectan a los ovinos, provocando pérdidas en la producción de los rebaños por decomisos a nivel de rastro hasta disminución en la producción; siendo necesario el realizar un diagnóstico clínico al rebaño para así poder realizar las medidas necesarias para su control y erradicación.
2. En el presente trabajo se cubrieron los objetivos de aislar e identificar a *Corynebacterium pseudotuberculosis* y la obtención de antígeno, los cuales quedan disponibles para la realización de estudios posteriores.
3. Así mismo, se logró la obtención de sueros de los ovinos dentro de cuatro centros de producción y su utilización para el diagnóstico serológico.
4. La prueba de ELISA Indirecta presenta ventajas como son: su fácil realización, siempre y cuando se cuente con el material adecuado. Los reactivos son estables por largo tiempo, se puede adaptar a condiciones de campo, manejar un gran número de muestras de forma rápida por automatización y uso de cierto equipo.
5. El uso del extracto bacteriano puede dedicarse no solo a la realización de diagnóstico e investigación, sino que también puede emplearse para la realización de estudios seroepidemiológicos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alves, F. S. F., and Olander, H. (1999). Uso de vaccina toxoide no controled da linfadenite caseosa em camprinos. *Vet. Noticias.* 5:69-75.
2. Award, F. I. (1960) Serologic investigation of pseudotuberculosis in sheep. I. Agglutination Test. *Am. J. Vet. Res.* 21: 251 – 253
3. Ayers, L. J. (1977) Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, patogenezis, and immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171: 1251 - 1254
4. Baird G.J., Fontaine M. C. (2007) *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J. Comp. Path.* 137: 179 – 210.
5. Barrientos J. S., Cortés N., Tórtora J. L. (2008) Diferentes biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* están involucrados en la Linfadenitis Caseosa Cutánea y Visceral. *Revista Electrónica de Clínica Veterinaria Vol. III: N° 4.*
6. Binns S. H., Green L- E., Bailey M. (2007) Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary Microbiology* 123: 169–179.
7. Braga, W.; Schul, S.; Nuñez, A.; Pezo, D.; Franco, E. (2007) A primary *Corynebacterium pseudotuberculosis* low dose infection in alpacas (*Lama pacos*) protects against a lethal challenge exposure. *Small. Rum. Res.* 72: 81 – 86.
8. Brown, C. C., Olander, H. J., Biberstein, E. L., and Morse, S. M. (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goat against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 47:1116-1119.
9. Burrell, D. H. (1981). Caseous lymphadenitis in goats. *Aust. Vet. J.* 57:105-110.
10. Cameron, C. M. (1973). The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. *Cornell Vet.* 30: 41 – 46.
11. Carne, H. R., and Onon, E. O. (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endotelial cells of blood vessels. *Nature.* 271:246-248.
12. Carne, H. R., and Onon, E. O. (1982). The exotoxins of *Corynebacterium ulcerans*. *J. Hyg. (Camb).* 88:173-191.

13. Cesari E. (1930) Sur le diagnostic de la lymphadenie caséense por l'intradermoreacción aà la Preisz – Nocardine. Bull. Acad. Vet. France 3,6: 291 – 295.
14. Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., Debaere, T., and Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Vet. Microbiol. 88:75-83.
15. Chikamatzu, S., Zhao, H., Kikuchi, N., and Hiramune, T. (1989). Seroepidemiological survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep in Japan using enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion. *Jpn. J. Vet. Sc.* 51(5):887-891.
16. Chirino – Zàrraga, C., Scaramelli, A., Rey – Valeirón, C. (2006) Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research* 2006; 65: 170–175.
17. Chirino – Zàrraga, C., Scaramelli, A., Rey – Valeirón, C., Carrero, L. (2009) Diagnosis of caseous lymphadenitis by ELISA in naturally infected goats from Venezuela. *Small Ruminant Research* 2006; 87: 92–95.
18. Costa, L.R.R. , Spier, S. J., Hirsh, D. C. (1998) Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Vet. Mic.* 62: 135 – 143.
19. Cubero, P. M. J., Real, F., González, M., y León-Vizcaíno, L. (2002). Epidemiología de la Pseudotuberculosis. *Enfermedades Infecciosas*. Universidad de Murcia y Universidad de Las Palmas.
20. D´Afonseca, V., Prosdocimi, F., Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Moraes, P. M., Pena. (2010) Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiological Res.* 165: 312 – 320.
21. Dercksen, D. P.; Brinkhof, J. M. A.; Dekker, N. T.; Maanen, K.; Bode, C. F.; Baird, G. and Kamp, E. M. (2000) A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Mic.* 75: 167 – 175.
22. Desiderio, V. J. and Turillo, A. L. (1979) Serum proteins of normal goats and goats with caseous lymphadenitis. *Am. J. Vet. Res.* 40,3: 400 – 402.
23. Dorella, F.A., Estevama, E.M., Cardoso, P.G., Savassi, B.M. (2006) An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 114: 298 – 303.

24. Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S. C., Miyishi, A., Azavedo, V. (2006) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37: 201 – 218.
25. Egen, B., Cuevas, A. W., Macnamara, P., Sammons, D. W., Humphreys, R., and Songer, J. G. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.* 50(8):1319-1322.
26. Ellis, T. M., Sutherland, S. S., Wilkinson, F. L., Mercy, A. R., and Paton, M. W. (1987). The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions and the transmission of this bacterium to other sheep. *Aust. Vet. J.* 64:261-263.
27. Ellis, J. A., Hawk, D. A., Holler, L. D., Mills, K. W., and Pratt, D. L. (1990). Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:1609-1613.
28. Ellis, J. A., Hawk, D. A., Mills, K. W. And Pratt, D. L. (1991). Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28:289-301.
29. Estrvao, S. G., Gallardo, A. A., Abalos, M. A., Alvarez, L. A. (2009) *Corynebacterium Pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revision de casos. *Redvet* 10: N° 10.
30. Fernández, M. I. (2009) Identificación y poder patógeno de microorganismos del género “*Corynebacterium*” aislados de muestras clínicas. Memoria para obtener el grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid.
31. Ferrer, L. M., Lacasta, D., Chacón, G. Ramos, J. J. Villa, A. Clinical diagnosis of visceral caseous lymphadenitis in Salzwedder ewe. (2009) *Small Rum. Res.* 87: 126 – 127.
32. Fontaine M. C., Baird G.J., Connor, K. M., Rudge, K., Sales, J., Donachie, W. (2006) Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine* 24: 5986 – 5996.

33. Fontaine M. C., Baird G.J. (2008) Caseous Lymphadenitis. *Small Ruminant Research*; 76: 42 – 48.
34. Gaabary, M. H., Osman, S. A., Oreiby, A. F. (2009) Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Rum. Res.* 87: 116 – 121.
35. García V. S. (1980) Aislamiento y caracterización de corinebacterias de muestras de ovinos y caprinos en México. Tesis de Licenciatura. ENEP-Cuautitlán, UNAM.
36. Gershwin, L. J., Krakowca, S and Olsen, R. G. (1995) Principles of immunology in immunology and immunopathology of domestic animals. 2º edition. Mosby. USA. Pp 3- 34
37. Gillespie, J. H., Timoney, J. F. Scott, F. W. (1988) The genera *Corynebacterium* and *Eubacterium* in Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals 8º edtion. Cornell University Press. USA. P.p. 250 – 252.
38. Guilloteau, L., Pepin, M. (1990) Recruitment of 99m – technetium – or 111 – indium – labeled polymorphonuclear leukocytes in experimentally induced piogranulomas in lambs. *J. Leuk. Biol.* 48: 343 – 352.
39. Guimaraes, A. S., Seyffert, N, Bastos, B. L., Portela, R. W. D., Meyer, R. (2009) Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Rum. Res.* 87: 86 – 91.
40. Hard, G. C. (1970) Adoptive transfer of immunity in experimental *Corynebacterium ovis* infection, *J. Comp. Pathol.* 80: 329 – 334.
41. Hsu, T. Y., Renshaw, H. W. , Livingston, C. W., Augustine, J. L., Zink,, D. L., and Gauer, B. B. (1985). *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxin: fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 46:1206-1211.
42. Husband, A. J. and Watson, D.L. (1977) Immunological events in the popliteal lymph node of sheep following injection of live or killed *Corynebacterium ovis* into an afferent popliteal lymphatic duct. *Res. Vet. Sci.* 22: 105 – 112.
43. Kaba, J., Kutschke, L., and Gerlach, G-F. (2001). Development of an ELISA for the diagnosis *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Vet. Microbiol.* 78:155-163.

44. Lan, D. T. V., Tanigushi, S., Makino, S., Shirahata, T., and Nakane, A. (1998). Role of endogenous tumour necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 42:863-870.
45. León, L., Garrido, A. F., González, C. M., Cubero, P. M. (2002) Anatomía patológica de la pseudotuberculosis en: artículos técnicos de sanidad animal Sa008. OVIS 78: 1 -21.
46. Mackaness, G. B. (1970) The monocyte in cellular immunity. *Semin. Hematol.* 7,2: 172 – 184.
47. Magdy, H. A.; Salama, A. O.; Mohamed, S. A.; Atef, F. O. (2010) Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. *Small. Rum. Res.* 94: 117 – 124.
48. Maki L. R., Shen S. H., Bergstrom R. C., Stetenbach, L. (1985) Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep, using an enzyme linked immunosorbent assay. *AM. J. Vet. Res.* 46, 1; 212-214.
49. Malone, F. E., Hartley, H. M., Skuce, R. A. (2010) Bacteriological examinations in sheep health management. *Small Rum. Res.* 92: 78 – 83.
50. McKean, S., Davis, J., Moore, R. (2005) Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes and Infection* 7: 1352 – 1363.
51. Menzies, P. I., Muckle, C. A., Hwang, Y. T., and Songer, G. J. (1994). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Small Rumin. Res.* 13:193-198.
52. Menzies, P. I., Hwang, Y-T., and Prescott, J. F, (2004). Comparison of and interferon- γ to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 100(1-2):129-137.
53. Meyer, R., Regis, L., Vale, V., Paule, B., Carminati, R., Bahia, R., Moura – Costa, L., Schaer, R., Nascimineto, I., Freire, S. (2005) In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 107: 249 – 254.

54. Moura – Costa, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Vale, V. L. C., Portela, R. W., Friere, S. M. (2008) Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde´ goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126: 131–141
55. Mohan, P., Vathsala, M., Jayaprakasan, V. (2008) Comparative characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in Kerala, India and reference strain. *Small Rum. Res.* 74: 226 – 230.
56. Muller, B., Henton, M., Lane, E., Parsons, S., Kotze, A. (2011) Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Vet. Microbio.* 147: 340 – 345.
57. Navarrete, G. S. M. (1988). Obtención de toxina a partir del aislamiento de *Corynebacterium ovis*. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán. UNAM.
58. O’Reilly K.M., Medley G.F., Green L.E. (2010) The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. *Preventive Veterinary Medicine* 95: 115–126.
59. Paule, B. J. A., Azevedo, V., Regis, L. F., Carminati, R., Bahia, C. R., Vale, V. L. C., Moura – Costa, L. F. (2003) Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-g production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96: 129 – 139.
60. Pavan, M. E., Robles, C., Cairo, F.M., Marcellino, R., Pettinari, M. J. (2011) Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase b-subunit gene (*rpoB*). *Res. Vet.* 02.007.
61. Pépin, M., Pardon, P., Lantier, F., Marley, J., Levieus, D., and Lamand, M. (1991). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet. Microbiol*, 26:381-392.
62. Pépin, M., Seow, H. F., Corner, L., Rothe, J. S., Hodgson, A. L. M., and Wood, P. R.(1997). Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various estrains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.*28:149-163.

63. Playfair, J. H. L. (1992) Complement in: immunology at glance 5^o Edition. Blackwell Scientific Publications, Great Britain.
64. Prescott, J. F., Menzies, P. I., Hwang, Y. T. (2002) An interferon – gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. *Vet. Microbiol.* 88: 287 – 297.
65. Quinn, J. P., Markey, K. B., Carter, E. M., Donnelly, J. W. (2002) Infection and immunity in veterinary microbiology and microbial disease 1^o edition Blackwell Publishing. United Kingdom. P.p. 495 – 515.
66. Renshaw, H.W., Graff, V. P., Gates N. L. (1970) Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Moraxella* spp. From internal abscesses in emaciated ewes. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1110 – 1114
- Zaki, M. M. (1968) The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. *Res. Vet. Sci.* 9: 489 – 493.
67. Retmal, P., Ríos, M., Cheuquepán, F., Abalos, P., Pizarro – Lucero, J., Borie, C., Gutierrez, J. (2011) Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis* rpoB gene sequence. 03.012
68. Ruiz, L., Barrera, M., Frias, M. T. (2007) Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. *RECVET* Vol. II, N° 8.
69. Ruiz, L., Barrera, M., Frias, M. T. (2008) Linfadenitis caseosa II: Diagnóstico, control y aspectos epizootiológicos. *RECVET* Vol. III, N° 4.
70. Seyffert N., Guimarães A. S. (2010) High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins – based ELISA. *Research in Veterinary Science* 88: 50–55
71. Sting, R., Steng, G., and Spengler, D. (1998). Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. *Zentralb. Veterinarmed.* 45:209-216.
72. Solanet, J.J., Malena, R., Estein, S. M., Belchior, S. E. (2011) Desarrollo de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en carneros vacunados o infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Argentina de Microbiología* 43: 9 – 17.
73. Stapleton, S., Bradshaw, B., O’Kennedy, R. (2009) Development of a surface plasmon resonance-based assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Analytica Chimica Acta* 651: 98 – 104.

74. Sutherland, S. S., Ellis, T. M., Mercy, A. R., Paton, M., and Middleton, H. (1987). Evaluation of an Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for the Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in sheep. *Vet. Microbiol.* 263-266.
75. Ter Laak, E. A., Bosch, J., Bijl, G. C., and Schreuder, B. E. C. (1992). Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 53(7):1125-1132.
76. Trost, E., Ott, L., Schneider, J., Schroder, J., Jaenicke, S. (2010) The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into generegulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics* 11:728
77. Ural, K., Alic D., Haydardedeoglu, A. E., Cedden, F. Guzel, M. (2008) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Saanen×Kilis crossbred (White) goats in Ankara, Turkey and effective kanamycin treatment: A prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Small Rum. Res.* 77: 84 – 88.
78. Urquiza, P. M. P. (2007) Estblecimiento de una prueba de ELISA para el diagnóstico de linfadenitis caseosa en cabras. Tesis de licenciatura. FESC – UNAM.