



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EVALUACIÓN DE DOS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA LINFADENITIS
CASEOSA EN OVINOS UTILIZANDO TRES MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE
ANTÍGENOS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA
RICARDO CORONA TORRES

**ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ
COASESOR: MVZ SUSANA ELVIRA GARCÍA VÁZQUEZ
COASESOR: M. EN C. LUCÍA DEL CARMEN FAVILA HUMARA**



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

“Evaluación de dos pruebas de diagnóstico para linfadenitis caseosa en ovinos utilizando tres métodos de obtención de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*”.

Que presenta el pasante: **Ricardo Corona Torres**
Con número de cuenta: **30479519-8** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de noviembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	Dr. José Francisco Morales Álvarez	
SECRETARIO	MC. Juan Sebastián Barrientos Padilla	
1er SUPLENTE	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
2do SUPLENTE	MVZ. Yasmín Luis Ceballos	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

'All my life, I have been fascinated by the big questions that face us, and have tried to find scientific answers to them.'

-Stephen Hawking, 1997

Agradecimientos

A Dios:

Porque nunca me ha faltado nada.

A mi familia:

Mi padre Federico, mi madre Angélica y mi hermano Miguel que aunque escoja una escuela en Cuautitlán, un laboratorio en Cuajimalpa o en Escocia siempre me han apoyado, me han acompañado y han estado orgullosos de mí, yo también lo estoy de ustedes. A mis abuelos, mis tíos, mis primos que también se sienten orgullosos de mí, yo lo estoy de ustedes. A mi mascota Lia que todos los días me recuerda lo bonito de ser Médico Veterinario y el valor que tienen los animales.

A mis asesores:

Dr. Francisco Morales, M en C. Lucy Favila y MVZ Susana García que me apoyaron en este proyecto, me aconsejaron y lo más importante, siempre confiaron en lo que estaba haciendo.

A CENID Microbiología Animal, INIFAP:

Más que asesor y profesor, mi amigo Pancho que ha confiado en mí para muchos de sus proyectos y me ha apoyado mucho en los míos. A mi asesora no oficial, compañera y amiga (casi hermana) Lupita que le debo todo lo que aprendí sobre microbiología, por su participación activa en mi trabajo experimental y trabajo escrito, además de mucho apoyo, compañía y una linda amistad. A mi compañera y amiga (casi hermana) Mary por su participación en mi trabajo escrito y aveces hasta en el trabajo experimental además de su linda amistad. A mis compañeras y amigas Eve, Alma, Samy, Selenita, Gaby Navarro, Coral, Raquel y Erendira que participaron en distintas etapas de mi proyecto, muchas gracias. A los investigadores: Dr. Efrén Díaz, Dra. Gaby Palomares, Dr Marco Santillán, Dr. Victor Tenorio, Dr. Francisco Aguilar, Dr. José Morales y Dr. Ricardo Flores,

director del instituto, que también me apoyaron de distintas maneras en mi proyecto.

A FES Cuautitlán, UNAM:

A todos mis profesores que me formaron como Médico, con mención especial para mi profesor y amigo el M. en C. Alfredo Cuéllar que me vio formarme desde el bachillerato hasta hoy. A todos mis compañeros que influyeron en la manera en que me desarrollé con mención especial para mis amigos Alhelí, Sandra, Ricardo y Carlos que más me han apoyado, gracias por su linda amistad.

A mis amigos de toda la vida:

Afortunadamente han sido muchos pero quiero mencionar principalmente a Luis, Nabile, Liz, Erick, Paco y Samanta que a pesar de la distancia siempre me han acompañado y me han apoyado, cuentan con todo mi apoyo gracias por su linda amistad que ha sido muy fuerte y ha durado mucho.

To GBRC, University of Glasgow:

For all the support I received during my short stay, to Professor Tim who gave me the opportunity to be part of his group for two months. To Kashiff, who provided me with much of my current knowledge. To Andrea, Jonathan, Friedi, Alicia, Cathy, Carol, Jenny, Sultan, Yahya, Ryan, Mónica, Alberto, Jiang and Annabel, for your support and for making me feel like home in Glasgow.

Índice

Resumen.....	9
1 Introducción.....	10
1.1 Linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos.....	10
1.2 Alternativas de diagnóstico.....	24
<i>1.2.1 Aislamiento e identificación bacteriológica.....</i>	<i>25</i>
<i>1.2.2 Pruebas de inmunidad celular.....</i>	<i>26</i>
<i>1.2.3 Pruebas de inmunidad humoral.....</i>	<i>28</i>
<i>1.2.4 Ensayos inmunoenzimáticos.....</i>	<i>29</i>
<i>1.2.5 Antecedentes sobre la prueba de ELISA para detectar linfadenitis caseosa.....</i>	<i>32</i>
2 Justificación.....	35
3 Hipótesis.....	37
4 Objetivos.....	38
5 Materiales y métodos.....	39
5.1 Preparación de los antígenos.....	39
<i>5.1.1 Aislamiento e identificación de Corynebacterium pseudotuberculosis.....</i>	<i>39</i>
<i>5.1.2 Obtención de sobrenadante rico en fosfolipasa D (PLDS).....</i>	<i>40</i>
<i>5.1.3 Obtención de extracto proteico de pared celular por desnaturalización química más calor (DCPE).....</i>	<i>41</i>
<i>5.1.4 Obtención de extracto proteico de pared celular por calor (BCPE).....</i>	<i>42</i>
5.2 Obtención de sueros de ovinos sanos, sospechosos y clínicamente enfermos.....	43

5. 3 Diseño de las pruebas de ELISA e Inmunodifusión en gel.....	45
<i>5.3.1 Diseño de la prueba de ELISA.....</i>	<i>45</i>
<i>5.3.2 Diseño de la prueba de IDGA.....</i>	<i>47</i>
<i>5.3.3 Análisis estadístico.....</i>	<i>48</i>
5.4 Aplicación de las pruebas serológicas para emitir un diagnóstico final.....	49
<i>5.4.1 Evaluación serológica de animales con estatus sanitario indeterminado para linfadenitis caseosa.....</i>	<i>49</i>
<i>5.4.2 Aplicación del diagnóstico serológico para la estimación de la prevalencia en una unidad de producción ovina (UPO).....</i>	<i>50</i>
6 Resultados.....	51
6.1 Obtención de los antígenos.....	51
<i>6.1.1 Aislamiento e identificación de la cepa de campo “Robus” de C. pseudotuberculosis.....</i>	<i>51</i>
<i>6.1.2 Características del sobrenadante rico en fosfolipasa D (PLDS).....</i>	<i>52</i>
<i>6.1.3 Características del antígeno extracto proteico de pared celular por desnaturalización química más calor (DCPE).....</i>	<i>53</i>
<i>6.1.4 Características del antígeno extracto proteico de pared celular por calor (BCPE).....</i>	<i>54</i>
6.2 Diseño de las pruebas.....	55
<i>6.2.1 Prueba de ELISA.....</i>	<i>55</i>
<i>6.2.2 Prueba de IDGA.....</i>	<i>57</i>
6.3 Aplicación de las pruebas serológicas para emitir un diagnóstico final.....	59
<i>6.3.1 Evaluación serológica de animales con estatus sanitario indeterminado para linfadenitis caseosa.....</i>	<i>59</i>
<i>6.3.2 Estimación de la prevalencia en una UPO.....</i>	<i>62</i>

6.3.3 Resultados generales del trabajo	62
7 Discusión	63
8 Conclusiones	70
9 Referencias bibliográficas	71
Anexo I	77

Resumen

La linfadenitis caseosa es una enfermedad crónica que afecta ovinos y caprinos produciendo abscesos en linfonodos cutáneos y viscerales. La principal manifestación es la pérdida de peso del animal. La presentación visceral rara vez es detectada por la falta de pruebas de diagnóstico adecuadas. En el presente estudio se desarrollaron y evaluaron dos pruebas serológicas: ELISA e inmunodifusión en gel (IDGA) para diagnosticar la enfermedad. Se aisló y se identificó por pruebas bioquímicas una cepa de *C. pseudotuberculosis* a partir de un absceso en el linfonodo submandibular de un ovino. Se obtuvo un extracto bacteriano de una cepa de campo de *C. pseudotuberculosis* por aplicación de calor que se utilizó para desarrollar una prueba de IDGA. Se obtuvo un sobrenadante rico en fosfolipasa D (PLD) que se utilizó como antígeno para estandarizar una prueba de ELISA. La prueba de IDGA tuvo una eficacia de 58.82%, una sensibilidad de 52.63% y una especificidad de 70.59%, mientras que la prueba de ELISA tuvo una eficacia del 81%, una sensibilidad de 85.71% y una especificidad de 71.43%. Se eligió la prueba de ELISA por tener una mejor eficacia para estimar la proporción de animales seropositivos de un grupo de animales clínicamente sanos, el resultado fue de 29.65%. También se utilizó para estimar la prevalencia de linfadenitis caseosa en una unidad de producción ovina que fue de 25.71%. Éstos resultados establecen las bases para el diagnóstico serológico de linfadenitis caseosa aunque se requiere profundizar en la investigación del tema para mejorar la eficacia de las pruebas.

Trabajo de tesis financiada por:

Laboratorio de Diagnóstico, CENID Microbiología, INIFAP.

Proyecto SAGARPA-CONACyT 48599 "Estudio Epidemiológico de Enfermedades que Afectan la Producción Caprina en México".

...y con apoyo de beca de:

Redes CONACyT FARMED y BIODRED. Becanet 2012.

1 Introducción

1.1 Linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos

La linfadenitis caseosa es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por la inflamación crónica de los linfonodos con la formación de abscesos. El material contenido puede ser desde espeso semilíquido (purulento) pasando por pastoso y seco hasta caseoso o calcificado de color blanco cremoso, amarillento o verde claro. El agente causal es la bacteria Gram + denominada *Corynebacterium pseudotuberculosis* ^{1, 2, 3}.

La infección puede ocurrir en cualquier linfonodo ya sea superficial o visceral. Un absceso superficial puede ser visible como una masa de consistencia firme cuya ubicación corresponde a la de los linfonodos cutáneos. En el caso de la infección de los linfonodos viscerales, los abscesos formados no son visibles hasta después del sacrificio causando signos clínicos variables dependiendo de la magnitud de la lesión y los órganos afectados ⁴.

Encontrar este tipo de lesiones representa un defecto crítico para la canal⁵, lo que implica decomisos en el rastro o puntos de verificación zoonosanitaria y por lo tanto pérdidas económicas importantes durante la comercialización⁶. Sin embargo, la importancia económica en la producción ovina radica principalmente en la pérdida de peso crónica y progresiva debida al factor estresante que representa la presencia de abscesos tanto superficiales como viscerales, en estos últimos sin generar signos específicos que permitan el diagnóstico clínico^{4, 7}. La enfermedad provoca disminución en la producción de lana por lo que en países productores de lana como Australia y Nueva Zelanda, representa una pérdida económica adicional⁸. En la producción caprina las principales pérdidas económicas se relacionan con infecciones en glándula mamaria que ocasionan una disminución parcial o total de la producción láctea³.

A nivel mundial, la linfadenitis caseosa ocasiona pérdidas por desecho de animales, disminución en la producción láctea, desordenes reproductivos, decomiso y depreciación de la canal; y en casos raros por mortalidad. Aunque se sabe que la incidencia de la enfermedad es alta, la cifra real se subestima por la falta de notificación oficial^{9, 10}. En México en el año 2005 se publicó un estudio de prevalencia de linfadenitis caseosa en caprinos efectuado en la comarca lagunera, una de las principales zonas de producción de leche de cabra en el país, en el cual se evaluó la presencia de linfonodos superficiales afectados obteniendo como resultado una prevalencia del 3.38%¹¹. En países donde se han realizado estudios más profundos de incidencia que incluyen frecuencia en rastros y pruebas serológicas, se mencionan tasas de frecuencia de 50-60% o más¹. En Noruega los reportes de incidencia van desde el 8 hasta el 90%; también se menciona que en Estados Unidos, Canadá y Australia es una de las enfermedades con mayor importancia económica⁹ existiendo en Norteamérica una prevalencia promedio del 8% que incrementa con la edad ya que en caprinos mayores a 4 años la prevalencia es del 22%¹².

Sinónimos de la enfermedad

Pseudotuberculosis, Cheesy gland², Enfermedad caseosa, CLA, CL⁸.

Etiología

La linfadenitis caseosa es causada por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*), antes conocida como *Corynebacterium ovis*. Las especies del género *Corynebacterium* son pequeños bastones pleomórficos Gram positivos (0.5-0.6µm por 1.0-3.0µm), no son ácido-alcohol resistentes, inmóviles, poseen fimbrias, no forman esporas, tienden a agruparse en paralelo (agrupación conocida como empalizada) o células formando ángulos agudos entre ellas (agrupación conocida como "letras chinas"). La pared celular de las especies del género *Corynebacterium* posee ácidos grasos de cadena larga conocidos como ácidos micólicos, por lo que este género se

encuentra agrupado junto a *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus* en un grupo llamado "CMNR" ^{12, 13, 14, 15}.

En medios de cultivo artificiales, se observan colonias pequeñas, blancas y secas¹⁴ como se muestra en la Figura 1; su crecimiento *in vitro* tarda 48 horas a 37°C. Los medios de cultivo que permiten el mejor crecimiento de *C. pseudotuberculosis* son principalmente el medio PPLO, el cual permite un crecimiento masivo del microorganismo^{16, 17}, y el medio BHI ya sea en forma líquida o sólida para ambos^{13, 18}. En medio agar sangre, *C. pseudotuberculosis* puede o no producir β -hemólisis, produce inhibición de la β -lisina producida por *Staphylococcus* sp. y produce hemólisis sinérgica con *Rhodococcus* sp. ^{12, 14, 19}.

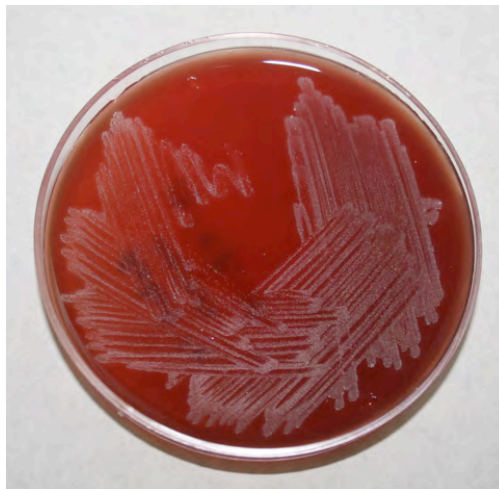


Figura 1. Colonias de *C. pseudotuberculosis* cultivadas en agar sangre de ovino.

Las propiedades bioquímicas completas se muestran en el Cuadro 1, donde se destaca la presencia de la enzima catalasa y la capacidad de reducción de nitratos a nitritos, característica presente generalmente en cepas que afectan a equinos^{13, 14} aunque existen reportes de cepas nitratos-positivo adaptadas a ovinos y caprinos¹².

Su principal factor de virulencia es la exotoxina fosfolipasa D (PLD), producida por la membrana celular de la bacteria que le otorga la propiedad de inhibir la β -hemolisis de *Staphylococcus* sp., actúa como una esfingomielinasa en la membrana de las células de los mamíferos^{12, 13}. La PLD le ayuda a diseminarse incrementando la permeabilidad vascular lo cual ocasiona que llegue a sistema linfático, también produce dermonecrosis, toxicidad en la fagocitosis, eritrolisis dependiente del complemento y letalidad a dosis elevadas^{10, 20}.

Cuadro 1. Caracterización bioquímica de <i>C. pseudotuberculosis</i>^{12, 13, 14}.					
Producción de ácido		Hidrólisis		Otras características	
Glucosa	+	Esculina	-	Fosfatasa	+
Arabinosa	variable	Hipurato	-	Pirazinamidasa	-
Xilosa	-	Urea	+	Rojo de metilo	+
Ramnosa	-	Tirosina	-	Reducción de nitratos	variable
Fructosa	+	Caseína	-	Catalasa	+
Galactosa	+			Oxidasa	-
Manosa	+			Lipofilia	-
Lactosa	-				
Maltosa	+				
Sacarosa	variable				
Trealosa	-				
Rafinosa	-				
Salicina	-				
Dextrina	variable				
Almidón	-				

Otro factor de virulencia es la presencia de ácidos micólicos en pared celular que protegen a la bacteria de la fagocitosis, de la destrucción intrafagocitaria y que además inducen necrosis hemorrágica y abscedación crónica²¹. A diferencia de los otros géneros del grupo CMNR, los ácidos micólicos del género *Corynebacterium* poseen una cadena de átomos de carbono más corta que consta

de 20 a 36 átomos mientras que los ácidos micólicos de *Mycobacterium* poseen de 60 a 90 átomos, los de *Nocardia* poseen de 36 a 66 y los de *Rhodococcus* poseen de 36 a 66²².

La bacteria es muy resistente a las condiciones ambientales, siendo capaz de resistir la desecación durante meses sobreviviendo en carne congelada, heces, exudado purulento y suelo por periodos prolongados; pero es susceptible a los rayos solares directos y temperaturas superiores a los 70 °C.².

Patogenia

El mecanismo de transmisión de *C. pseudotuberculosis* se da a través de la contaminación de heridas. Se cree que la bacteria se puede transmitir a través de la vía respiratoria afectando así los pulmones, sin embargo no se ha demostrado. También se menciona la vía oral como mecanismo de entrada afectando directamente las tonsilas; en donde resulta importante la transmisión a las crías a través de leche contaminada con el microorganismo^{1, 23}.

Existen 2 presentaciones de la enfermedad: La primera es la externa, también conocida como cutánea o superficial que se caracteriza por afectar los linfonodos visibles y palpables o tejido subcutáneo. La segunda presentación es la visceral o generalizada que afecta linfonodos y órganos internos no visibles, principalmente linfonodos mediastínicos aunque se puede afectar cualquier órgano como hígado, riñones o glándulas mamarias y menos frecuentemente en corazón, cerebro, médula espinal, testículos, útero y articulaciones^{4, 23, 24}.

La difusión de la enfermedad comienza con la presencia de un animal infectado que tras la ruptura de un absceso libera al microorganismo que permanece viable en las instalaciones, equipo de esquila, de tatuado o de aretado e infecta a otros animales a través de una herida^{23, 25}. Las lesiones generalmente no aparecen en el sitio de entrada pero la bacteria es capaz de multiplicarse en esta zona y provocar que se monte una respuesta inflamatoria con un acumulo de células

polimorfonucleares; *C. pseudotuberculosis* es capaz de evadir la respuesta inmune con facilidad²¹. La infección se extiende a linfonodos vía linfática gracias a los factores de virulencia de la bacteria, principalmente la PLD que aumenta la permeabilidad vascular¹⁰; aunque también tiene una importancia relevante su envoltura de ácidos micólicos ya que le permite sobrevivir a la fagocitosis y utilizar al macrófago como medio de transporte hacia el sistema linfático²².

Una vez en linfonodos se comienzan a formar múltiples piogranulomas microscópicos que crecen y se fusionan para formar un absceso en el linfonodo afectado que supura y permite la diseminación vía linfática a otros linfonodos externos o internos. El curso de la enfermedad es lento y en animales más viejos *C. pseudotuberculosis* puede llegar a torrente sanguíneo afectando de manera generalizada (linfadenitis caseosa visceral)^{21, 25}. Después de la formación de un foco purulento por la unión de los microabscesos, inicia un proceso en el que disminuye la reacción inflamatoria en el parénquima del linfonodo que comienza a encapsularse de manera lenta y continúa aumentando su tamaño si es que no hubo ruptura y eliminación del material purulento. Dicho aumento de tamaño se da por un ciclo continuo de necrosis y regeneración de la cápsula externa; en esta etapa el absceso que era suave y semifluido se torna más sólido, ocurre la formación de pequeños nódulos de mineralización en el material purulento que se acomodan a manera de capas concéntricas que al corte da la apariencia de “anillos de cebolla” (Figura 2)²².



Figura 2. Corte de absceso mineralizado, con apariencia de “anillos de cebolla”.

El periodo de incubación es muy largo desde que se inocula la bacteria hasta la aparición de los abscesos pudiendo durar de 2 a 6 meses o más^{3, 23}. Sin embargo desde la entrada de un animal infectado hasta que la enfermedad se presenta con una incidencia elevada pueden pasar de 2 a 3 años²³.

Aunque la mortalidad por linfadenitis caseosa es muy baja, ocurre con mayor frecuencia en ovinos que en caprinos como consecuencia de la diseminación de la bacteria hacia el tejido respiratorio ocasionando neumonía abscedativa^{25, 26}.

Signos clínicos

Presentación cutánea: El principal signo clínico es la presencia de abultamientos en la piel (Figura 3) que corresponden a la inflamación de linfonodos superficiales que en ocasiones se encuentran abiertos y supurando. Los abultamientos pueden presentarse de manera solitaria o en cadenas, afectándose más comúnmente los linfonodos de cabeza y cuello como el parotideo, mandibular o preescapular pero más que nada por la susceptibilidad a heridas en esta zona por peleas, espinas enterradas, picaduras de insectos, ya que todos los linfonodos son susceptibles de infectarse en caso de que la herida sea más caudal^{3, 6}.



Figura 3. Carnero con linfadenitis caseosa cutánea.

Presentación visceral: Esta presentación es más común en ovinos que en caprinos^{23, 25}. Dependiendo del órgano al que se haya diseminado *C. pseudotuberculosis* serán los signos que se presenten, por ejemplo, si alcanza glándula mamaria la manifestación será de mastitis abscedativa que representa un problema grave en la industria lechera en caprinos. El órgano más comúnmente afectado en ovinos es el pulmón, provocando neumonía crónica en animales adultos cuyos signos clínicos son disnea, taquipnea, tos crónica, pérdida de peso y en general emaciación progresiva^{3, 6, 23}.

Lesiones

En ambas presentaciones se observan abscesos en los linfonodos afectados que provocarán distintos tipos de lesiones dependiendo del órgano afectado y del curso de la enfermedad. En el caso de la linfadenitis cutánea se pueden encontrar lesiones inflamatorias en la piel; abscesos solos o múltiples de 1 a 2 cm de

diámetro con pérdida de pelo en la zona; abultamientos firmes de hasta 5 cm de diámetro; heridas supurando (Figuras 4 y 5)²⁷. Los abscesos contienen un material color verde pálido que puede formar de manera progresiva la lesión en forma de “anillos de cebolla” que a su vez madura a una masa calcificada. La formación de la lesión calcificada es menos frecuente en caprinos, el material suele permanecer de un color verde-cremoso de consistencia pastosa⁶.



Figura 4. Inflamación de linfonodo.



Figura 5. Exudado purulento en linfonodo.

La linfadenitis caseosa visceral se caracteriza por la presencia de múltiples abscesos tanto en el órgano afectado (Figura 6) como en los linfonodos asociados a éste. La presentación respiratoria es la más común en ovinos llegando a provocar una bronconeumonía con zonas de pleuritis que resulta en adherencias fibrosas a la pared torácica, pericardio o diafragma. Los abscesos formados en aparato respiratorio afectan linfonodos mediastínicos (Figura 7) que al ir progresando pueden crecer tanto que llegan a ejercer presión sobre el esófago interfiriendo con la deglución y rumia provocando anorexia y emaciación progresiva^{22, 27}.

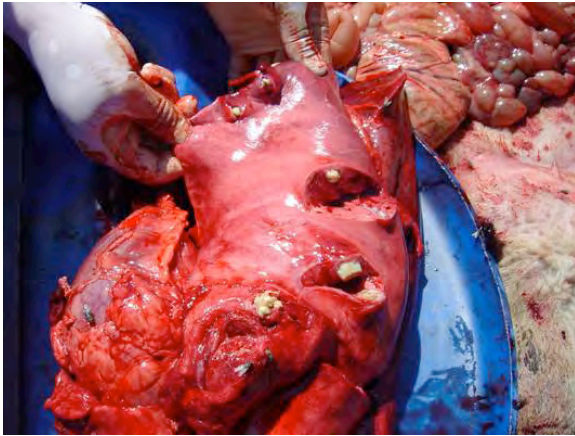


Figura 6. Abscesos encontrados en parénquima pulmonar.



Figura 7. Abscesos en linfonodos mediastínicos que afectan al corazón.

La importancia de la presentación visceral de la enfermedad en caprinos se asocia a la afección de glándula mamaria en unidades de producción caprina especializadas en leche. La lesión suele provocarse por una herida inicial en la piel que cubre la glándula mamaria que se contamina con la bacteria y se extiende hacia la glándula provocando mastitis. En las etapas tempranas de la mastitis la lesión aguda es difusa y supurativa mientras que en etapas crónicas la lesión se encuentra localizada en un absceso encapsulado²⁵.

Diagnóstico

Habitualmente el diagnóstico de la linfadenitis caseosa cutánea se realiza de manera clínica, especialmente cuando la enfermedad cursa la etapa más crónica y se forman las lesiones en forma de “anillos de cebolla”. En caso de que un absceso se encuentre supurando o se realice la debridación a manera de tratamiento, existe la alternativa del aislamiento bacteriano (Figura 8)²⁷ el cual se logra a las 48 horas de cultivo¹⁴. Posteriormente se realiza la identificación para lo cual se realizan pruebas bioquímicas que pueden simplificarse mediante el kit de diagnóstico “API Coryne”²². Recientemente se ha desarrollado la técnica de identificación por PCR, sin embargo no se ha implementado como un método rutinario de diagnóstico⁹.

En hatos de cabras productoras de leche se debe considerar la toma de muestras por medio de punción con aguja fina en la glándula mamaria afectada para realizar un examen histopatológico adicional al cultivo y aislamiento bacteriano que permitirá la caracterización del agente y su diferenciación con otros agentes causantes de mastitis²⁵.



Figura 8. Toma de muestra para aislamiento e identificación bacteriológica.

La limitación más grande que tiene la enfermedad es el diagnóstico de la linfadenitis caseosa visceral ya que no puede realizarse mediante los signos clínicos tan fácilmente, por lo tanto, es difícil llegar a un diagnóstico definitivo en casos de emaciación. Para esto se han realizado muchos estudios que buscan una alternativa de diagnóstico mediante serología como pruebas de microaglutinación, inmunodifusión, inhibición de la hemólisis, dot-blot, Western Blot, fijación de complemento, hemoaglutinación indirecta y muchos tipos diferentes de pruebas de ELISA pero la mayoría no tienen la especificidad deseada¹⁷. En muchos países la investigación se ha enfocado a desarrollar una prueba de ELISA, por ejemplo Polonia¹⁷, Venezuela¹⁸ y Brasil²⁸ en donde se han obtenido resultados muy satisfactorios; sin embargo, muy pocos laboratorios han estandarizado la prueba²⁷. Más adelante se explicarán con mayor detalle los estudios realizados hasta la fecha para el diagnóstico de la enfermedad.

Diagnóstico diferencial

La formación de abscesos y las características de los exudados representan un signo clínico muy característico de la enfermedad que permite establecer un diagnóstico presuntivo, sobre todo cuando los abscesos se encuentran presentes en varios animales. Existen agentes como *Actinobacillus licheniformis*, *Arcanobacterium pyogenes* y *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* que producen linfadenopatía supurativa, sin embargo se presenta de manera esporádica y muy rara vez ocurre como un problema de hato^{22, 29}. Un estudio epidemiológico realizado en Venezuela, en el cual se realizó el aislamiento e identificación bacteriológica a partir de exudados purulentos obtenidos de abscesos en linfonodos cutáneos, reportó el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* en el 67.69% de los casos mientras que en el 27.71% se aislaron otros microorganismos (*Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus caprae*, *Nocardia brasiliensis* y otros bacilos aeróbicos)³⁰. Por lo tanto, el diagnóstico diferencial va enfocado a la caracterización del agente etiológico que está provocando el absceso^{14, 25, 26, 31}.

Muchas veces la entrada del agente se da a través de heridas en cavidad oral debido a comederos inadecuados o por la dieta que puede incluir alimentos como espinas de nopal que dañan la mucosa produciendo una vía de entrada no solo para *C. pseudotuberculosis* sino también para agentes como *Burkholderia pseudomallei* que provoca melioidosis⁶ y para *Actinobacillus lignieresii*, agente causal de actinobacilosis o lengua de madera, el cual provoca abscesos en nódulos linfáticos de la cabeza principalmente, con la formación de granulomas^{29, 32}.

En los casos de mastitis el diagnóstico diferencial se hace con *Arcanobacterium pyogenes* ya que como se mencionó anteriormente, también puede producir abscesos en glándula mamaria. El principal diagnóstico diferencial se realiza con

mastitis producidas por *Staphylococcus aureus* y *Mannheimia haemolytica* ya que el control para evitar el contagio es muy distinto³³.

Tratamiento

La bacteria es sensible a la mayoría de los antimicrobianos², sin embargo una vez que se ha formado la cápsula de tejido fibroso que forma el absceso, el tratamiento con antimicrobianos es incapaz de penetrar esta cápsula, lo que provoca que su administración sea ineficaz. El tratamiento convencional que existe es únicamente para la linfadenitis caseosa cutánea, que consiste en el drenado quirúrgico del absceso o debridación. La práctica de este tratamiento se encuentra en debate, ya que hay autores que no lo recomiendan por la contaminación del ambiente que representa la debridación de un absceso, además de que el animal permanece infectado de manera permanente, por lo tanto, la enfermedad puede aparecer de nuevo²⁷.

Si se decide llevar a cabo el drenado quirúrgico, el tratamiento se debe realizar bajo muchas precauciones higiénicas que eviten una contaminación ambiental. El procedimiento consiste en debridar el absceso en un lugar aislado del hato por medio de una incisión (Figura 9), eliminar todo el exudado caseoso, el cual debe ser recolectado en una bolsa sin permitir que contamine el suelo o cualquier parte de la instalación (Figura 10) e incinerar el material recolectado. Como procedimiento antiséptico, se realiza un lavado del absceso debridado con una solución de Iodo al 3% o Clorhexidina al 2% y el animal se coloca en un corral de aislamiento hasta que la herida haya sanado por completo, generalmente a los 20 o 30 días³. Incluso hay autores que recomiendan remover quirúrgicamente el absceso completo sin romperlo⁶.



Figura 9. Incisión realizada para drenar el absceso.



Figura 10. Al drenar el absceso se recolecta el exudado para evitar que éste contamine las instalaciones.

Medidas de prevención y control

Existen vacunas comerciales para combatir la linfadenitis caseosa, sin embargo no están disponibles en México, éstas son la vacuna Glanvac-6 y Case-Bac³⁴. La vacuna Glanvac-6 es la que más se ha difundido en varios países ya que además de inmunizar contra *C. pseudotuberculosis* por medio de un toxoide obtenido a partir de PLD inactivada, contiene 5 toxoides adicionales que protegen contra enfermedades producidas por bacterias del género *Clostridium*^{10, 22}.

En los países en donde no existe de manera comercial la vacuna se han desarrollado inmunógenos basados en diferentes antígenos como toxoides o bacterias completas inactivadas²² obtenidos de distintas maneras así como el desarrollo de toxoides recombinantes³⁵.

En países latinoamericanos es difícil conseguir vacunas recombinantes, por lo que se ha optado por la creación de vacunas y toxoides inactivados con formalina que han demostrado dar buenos resultados^{27, 34}.

Como medidas de control se recomienda aislar a los animales que hayan cursado con la enfermedad ya que permanecen como portadores por toda su vida, se debe evitar que los abscesos se rompan por si solos, además de limpiar y desinfectar todo objeto que haya tenido contacto con el exudado²³.

1.2 Alternativas de diagnóstico

Las alternativas de diagnóstico para linfadenitis caseosa se pueden dividir en 3 tipos de pruebas: identificación bacteriana, pruebas de inmunidad celular y pruebas de inmunidad humoral. Las pruebas de identificación bacteriana tienen la ventaja de permitir llegar a un diagnóstico definitivo, sin embargo en el caso de la linfadenitis visceral, el diagnóstico se obtiene después del sacrificio. Las pruebas de inmunidad celular y humoral fueron diseñadas con el objetivo de diagnosticar la presentación visceral de la enfermedad para poder llevar a cabo medidas de

control que permitan la eliminación de la enfermedad en las unidades de producción³⁶.

1.2.1 Aislamiento e identificación bacteriológica

Un análisis bacteriológico completo incluye la observación microscópica utilizando la tinción de gram y tinción de Ziehl Neelsen para observar las características morfológicas del microorganismo aislado y descartarlo como ácido-alcohol resistente³⁰.

El siguiente paso es la caracterización bioquímica de las colonias sugestivas de *C. pseudotuberculosis* de las cuales se realizan principalmente las pruebas CAMP, catalasa, reducción de nitratos, ureasa y fermentación de los azúcares: glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa y xilosa^{15, 30}.

Para simplificar la realización de las pruebas de manera convencional, existen “kits” de identificación como API CORYNE identification system (Analytical Profile Index identification system, bioMérieux, Francia), API20S system (Analytab productos, NY), Minitek identification system (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), 60-min Rapid Identification Method (Austin Biological Systems, Austin, Tex), biolog system (Biolog, Calif)²⁹. Estos “kits” se basan en pruebas de fermentación de azúcares y test enzimáticos, que ofrecen un resultado rápido aunque no sustituyen por completo las pruebas bioquímicas convencionales ya que carecen de las pruebas CAMP, producción de β -hemólisis, oxidasa y catalasa que se deben realizar de manera adicional para confirmar la identidad de la bacteria aislada^{13, 29}.

El kit de identificación bacteriológica más utilizado ha sido API CORYNE, el cual realiza 20 pruebas bioquímicas que consisten en 11 pruebas enzimáticas (pirazinamidasa, pirrolidonilarilamidasa, β -galactosidasa, N-acetilglucosaminidasa, α -glucosidasa, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, reducción de nitratos y gelatina, hidrólisis de urea y esculina) y 8 pruebas de fermentación de carbohidratos (glucosa, ribosa, D-xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa y

glucogeno) ¹³. Después de inocular con la bacteria problema, se deja incubar por el tiempo indicado en el instructivo del kit (24 y 48 horas) agregando los reactivos necesarios en el momento indicado. Los productos metabólicos formados provocan un cambio en la coloración de los tubos que se compara con coloraciones control positivo y control negativo por medio de un software incluido. El software calcula el porcentaje de identidad del organismo aislado comparado con el perfil bioquímico de un grupo de especies bacterianas que se pueden identificar con el kit. El resultado final es el porcentaje de compatibilidad del organismo problema con una especie bacteriana en específico incluyendo *C. pseudotuberculosis*²².

La identificación también se puede realizar por medio de PCR para el cual se ha estudiado la amplificación de muchos tipos de genes. Los primeros genes que se utilizaron fueron seleccionados de la región hipervariable de la secuencia genética 16S rRNA publicada en GenBank que permiten la identificación de *C. pseudotuberculosis* con la desventaja de tener reacción cruzada con *C. ulcerans*, bacteria que afecta a humanos y bovinos ^{9, 20}. También se ha estudiado la identificación de los genes que codifican para la PLD³⁷ y finalmente la región hipervariable del gen de la subunidad-β de la RNA polimerasa (rpoB) el cual tiene la ventaja de ser más específico y no crea reacción cruzada con otras especies del género *Corynebacterium*^{38, 39, 40}.

1.2.2 Pruebas de inmunidad celular

Ante la problemática de la dificultad para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa visceral, se ha estudiado el desarrollo de pruebas inmunológicas que permitan identificar si un animal ha estado en contacto con el agente o no. Las primeras pruebas que se intentaron desarrollar fueron las que detectan inmunidad celular por medio de una respuesta de hipersensibilidad tipo IV o tardía, la cual consiste en inyectar un antígeno en la piel del paciente sospechoso provocando una respuesta inflamatoria que inicia a las 12 o 24 horas, aumentando su intensidad a las 72 horas. Este tipo de pruebas se utiliza para la detección de tuberculosis ya

que la reacción de hipersensibilidad se encuentra mediada por linfocitos T. Cuando los macrófagos fagocitan la bacteria *Mycobacterium* sp., algunos antígenos del agente, como el derivado proteico purificado (PPD), estimulan una respuesta celular mediada por los linfocitos Th1 generando células T de memoria que responden a los antígenos cuando entran al cuerpo por cualquier ruta⁴¹.

Debido a que *C. pseudotuberculosis* es un agente intracelular facultativo, se estudió la posibilidad de obtener un antígeno capaz de estimular una respuesta de hipersensibilidad tardía. El primer antígeno desarrollado fue la Preisznocardina que consistía en un filtrado bacteriano obtenido a partir del cultivo *in-vitro* de la bacteria. Este antígeno se estudió y muchas veces se modificó el método para su obtención pero la especificidad no fue adecuada con resultados muy variables. En trabajos posteriores se obtuvieron antígenos denominados sensitina y linfadenina que provocaron una respuesta de hipersensibilidad más evidente y con mayor especificidad pero nunca se profundizó en su estudio, además las pruebas de desafío no evaluaron una cantidad de animales suficiente para considerar los resultados como significativos ya que se usaron 15 animales para evaluar a la sensitina y 26 para evaluar a la linfadenina³⁶.

Otro método para el diagnóstico basado en inmunidad celular es a través de la estimulación de la producción de interferón γ (IFN- γ) a partir de una muestra de sangre completa. La prueba consiste en obtener un antígeno específico que se agrega a la muestra de sangre completa para estimular a los linfocitos T circulantes que en caso de ser positivo producirán IFN- γ . Después de la estimulación se obtiene el plasma para realizar una prueba de ELISA tipo sandwich que detecta la presencia o no de IFN- γ ⁴¹. Para el caso de linfadenitis caseosa, se ha obtenido un antígeno a partir de la lisis física de la bacteria que se ha utilizado para desarrollar una prueba de IFN- γ . Como resultado la prueba posee una especificidad del 95.7% con la ventaja de ser capaz de distinguir entre animales infectados y vacunados ^{31, 42}, sin embargo se requiere una

profundización en el estudio de este método ya que la sensibilidad fue de tan solo 56%⁴³.

1.2.3 Pruebas de inmunidad humoral

El estudio de las primeras pruebas para detectar inmunidad humoral se enfocó en aprovechar los efectos in-vitro de la PLD y desafiarlos ante sueros problema con el objetivo de que los sueros positivos (ricos en anticuerpos anti-fosfolipasa D) inhiban éstos efectos a diferencia de los sueros negativos que no lo hacen. Una de las propiedades de la PLD es la inhibición de la hemólisis de *Staphylococcus* sp., a partir de esta acción se desarrollo la prueba Inhibición de la Beta-hemolisina (IBH) cuyos resultados fueron una sensibilidad de 92% y una especificidad del 96%. Actualmente no se utiliza como prueba de diagnóstico rutinaria pero se ha utilizado como herramienta para la investigación de nuevos métodos de diagnóstico³⁶.

Aprovechando la propiedad de hemólisis sinérgica con *Rhodococcus* sp., se desarrolló la prueba de Inhibición de la Hemólisis Sinérgica (IHS). Para esta prueba se preparaban discos con una mezcla del suero problema, buffer salino formalinado y PLD. También se preparaban cajas de Petri con agar sangre preparado con una mezcla de eritrocitos y toxina de *Rhodococcus equi*. En este medio de cultivo se colocaban los discos de modo que al colocar un disco impregnado con suero positivo la hemólisis sinérgica era inhibida mientras que al colocar un disco impregnado con suero negativo se formaba un halo de hemólisis sinérgica alrededor. El resultado fue que la prueba poseía una sensibilidad del 98%, sin embargo la prueba no poseía la especificidad suficiente ya que se obtuvo un 10% de falsos positivos³⁶.

Otras pruebas de inmunidad humoral consisten en la detección de complejos antígeno anticuerpo. Una prueba sencilla de realizar es la inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA) que se trata de una prueba de precipitación. La IDGA consiste en la preparación de un gel de agarosa que se perfora para formar pozos

adyacentes, a un pozo se le agrega el antígeno y al otro pozo se le agrega el suero problema. En caso de ser positivo se forma una línea de precipitación entre ambos pozos. De manera práctica se pueden formar rosetas que consisten de un pozo central en donde se coloca el antígeno y aproximadamente 6 pozos alrededor en donde se puede colocar un suero por pozo.⁴¹. Aunque esta prueba se ha desarrollado para el diagnóstico de linfadenitis caseosa, no existen reportes sobre su uso de manera rutinaria³⁶.



Figura 11. Prueba de IDGA.

Finalmente, las pruebas de inmunidad humoral que se han estudiado más ampliamente han sido las pruebas inmunoenzimáticas. Para su desarrollo se han estudiado diversos métodos para realizar el ensayo así como distintos métodos para la obtención de los antígenos utilizados.

1.2.4 Ensayos inmunoenzimáticos

Se clasifican dentro de las pruebas de unión primaria, las cuales consisten en permitir la unión antígeno-anticuerpo para posteriormente medir la cantidad de complejos inmunes formados con la ayuda de marcadores que pueden ser radioisótopos, tinciones fluorescentes, metales coloidales o enzimas. Los ensayos

inmunoenzimáticos utilizan una enzima como marcador, dentro de las pruebas más comunes en medicina veterinaria se encuentra el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)⁴¹.

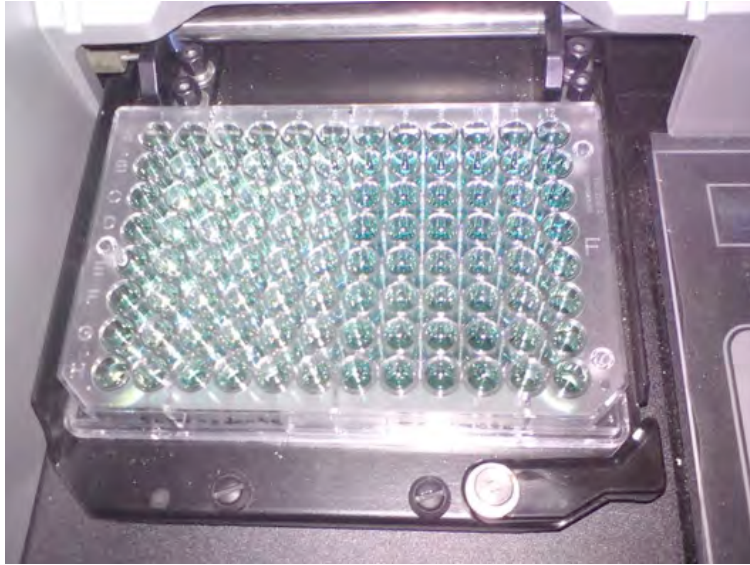


Figura 12. Microplaca de poliestireno para ELISA

La prueba de ELISA más comúnmente utilizada es la ELISA indirecta. Esta prueba se realiza en una microplaca de poliestireno (Figura 12) sensibilizada con un antígeno. Para sensibilizar una placa, los pozos se cubren con una solución de antígeno que se deja incubar para que las proteínas de esta solución queden firmemente unidas al poliestireno formando una capa de antígeno, se realiza un lavado para eliminar los antígenos no adheridos, finalmente la placa se puede guardar o utilizar de inmediato ⁴¹.

El procedimiento para correr una prueba de ELISA consiste en agregar el suero problema, después de una incubación se realiza un lavado para eliminar los anticuerpos no unidos y se agrega una antiglobulina (anti IgG ovino, anti IgG bovino, anti IgG equino, etc) marcada con una enzima (peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o ureasa). Se incuba nuevamente y se

realiza otro lavado para eliminar las antiglobulinas no adheridas, posteriormente se agrega el sustrato de la enzima correspondiente (Cuadro 2), se incuba y se detiene la reacción. Finalmente se mide la densidad óptica (OD) con ayuda de un espectrofotómetro^{41, 44}.

Cuadro 2. Enzimas y sustratos más utilizados para las pruebas de ELISA ⁴⁴.		
Enzima	Sustrato	Solución de frenado
Peroxidasa de rábano picante (HRPO)	Orto-Fenilenediamina (OPD)	Ácido clorhídrico o ácido sulfúrico
	Ácido 2,2'-Azino Diethylbenzothiazolina Sulfónico (ABTS)	Sodio duodecil sulfato (SDS)
	Ácido 5-Aminosalicílico (5-AS)	Ácido clorhídrico o ácido sulfúrico
	Tetrametil Benzidina (TMB)	Ácido clorhídrico o ácido sulfúrico
Fosfatasa alcalina (AP)	Para-nitro fenilfosfato (pnpp)	Carbonato de sodio
β -galactosidasa	orto-nitrofenil β -galactosidasa (ONB)	Carbonato de sodio
Ureasa	Purpura de bromocresol	Thimerosal

El ELISA tipo sandwich es una modificación del ELISA indirecto que consiste en cubrir la placa con un anticuerpo específico, posteriormente se agrega una solución con antígeno, de modo que únicamente se adherirá un antígeno específico reconocido por el anticuerpo previamente adherido. El siguiente paso consiste en agregar el suero problema, la antiglobulina, el sustrato y la solución de frenado de la misma manera que en ELISA indirecto. La ventaja de esta prueba radica en que al utilizar un anticuerpo específico, solo un antígeno se adhiere a la placa aumentando la especificidad de la prueba^{41, 44}.

1.2.5 Antecedentes sobre la prueba de ELISA para detectar linfadenitis caseosa

Con el fin de obtener una prueba de ELISA estandarizada y fácil de usar, se han estudiado diferentes métodos para la obtención de antígenos que otorguen una adecuada sensibilidad y especificidad a la prueba. Principalmente se ha estudiado el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta utilizando 3 tipos de antígenos: componentes obtenidos por lisis bacteriana, productos solubles del metabolismo bacteriano y fosfolipasa D recombinante. También se ha estudiado el desarrollo de una prueba de ELISA tipo sandwich utilizando también como antígeno los productos solubles de metabolismo bacteriano.

Dentro de los métodos para obtener los componentes resultantes de la lisis bacteriana, se han reportado un método químico y un método físico. El método químico consiste en el cultivo de *C. pseudotuberculosis* para obtener un concentrado celular que después de resuspenderse en un buffer de antígeno compuesto por SDS (detergente), tris (amortiguador de pH) y β -mercaptoetanol (desnaturaliza las proteínas), se hierva para obtener un extracto de componentes bacterianos de membrana y pared celular. Como resultado se reporta la obtención de una prueba de ELISA indirecta con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 96%¹⁷.

Como método físico para la lisis celular se reporta el uso de la sonicación. En 2 trabajos realizados por Binns, 2003, se aisló una cepa de *C. pseudotuberculosis* a partir de una oveja infectada. La cepa se cultivó para obtener un concentrado bacteriano que fue sonificado y utilizado como antígeno para un ELISA indirecto obteniendo una sensibilidad del 83% y una especificidad del 64%^{45, 46}. En un trabajo más reciente con una metodología basada en sonicación pero utilizando una cepa distinta (cepa 15 tipificada por pruebas bioquímicas, PCR y secuenciación del gen 16S rDNA con un 99% de homología con cepas de referencia) y una modificación en las condiciones tanto en el cultivo de la bacteria

como en las constantes de sonicación, se desarrolló un ELISA indirecto con una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%⁴⁷.

El uso de los productos del metabolismo de *C. pseudotuberculosis* solubles en el medio de cultivo líquido como antígeno para la prueba de ELISA indirecto, se ha extendido debido a que una de las proteínas formadas es la exotoxina PLD¹⁸. El procedimiento consiste en general en el cultivo en infusión cerebro corazón por 48 a 72 horas, se centrifuga y se obtiene el sobrenadante que contiene la exotoxina y otros productos del metabolismo. En Brasil, Carminati, 2003 obtuvo un sobrenadante crudo cultivando una cepa de campo por 48hrs y lo utilizó para estandarizar una prueba de ELISA indirecto utilizando OPD como sustrato. Como resultado obtuvo sensibilidad del 93.5% y una especificidad del 100% ⁴⁸. En otro trabajo, Seyffert, 2010 utilizó el procedimiento de Carminati, 2003 modificado utilizando TMB como sustrato, obteniendo una sensibilidad de 93.5% y una especificidad de 98.5%²⁸. En Venezuela, Chirino-Zárraga, 2009 cultivó una cepa de campo por 72hrs para obtener el sobrenadante y como sustrato utilizó ABTS obteniendo una sensibilidad de 72.73% y una especificidad de 67.74%¹⁸.

El sobrenadante crudo también ha sido utilizado para obtener sueros hiperinmunes que fueron utilizados para desarrollar una prueba de ELISA tipo sandwich de doble anticuerpo^{49, 50} obteniendo una sensibilidad del 100% y especificidad del 99%. La prueba fue desarrollada por Ter Laak, 1992 quienes sustentan sus resultados en los datos obtenidos tras un programa de erradicación establecido en Holanda utilizando como herramienta diagnóstica oficial la prueba que ellos mismos desarrollaron, en total se reportó el diagnóstico de 38175 carneros para el cálculo de la sensibilidad y especificidad^{36, 49}.

Finalmente las pruebas más actuales de diagnóstico serológico fueron desarrolladas utilizando una PLD recombinante como antígeno para un ELISA indirecto. En un estudio realizado por Songer, 1990 explica una metodología para obtener una PLD recombinante a partir de un mutante de *E. coli*⁵¹. Posteriormente,

por medio de esta metodología, Menzies, 1994 utilizó la PLD recombinante para desarrollar y estandarizar una prueba de ELISA indirecto obteniendo una sensibilidad de 86.3% y una especificidad de 82.1%⁵². Actualmente existe un kit comercial de ELISA para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa disponible en Europa llamada ELITEST CLA (HYPHEN BioMed, France). La prueba consiste en un ELISA indirecto que utiliza como antígeno una PLD recombinante y como sustrato TMB, su sensibilidad es de 84% y su especificidad es de 96.7%⁵³.

2 Justificación

La importancia de la enfermedad radica en las pérdidas económicas que ocasiona para el productor, ya que los animales pierden peso de manera crónica y la mayoría no presenta signos clínicos que nos indiquen la causa.

Debido a que actualmente no existen estudios epidemiológicos que nos indiquen la prevalencia de linfadenitis caseosa en la República Mexicana, además de que no es una enfermedad de reporte obligatorio, se desconoce el impacto real que ha tenido sobre la producción ovina y caprina en el país. Se conoce que a nivel global la prevalencia se encuentra entre el 50 y 60% con reportes de hasta el 90%, por lo tanto es una enfermedad que requiere pronta atención.

Generalmente el diagnóstico se hace en base a signos clínicos, sin embargo se reporta que cerca del 90% de los casos de linfadenitis caseosa no presentan signos clínicos, por lo tanto se necesita de una herramienta para el diagnóstico de estos casos.

En Europa existen “kits” de diagnóstico serológico comerciales efectivos, además de laboratorios de investigación trabajando actualmente en mejorar las técnicas actuales de diagnóstico. En México no existe un kit comercial disponible para el diagnóstico serológico de linfadenitis caseosa, por lo tanto es necesario profundizar en este campo de investigación para permitir su disponibilidad en un futuro cercano.

Con el desarrollo de pruebas serológicas que permitan el diagnóstico de los casos que no presenten signos clínicos, se podrá profundizar en el estudio epidemiológico de la enfermedad para comprender la problemática ante la que se encuentra la producción ovina y caprina. Además permitirá a los médicos

veterinarios responsables de unidades de producción ovina y caprina establecer medidas de control de la enfermedad.

En el campo de la investigación, una prueba de diagnóstico serológico eficaz permitirá profundizar en el estudio de patogenia de la enfermedad para poder entender mejor los mecanismos por los que *C. pseudotuberculosis* causa la enfermedad.

Finalmente en México no existe un biológico que permita la profilaxis de la enfermedad, por lo tanto una prueba serológica se puede utilizar como herramienta para el desarrollo de un biológico efectivo que disminuya la incidencia de la enfermedad en trabajos futuros.

3 Hipótesis

Si se utiliza como antígeno un sobrenadante rico en exotoxina, se obtendrá una prueba con mayor especificidad, mientras que si se utiliza un extracto de proteínas de pared celular se obtendrá una prueba con mayor sensibilidad. De este modo, se obtendrán dos pruebas serológicas con las que será posible detectar animales enfermos, incluyendo aquellos que cursen con la presentación visceral de la enfermedad.

4 Objetivos

Objetivo general

Desarrollar y evaluar dos pruebas serológicas para el diagnóstico de linfadenitis caseosa en ovinos.

Objetivos particulares

Aislar una cepa de campo de *C. pseudotuberculosis* y utilizarla como fuente de antígeno junto con la cepa de referencia *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* No. 43924 de American Type Culture Collection (ATCC).

Obtener un antígeno a base de proteínas de pared y membrana celular de *C. pseudotuberculosis* utilizando 2 métodos de extracción distintos. Obtener un sobrenadante rico en exotoxina PLD que sirva como antígeno para desarrollar una prueba inmunológica.

Utilizar las pruebas obtenidas como herramienta complementaria para emitir un diagnóstico final y estimar la prevalencia de linfadenitis caseosa en una unidad de producción ovina para facilitar el programa de control de la enfermedad establecido por el médico veterinario responsable.

5 Materiales y métodos

5.1 Preparación de los antígenos

La primera etapa del trabajo consistió en el aislamiento e identificación de una cepa de campo de *C. pseudotuberculosis* que se pudiera utilizar como posible fuente para la obtención de antígeno.

5.1.1 Aislamiento e identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

En una unidad de producción ovina ubicada en el Estado de Tlaxcala, se realizó el tratamiento de un caso de linfadenitis caseosa cutánea en un carnero que presentaba un absceso en un linfonodo submandibular. Por medio de una incisión, se eliminó el exudado caseoso siguiendo las recomendaciones higiénicas que menciona Smith, 1994³. Utilizando un hisopo se tomó una muestra de material caseoso y una muestra de las paredes de la cápsula del absceso posterior al drenado quirúrgico y previo al procedimiento antiséptico^{1, 3}. Las muestras se enviaron al Laboratorio de Diagnóstico del CENID-Microbiología Animal, INIFAP en tubos con medio de transporte para su procesamiento.

Las muestras se sembraron en medio agar sangre con 5% de sangre de ovino y se dejaron incubar por 48 horas a 37 °C. Se seleccionaron las colonias con la morfología característica de *C. pseudotuberculosis* para el aislamiento¹⁴. Una vez que se obtuvo un cultivo uniforme de estas colonias, se realizó la tinción de Gram y de Ziehl-Neelsen³⁰ para la observación microscópica junto con las siguientes pruebas bioquímicas para confirmar la identidad de *C. pseudotuberculosis*: Fermentación de glucosa y maltosa; hidrólisis de urea, reducción de nitratos y catalasa^{12, 13, 18}.

Una vez caracterizada, la cepa aislada se identificó como “Robus” (misma identificación del carnero infectado) y se almacenó en un criovial con medio de

cultivo para crioconservación (30% BHI, 30% suero de ternera, 30% glicerol), el cual se conserva sumergido en nitrógeno líquido en el Laboratorio de Diagnóstico.

Adicionalmente se utilizó la cepa de referencia *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* No. 43924 de la “American Type Culture Collection” (ATCC), Atlanta, Estados Unidos; gentilmente donada por el laboratorio de Microbiología de la FES-Cuautitlán, UNAM. La cepa se cultivó en medio agar sangre para su posterior crioconservación. La metodología de congelación, fue la misma que se utilizó para la cepa Robus.

Ambas cepas se utilizaron para probar 3 metodologías de obtención de antígeno. Los métodos consisten en la obtención de un sobrenadante crudo del cultivo en medio líquido de *C. pseudotuberculosis* rico en PLD, una extracción proteica de pared celular por desnaturalización química más calor y una extracción proteica realizada únicamente con calor^{17, 18}.

5.1.2 Obtención de sobrenadante rico en fosfolipasa D (PLDS)

De manera inicial se cultivaron ambas cepas de *C. pseudotuberculosis* en medio agar sangre a 37 °C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas con la finalidad de utilizar células frescas.

Las colonias obtenidas de ambas cepas se transfirieron a 50ml de medio PPLO (Pleuropneumoniae like organisms) y se incubaron a 37 °C en agitación bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas. Se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonias (CFU) por mililitro y se transfirieron 1×10^6 colonias a 400 ml de medio PPLO. Se dejó incubar a 37 °C en agitación bajo atmósfera de oxígeno por 72 horas^{16, 17, 18, 56}.

Se determinó la cantidad de CFU/ml del cultivo obtenido, el cual se centrifugó a 4000 x g durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante que fue almacenado en congelación a -20°C¹⁸.

Para determinar la presencia de alguna proteína soluble en el medio capaz de distinguir entre sueros positivos y negativos a infección por *C. pseudotuberculosis* se corrió la prueba de Western Blot utilizando un suero control positivo identificado como 101 EA (Obtenido de una oveja con absceso y aislamiento positivo a *C. pseudotuberculosis* procedente de la UPO “Chalma”) y un suero control negativo identificado como “110’s son” (Obtenido de un cordero de 2 meses de edad procedente de la UPO “El terrero”, sin antecedentes de CLA) junto con un marcador de peso molecular^{52, 56}. La concentración de proteínas se determinó por medio de la técnica de Bradford^{55, 57}.

Para comprobar que la proteína obtenida en el sobrenadante crudo se trataba de la PLD, primero se calculó el peso molecular de las proteínas obtenidas por medio del Western Blot. Posteriormente se corrió una prueba de CAMP modificada utilizando solamente el sobrenadante crudo esterilizado por filtración con un filtro con poro de 22µm de diámetro. El procedimiento de esta prueba consistió en realizar el cultivo de la bacteria *Staphylococcus aureus* en presencia del sobrenadante para comprobar la inhibición de hemólisis. De manera comparativa se colocó una cepa de campo de *C. pseudotuberculosis* (control positivo), un cultivo de exudado purulento negativo a *C. pseudotuberculosis* (control negativo), y la cepa 43924 (control positivo) como referencia para comprobar si existió o no inhibición de la hemólisis^{12, 13, 22}.

5.1.3 Obtención de extracto proteico de pared celular por desnaturalización química más calor (DCPE)

De manera inicial se cultivaron ambas cepas de *C. pseudotuberculosis* en medio agar sangre a 37 °C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas con la finalidad de utilizar células frescas.

Las colonias obtenidas de ambas cepas se transfirieron a 20 cajas de Petri con el medio agar PPLO utilizando la técnica de estría cerrada cubriendo la caja en su

totalidad para obtener la mayor cantidad de células posibles. Las cajas se incubaron a 37 °C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas.

Las colonias obtenidas se cosecharon en su totalidad y se resuspendieron en 5 ml de PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos; 150 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 9 mM Na₂HPO₄ × 12H₂O, 2.5 mM KCl, pH 7.2). La solución se centrifugó a 13800 x g y se descartó el sobrenadante. El proceso se repitió 3 veces para realizar lavados¹⁷.

El sedimento obtenido después de los lavados se resupendió en 5ml de solución amortiguadora de preparación de antígeno (0.5 M Tris pH 6.8; 5.2% SDS; 8.7% 2-mercaptoetanol) y se hirvió a 100 °C durante 5 minutos. La solución se centrifugó a 13800 x g y el sobrenadante se utilizó como antígeno proteico de pared celular extraído por desnaturalización química más calor (DCPE), esta solución se almacenó en congelación a -20 °C¹⁷.

Para determinar la presencia de alguna proteína capaz de distinguir entre sueros positivos y negativos a infección por *C. pseudotuberculosis* se corrió la prueba de Western Blot utilizando los mismos sueros control positivo y negativo que con el antígeno anterior junto con un marcador de peso molecular. La concentración de proteínas se determinó por medio de la técnica de Bradford^{55, 57}.

5.1.4 Obtención de extracto proteico de pared celular por calor (BCPE)

De manera inicial se cultivaron ambas cepas de *C. pseudotuberculosis* en medio agar sangre a 37 °C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas con la finalidad de utilizar células frescas.

Las colonias obtenidas de ambas cepas se transfirieron a 20 cajas de Petri con el medio agar PPLO utilizando la técnica de estría cerrada cubriendo la caja en su totalidad para obtener la mayor cantidad de células posibles. Las cajas se incubaron a 37 °C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas⁵⁴.

Las colonias obtenidas se cosecharon en su totalidad y se resuspendieron en PBS. La solución se centrifugó a 13800 x g y se descartó el sobrenadante. El proceso se repitió 3 veces para realizar lavados. El sedimento final se resuspendió en PBS y se hirvió a 100 °C durante 5 minutos. La solución se centrifugó y el sobrenadante se utilizó como antígeno proteico de pared celular extraído por calor (BCPE), el cual se almacenó en congelación a -20 °C⁵⁴.

Para determinar la presencia de alguna proteína capaz de distinguir entre sueros positivos y negativos a infección por *C. pseudotuberculosis* se corrió la prueba de Western Blot utilizando los mismos sueros control positivo y negativo que en los antígenos anteriores junto con un marcador de peso molecular.

5.2 Obtención de sueros de ovinos sanos, sospechosos y clínicamente enfermos

Se tomaron 210 muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención de suero por medio de punción de la vena yugular en 6 unidades de producción ovina (UPO) de acuerdo a los antecedentes de linfadenitis caseosa como lo muestra el Cuadro 3. Las muestras se centrifugaron a 3000 x g por 5 minutos, los sueros se alicuotaron y se almacenaron en congelación a -20 °C.

El primer criterio para la selección de las UPO en donde se realizó el muestreo consistió en seleccionar unidades con incidencia elevada de linfadenitis caseosa para obtener sueros de animales que cursaran con la enfermedad, animales que la hayan cursado anteriormente y animales sanos en contacto con animales enfermos. Los primeros dos grupos fueron considerados como sueros control positivo, mientras que el tercer grupo fue considerado como grupo de sueros sospechosos. En total se muestrearon cuatro UPO con estas características (debido que las primeras dos unidades no cuentan con un nombre, la identificación se realizó de acuerdo a su ubicación), las cuales se identificaron como: Tlaxcala,

Huamantla, CDO y Quinta Mejor. En estas unidades se realizó el muestreo de todos los animales con antecedentes de linfadenitis caseosa más un 10% de la población total que nunca habían presentado signos clínicos de la enfermedad pero que estuvieron en contacto con animales enfermos.

El segundo criterio para la selección fue el de una UPO sin antecedentes clínicos de la enfermedad. Se encontró una unidad con estas características en el Estado de Hidalgo, identificada como “El Terrero”, de la cual se realizó el muestreo del 50% de la población total.

En la UPO identificada como Chalma se realizó el muestreo del total de la población con el objetivo de aplicar las pruebas serológicas desarrolladas para poder estimar la prevalencia.

Cuadro 3. Número de muestras tomadas por unidad de producción ovina.							
UPO	Antecedentes	Número de muestras					Observaciones
		ED	EA	S	L	Total	
Tlaxcala	Incidencia elevada de CLA	7	4	37	0	48	
Huamantla	Incidencia elevada de CLA	0	4	9	0	13	
CDO	Incidencia elevada de CLA	2	3	3	0	8	
Quinta Mejor	Incidencia moderada de CLA	11	0	8	0	19	
“El Terrero”	Sin antecedentes de CLA	0	0	0	17	17	Fuente de sueros control negativos
Chalma	Baja incidencia de CLA	6	1	98	0	105	Aplicación de las pruebas en un programa de control.
Total		26	12	155	17	210	

UPO=Unidades de producción ovina, ED=Enfermo debridado (natural o tratamiento), EA=Enfermo con absceso, S=Sano en contacto con enfermos, L=Libre sin antecedentes.

5.3 Diseño de las pruebas de ELISA e Inmunodifusión en gel

El objetivo de esta etapa del trabajo fue la estandarización de las pruebas que se evaluaron para determinar la cantidad de antígeno y suero necesarias para obtener una adecuada sensibilidad y especificidad. El resultado de las pruebas de Western blot que se corrieron para los 3 antígenos se utilizó como criterio para decidir el antígeno ideal para cada prueba.

El antígeno PLDS se utilizó para estandarizar la prueba de ELISA debido a que en el resultado de Western Blot se identificó solo la presencia de 2 proteínas incluyendo una proteína compatible con PLD. El resultado del Western Blot con el antígeno DCPE demostró la presencia de 10 proteínas reconocidas por un suero control positivo. Al correrse la prueba de Western Blot con el antígeno BCPE no se reconoció ninguna proteína con el suero control positivo, por lo que no se utilizó para ninguna de las 2 pruebas.

Con el fin de obtener una prueba de ELISA más específica se utilizó como antígeno el PLDS que solo contiene 2 proteínas a diferencia del DCPE que al contener 10 proteínas otorga menor especificidad y mayor sensibilidad. Por otra parte el antígeno DCPE se utilizó para su evaluación en la prueba de IDGA.

5.3.1 Diseño de la prueba de ELISA

Para determinar la concentración de antígeno y suero necesaria para desarrollar la prueba se utilizó el método de estandarización conocido como “Chessboard titrations” (CBT) o método del tablero de ajedrez ^{44, 58}.

Se sensibilizó una microplaca de poliestireno (96F without LID SH microwell plate Nunc BATCH 049004) con el antígeno PLDS colocando la solución concentrada (1.12mg/mL) en la fila A y realizando diluciones dobles por filas utilizando buffer de carbonatos (5.3% Na₂CO₃, pH 9.6) como diluyente.

Posteriormente se corrió la prueba de ELISA utilizando un suero control positivo y un suero control negativo a distintas diluciones, utilizando buffer de carbonatos como diluyente, comenzando por la dilución 1:10 y continuando con diluciones dobles distribuidas por columnas en la microplaca (Figura 13) ^{44, 58}.

Como antiglobulina se utilizó la antiglobulina G ovina (Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit AntiSheep IgG (H+L) code: 313-035-003) a una dilución de 1:2000 y como sustrato se utilizó Orto-Fenilenediamina (OPD) (Sigmafast OPD cat. No. P9187-50SET).

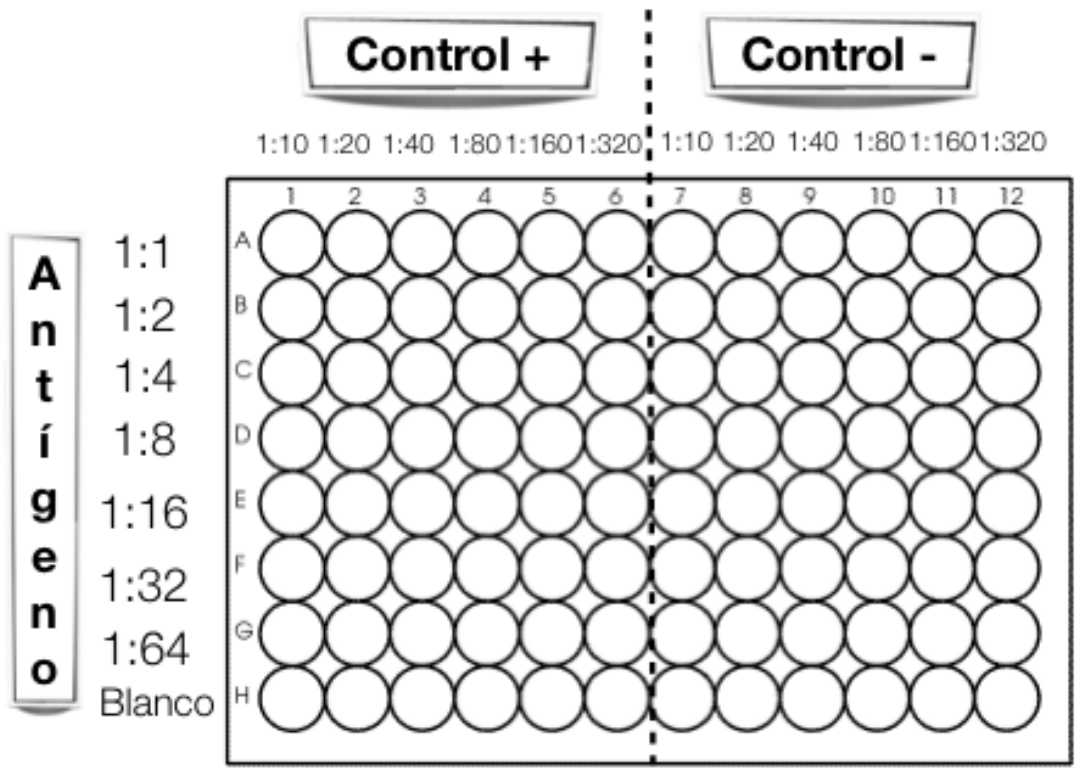


Figura 13. Diseño de la estandarización de la prueba de ELISA.

La lectura se realizó con un filtro de 450 nm y se obtuvo la dilución adecuada del suero y el antígeno de acuerdo al criterio del método CBT en el que se busca obtener una lectura de densidad óptica alta a partir de que se empieza a ver un

efecto de dilución sin considerar lecturas muy elevadas. De igual manera se desea utilizar la mayor cantidad de antígeno con la menor concentración de suero ⁴⁴.

Una vez encontradas ambas diluciones, se sensibilizaron 3 microplacas con la dilución del antígeno obtenida y se corrió la prueba de ELISA utilizando todos los sueros de los muestreos realizados (Cuadro 3) diluyéndolos de acuerdo a los resultados de la estandarización.

Se calcularon 2 puntos de corte. El primer punto de corte se determinó calculando la media aritmética del resultado expresado en porcentaje de los sueros control positivo menos una desviación estándar. El segundo punto de corte se determinó calculando la media aritmética del resultado de los sueros control negativos más una desviación estándar. La metodología para determinar los puntos de corte y como se utilizan para determinar sueros con resultado positivo y negativo se explicarán más adelante en las secciones de resultados y discusión ^{44, 58}.

5.3.2 Diseño de la prueba de IDGA

Para realizar la estandarización de esta prueba, en una caja de Petri se preparó un gel de agarosa (10% NaCl, 0.9% agarosa, 0.1% azida de sodio, 5% buffer de boratos) que se perforó formando 7 rosetas con 6 pozos cada una. En el pozo central de cada roseta se colocaron 30 μ l del antígeno DCPE a distinta concentración como se muestra en el Cuadro 4 y en la Figura 14⁵⁴.

Se buscó una dilución del antígeno en la que se observara claramente una precipitación de complejos antígeno-anticuerpo entre el pozo que contiene el antígeno y el pozo con el suero control positivo.

Después de obtenerse la concentración adecuada, el antígeno se utilizó diluido para correr la prueba de IDGA utilizando todos los sueros obtenidos de los muestreos realizados.

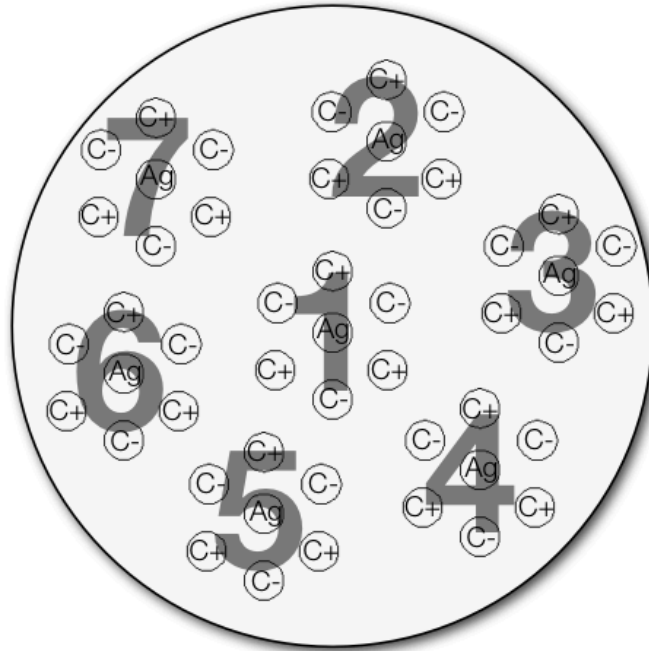


Figura 14. Distribución de las rosetas.

Cuadro 4. Distribución de antígeno y sueros.	
No. Roseta	Dilución del antígeno
1	1:1
2	1:2
3	1:4
4	1:8
5	1:16
6	1:32
7	1:64

5.3.3 Análisis estadístico

Para las pruebas estadísticas de validación y eficacia se utilizaron los sueros con antecedentes clínicos de la enfermedad, ya sea EA o ED de cualquier UPO, como controles positivo y los sueros de la UPO “El Terrero” como controles negativos. Para determinar los parámetros de la prueba de ELISA, no se contemplaron los sueros clasificados como sospechosos. En el Cuadro 5 se muestra el criterio

utilizado para clasificar un suero como verdadero positivo (VP), verdadero negativo (VN), falso positivo (FP) o falso negativo (FN)¹⁸.

Cuadro 5. Criterio para clasificación de resultados.			
		Diagnóstico clínico	
		Positivo	Negativo
Resultado de la prueba evaluada	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

La validez de las pruebas se determinó por la prueba de índice de concordancia kappa (κ) para determinar el grado de acuerdo entre los resultados de la prueba serológica evaluada y los antecedentes clínicos del animal^{17, 59}.

Se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba así como el porcentaje de eficacia que corresponde al porcentaje de individuos correctamente clasificados como positivos o negativos⁴⁴.

5.4 Aplicación de las pruebas serológicas para emitir un diagnóstico final

5.4.1 Evaluación serológica de animales con estatus sanitario indeterminado para linfadenitis caseosa

Con los resultados de eficacia se eligió la mejor prueba serológica y se utilizó para diagnosticar a los animales clínicamente sanos de las 6 UPO que clínicamente se habían clasificado como sospechosos. Los resultados se utilizaron para estimar el porcentaje de animales seropositivos no diagnosticados clínicamente por UPO.

Por último, los sueros se clasificaron por el diagnóstico final de acuerdo al criterio mostrado en el Cuadro 6¹⁸.

Cuadro 6. Interpretación de los resultados para el diagnóstico de linfadenitis caseosa.		
Diagnóstico clínico	Serología	Diagnóstico final
+	+	Positivo
+	-	Positivo
+	Sospechoso	Positivo
-	+	Sospechoso
-	-	Negativo
-	Sospechoso	Negativo
Sospechoso	+	Positivo
Sospechoso	-	Negativo
Sospechoso	Sospechoso	Sospechoso

5.4.2 Aplicación del diagnóstico serológico para la estimación de la prevalencia en una unidad de producción ovina (UPO)

En la UPO identificada como Chalma, se realizó el muestreo del total de la población ovina con el fin de obtener una estimación de la prevalencia de linfadenitis caseosa como parte de un programa de control establecido por el médico veterinario responsable.

Los resultados para obtener el diagnóstico final fueron interpretados como se muestra en el Cuadro 6. La prevalencia se estimó calculando el porcentaje de animales con diagnóstico final positivo que se encuentran en la UPO⁴⁴.

6 Resultados

6.1 Obtención de los antígenos

6.1.1 Aislamiento e identificación de la cepa de campo “Robus” de *C. pseudotuberculosis*

Como resultado del cultivo en agar sangre a partir del absceso, se obtuvieron colonias circulares de aproximadamente 2 mm de diámetro, blancas, secas, opacas con una pequeña zona de β -hemólisis a las 24 horas de crecimiento que aumentó a las 48 horas. Al momento de tomar las colonias obtenidas con el asa bacteriológica, estas se deslizaban por el agar.

Microscópicamente se observaron bacterias gram positivas, sin una morfología uniforme ya que en algunos campos del frotis se observaron como cocos y en otros campos como bastones agrupados en empalizada. Con la tinción de Ziehl-Neelsen no se observaron bacterias ácido alcohol resistentes.

Los resultados de la identificación por pruebas bioquímicas se resumen en el siguiente Cuadro:

Cuadro 7. Resultados de la identificación bioquímica.	
Prueba	Resultado
Fermentación de glucosa	+
Fermentación de maltosa	+
Hidrólisis de urea	+
Reducción de nitratos	+
Catalasa	+
Motilidad	-

6.1.2 Características del sobrenadante rico en fosfolipasa D (PLDS)

Se obtuvo un cultivo de 400 ml por cada cepa. El cultivo de la cepa 43924 tenía una concentración de 1.84×10^9 CFU/ml mientras que el cultivo de la cepa Robus se encontraba compuesto por 7×10^9 CFU/ml.

Como resultado del Western Blot, en el sobrenadante obtenido del cultivo de la cepa 43924 se detectó la presencia de 2 proteínas utilizando el suero control positivo, mientras que al utilizar el suero control negativo no se encontró ninguna. Una de ellas posee un peso molecular de 93.5 kDa mientras que la otra proteína pesa 31.1 kDa.

En el sobrenadante del cultivo de la cepa Robus solo se encontró la proteína de 93.5 kDa. Debido a que la PLD tiene un peso molecular de 31 kDa, se decidió utilizar solo el sobrenadante de la cepa 43924 como PLDS. La concentración proteica calculada por el método de Bradford fue de 1.12mg/mL.

El resultado de la prueba de CAMP modificada para comprobar la capacidad del antígeno para inhibir la hemólisis de *Staphylococcus aureus* por si mismo sin la presencia de la bacteria fue positivo (Figura 15).

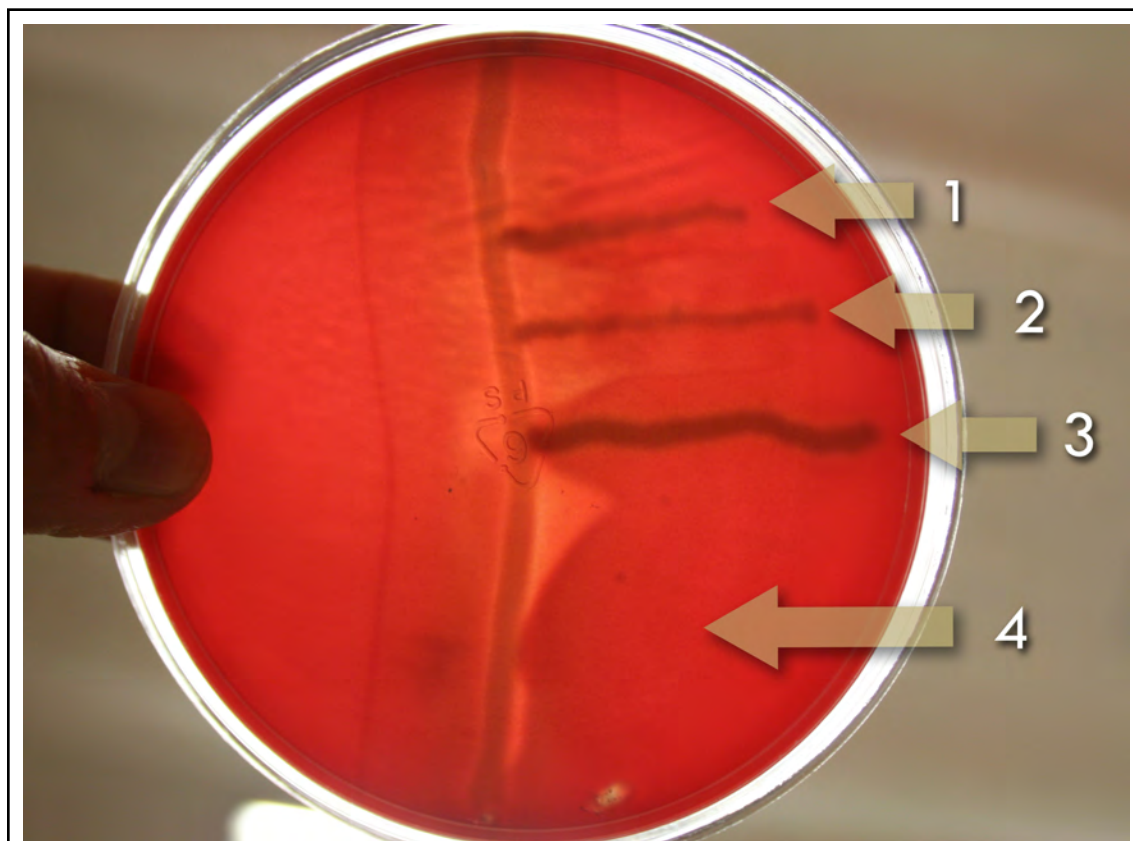


Figura 15. Prueba de CAMP modificada

(1) Cepa de campo de *C. pseudotuberculosis* (Control +), (2) Aislamiento de exudado purulento negativo a *C. pseudotuberculosis* (Control -), (3) Cepa 43924 (Control +), (4) PLDS

6.1.3 Características del antígeno extracto proteico de pared celular por desnaturalización química más calor (DCPE)

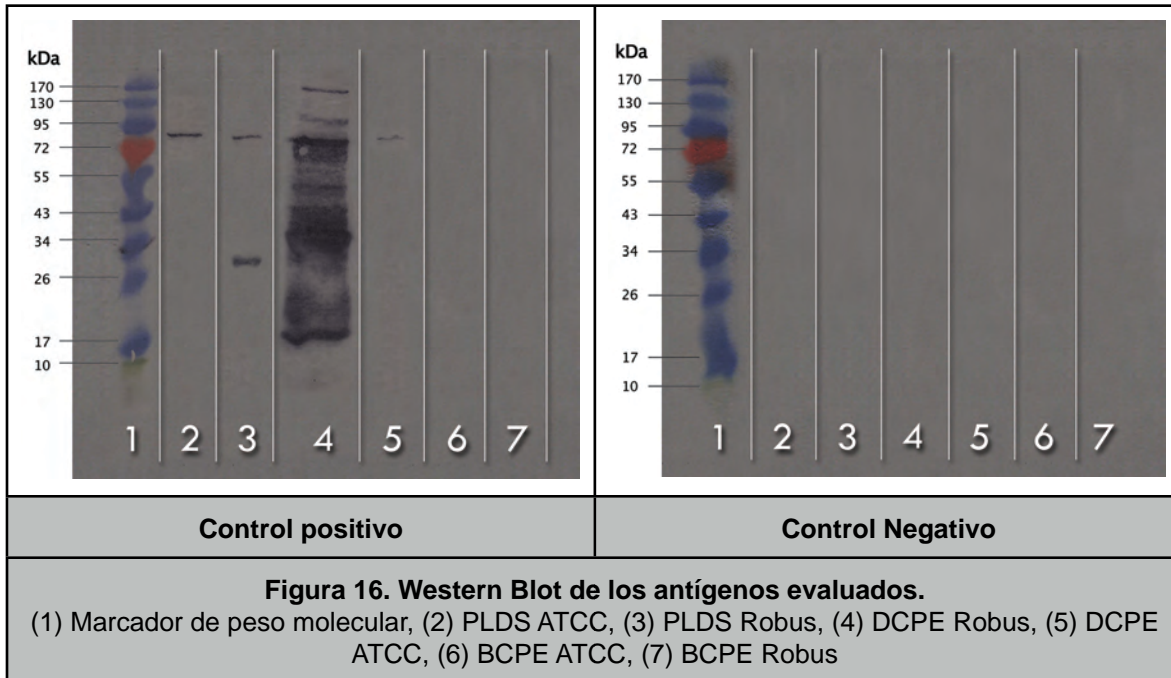
El resultado del Western Blot demostró la presencia de 10 proteínas reconocidas por un suero control positivo, sin ser reconocidas por el suero control negativo. El peso molecular de las proteínas se muestra en el Cuadro 8. Estas proteínas solo se encontraron en el extracto obtenido de la cepa Robus, en el caso del extracto de la cepa 43924 solo se encontró una proteína de 93.5 kDa.

Se obtuvieron 5 ml de la solución DCPE con una concentración proteica de 16.36 mg/ml calculada por el método de Bradford.

Cuadro 8. Composición proteica de DCPE	
No. de proteína	Peso molecular (kDa)
1	126.98
2	93.50
3	77.81
4	68.84
5	60.91
6	50.69
7	42.19
8	31.06
9	16.84
10	11.66

6.1.4 Características del antígeno extracto proteico de pared celular por calor (BCPE)

No se obtuvieron proteínas reconocidas en el Western Blot con ninguno de los sueros control, por lo tanto la solución no se utilizó como antígeno.



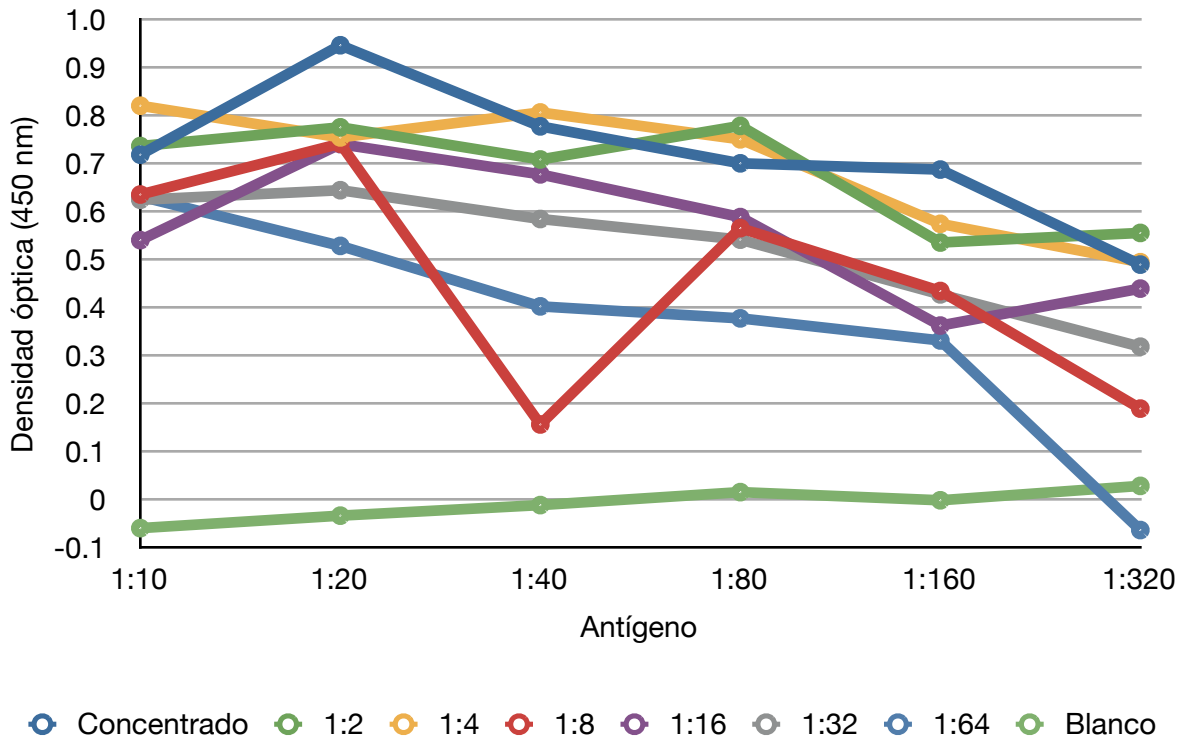
6.2 Diseño de las pruebas

6.2.1 Prueba de ELISA

En el Cuadro 9 y en la Gráfica 1 se muestran los resultados de la lectura de la densidad óptica para la estandarización de la prueba restando el control negativo del control positivo en cada dilución para evidenciar la diferencia detectada por la prueba. Los valores elegidos fueron la utilización del antígeno concentrado (0.11 µg/pozo) y la dilución del suero 1:80.

Cuadro 9. Diferencia entre control negativo y positivo por dilución						
Diluciones del antígeno	Diluciones de los sueros					
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
1:1	0.718	0.946	0.777	0.7	0.687	0.489
1:2	0.736	0.775	0.708	0.778	0.535	0.555
1:4	0.82	0.754	0.806	0.75	0.574	0.494
1:8	0.635	0.741	0.156	0.565	0.434	0.189
1:16	0.54	0.74	0.677	0.588	0.362	0.439
1:32	0.624	0.644	0.584	0.541	0.427	0.318
1:64	0.631	0.528	0.402	0.377	0.331	-0.064
Blanco	-0.06	-0.034	-0.012	0.015	-0.002	0.028

Gráfica 1. Titulación de antígeno y suero



Para realizar el análisis de resultados, los datos de densidad óptica obtenidos del lector de ELISA con un filtro de 450 nm, se expresaron en porcentaje por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Resultado} = \frac{\text{DO muestra} - \text{DO lectura menor}}{\text{DO lectura mayor} - \text{DO lectura menor}}$$

Por medio de esta fórmula es posible estudiar con los resultados como proporción, de modo que todos los datos se puedan analizar en una tabla de frecuencias y el resultado final se pueda aplicar para cualquier caso.

Se determinaron 2 puntos de corte para clasificar los sueros como negativos, sospechosos y positivos. El primer punto de corte fue de 19.921%, éste se determinó a partir del promedio del resultado de los sueros control positivo menos una desviación estándar. El segundo punto de corte fue de 30.237%, éste se

obtuvo calculando el promedio del resultado de los sueros control negativos más una desviación estándar. En el Cuadro 10 se muestran el promedio de los sueros control negativo y desviación estándar que se utilizaron para el cálculo del punto de corte.

Cuadro 10. Cálculo del punto de corte				
Diagnóstico clínico	Número de muestras	Promedio densidad óptica	Promedio (%)	Desviación estándar
Positivos	38	0.2975	39.4828	19.5617
Negativos	17	0.1520	20.0362	10.2006

El índice de concordancia fue de $\kappa=0.57$ que se interpreta como concordancia moderada. De un total de 42 sueros utilizados para estandarizar la prueba, se obtuvieron 24 verdaderos positivos, 10 verdaderos negativos y 8 resultados incorrectos (Cuadro 11). La sensibilidad de la prueba fue de 85.71% y la especificidad fue de 71.43%. La eficacia de la prueba calculada fue de 81%.

Cuadro 11. Concordancia de resultados para prueba de ELISA						
	Diagnóstico clínico					
	Positivos		Negativos			
	n	%	n	%	Total (n)	Total (%)
ELISA +	24	85.714	4	28.571	28	66.67
ELISA -	4	14.286	10	71.429	14	33.33
Total	28	100	14	100	42	100.00

6.2.2 Prueba de IDGA

El antígeno DCPE fue capaz de distinguir entre el suero control positivo y control negativo utilizados para esta etapa. Al realizarse las diluciones dobles del antígeno se observó una precipitación de complejos antígeno-anticuerpo hasta la dilución 1:16 que corresponde a una concentración de 1.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; por lo tanto al agregarse 30 μl de la solución DCPE en el pozo central de cada roseta, la cantidad total de proteínas utilizada es de 30.67 μg .

Cuadro 12. Estandarización de IDGA		
No. de Roseta	Dilución del antígeno	Resultado
1	1:1	+
2	1:2	+
3	1:4	+
4	1:8	+
5	1:16	+
6	1:32	-
7	1:64	-

El índice de concordancia fue de $\kappa=0.19$ que se interpreta como concordancia insignificante. De un total de 55 sueros utilizados para estandarizar la prueba, se obtuvieron 20 verdaderos positivos, 12 verdaderos negativos y 23 resultados incorrectos (Cuadro 13). La sensibilidad de la prueba fue de 52.63% y la especificidad fue de 70.59%. La eficacia de la prueba calculada fue de 58.82%.

Cuadro 13. Concordancia de resultados para prueba de IDGA						
	Diagnóstico clínico				Total (n)	Total (%)
	Positivos		Negativos			
	n	%	n	%		
IDGA +	20	52.632	5	29.412	25	45.45
IDGA -	18	47.368	12	70.588	30	54.55
Total	38	100	17	100	55	100.00

6.3 Aplicación de las pruebas serológicas para emitir un diagnóstico final

6.3.1 Evaluación serológica de animales con estatus sanitario indeterminado para linfadenitis caseosa

Debido a que la prueba de ELISA obtuvo mejores resultados de eficacia, sensibilidad, especificidad y concordancia con el diagnóstico clínico, fue la prueba elegida para realizar el diagnóstico serológico de los animales sin signos clínicos de la enfermedad.

En el Cuadro 14 se muestran los resultados de la prueba serológica a animales clínicamente sanos, se calculó el porcentaje de animales positivos sin signos clínicos de la enfermedad, el cual se muestra en la columna 7.

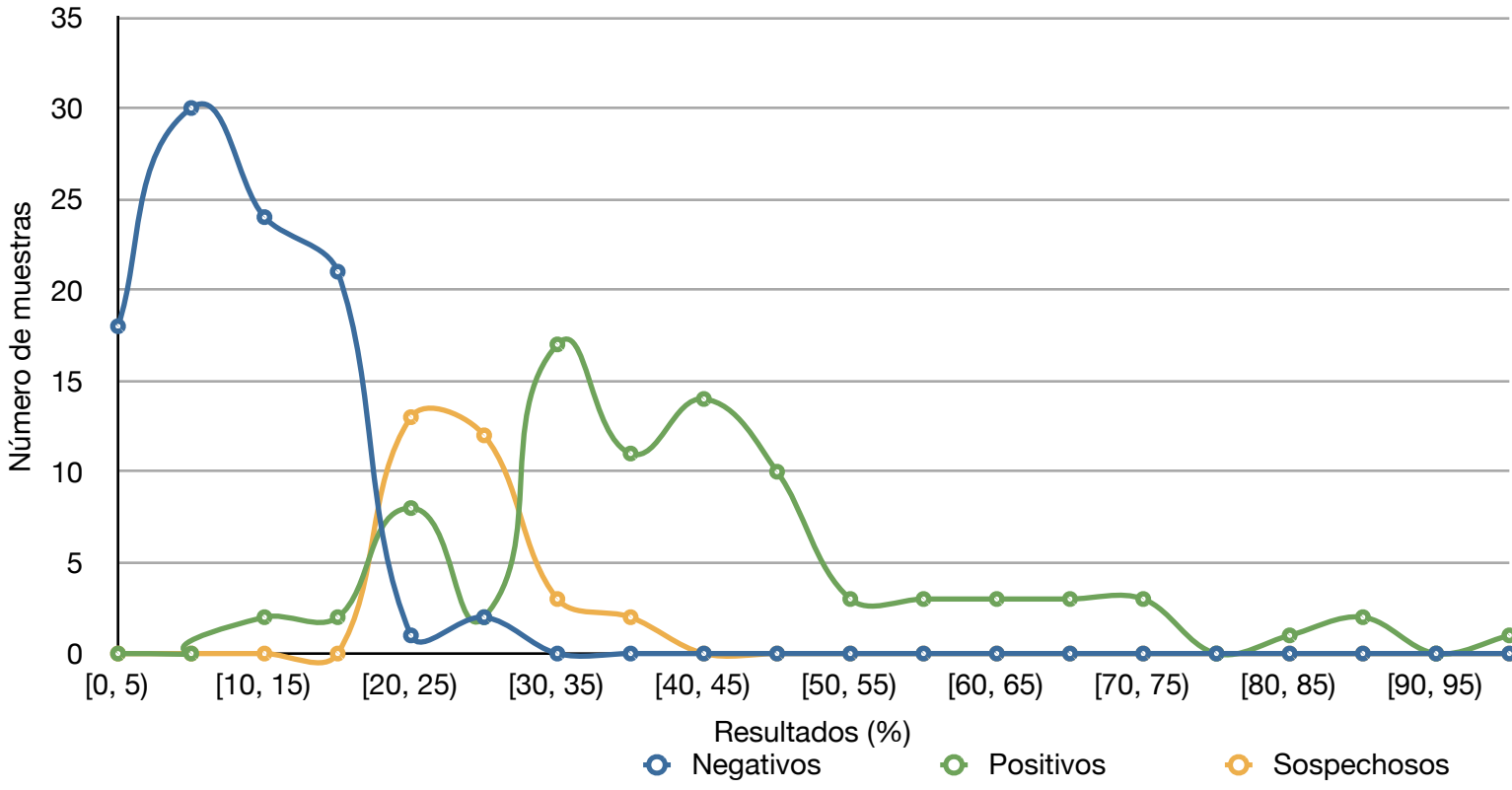
Cuadro 14. Diagnóstico serológico de animales clínicamente sanos.						
UPO	Muestras totales	Clínicamente sanos	+	-	Sospechosos	Proporción
CDO	8	3	1	1	1	33.33%
Chalma	105	98	20	65	13	20.41%
“El Terrero”	17	17	4	10	3	23.53%
Huamantla	13	9	3	3	3	33.33%
Quinta Mejor	19	8	1	3	4	12.50%
Tlaxcala	48	37	22	11	4	59.46%
Total	210	172	51	93	28	29.65%

En el Cuadro 15 se muestra un resumen de los resultados obtenidos como diagnóstico final considerando resultado de diagnóstico clínico más diagnóstico serológico. Los resultados del diagnóstico final se clasificaron en 20 categorías de

acuerdo a la lectura de ELISA expresada en porcentaje para determinar las lecturas más frecuentes en cada resultado (Gráfica 2).

Cuadro 15. Diagnóstico final					
UPO	Muestras totales	Positivos	Negativos	Sospechosos	Proporción animales positivos
CDO	8	6	1	1	75%
Chalma	105	27	65	13	25.71%
“El Terrero”	17	0	10	7	0%
Huamantla	13	7	3	3	53.85%
Quinta Mejor	19	12	3	4	63.16%
Tlaxcala	48	33	11	4	68.75%
Total	210	85	93	32	40.48%

Gráfica 2. Frecuencia de resultados



6.3.2 Estimación de la prevalencia en una UPO

En base a la proporción de animales con diagnóstico final positivo se estimó la prevalencia en la UPO identificada como Chalma en un 25.71%.

6.3.3 Resultados generales del trabajo

Se elaboró un Cuadro general de resultados (Cuadro 16 en Anexo I) en el que muestran todos los sueros obtenidos con el resultado de la prueba de ELISA expresada como densidad óptica, porcentaje, su interpretación, los antecedentes de linfadenitis caseosa del animal y el diagnóstico final por individuo.

7 Discusión

Las características físicas de las colonias aisladas de la cepa Robus corresponden a las que mencionan Quinn, 1994¹⁴, Moore, 2010²¹ y Dorella, 2006¹³. En cuanto a las características hemolíticas de *C. pseudotuberculosis*, Baird, 2007²² menciona la aparición de una zona angosta de hemólisis después de 48 o 72 horas, en el caso de la cepa Robus, la hemólisis apareció a las 48 horas y se extendió a las 72 horas. Microscópicamente se observa como un bastón pleomórfico, por lo tanto aunque suelen observarse con forma de bastón, pueden adquirir una forma cocoide^{14, 13, 22}. En un estudio de caracterización bacteriológica, Chirino-Zárraga, 2006 reporta cepas con forma coco-bacilar e incluso cepas con forma de coco totalmente, en el caso de la cepa Robus se encontraron cocos en un 80% de la preparación teñida con Gram y un 20% de cocobacilos, las células se encontraban agrupadas en el patrón de letras chinas^{14, 22}.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se compararon con las características que mencionan Quinn, 1994¹⁴ y Dorella, 2006¹³, de las cuales todas corresponden a las características de *C. pseudotuberculosis* con una diferencia en la reducción de nitratos ya que la cepa Robus resultó nitratos positivo, en la literatura se menciona que las cepas de ovinos y caprinos son nitratos negativo mientras que las cepas de equinos son nitratos positivo. Ivanović, 2009 sin embargo ha reportado la adaptación de cepas nitratos positivo en ovinos y caprinos¹².

C. pseudotuberculosis se caracteriza por poseer ácidos micólicos en su pared celular, esta característica se hace evidente en 2 características físicas de las colonias, una de ellas es la facilidad para resbalarse en la superficie del agar en que se cultivó²², la otra característica es su tendencia a formar grumos cuando se siembra en medios líquidos ya que las colonias se adhieren entre sí^{13, 22}. Se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen debido a que los ácidos micólicos de los otros géneros bacterianos del grupo CMNR otorgan propiedades ácido alcohol

resistentes, mientras que *Mycobacterium* y *Nocardia* son ácido alcohol resistentes y *Rhodococcus* es débil ácido alcohol resistente, los ácidos micólicos de *Corynebacterium* poseen la cadena más corta del grupo y no otorgan esta propiedad, pero se debe hacer la diferenciación^{14, 21}. Como resultado las colonias de la cepa Robus poseían las características físicas otorgadas por los ácidos micólicos, sin embargo no resultaron ácido alcohol resistentes.

El antígeno PLDS se encontraba constituido por una concentración de proteína de 1.12 mg/ml que es baja comparada con la que obtuvo Chirino-Zárraga, 2009 de 12.64 mg/ml utilizando también una cepa de referencia de ATCC, sin embargo para cubrir sus placas de poliestireno utilizó una dilución de 10 µg/ml por lo que la solución obtenida bajo condiciones modificadas a las utilizadas por Chirino-Zárraga, 2009 es adecuada para utilizarse como antígeno. Por otra parte Menzies, 1994 utilizó una concentración de 60 µg/ml de una PLD recombinante⁵², en los trabajos de Carminati, 2003 y Seyffert, 2010 que utilizaron un sobrenadante bacteriano no mencionan la concentración utilizada^{28, 48}.

La presencia de PLD en el sobrenadante se confirmó por la determinación en el Western Blot de una proteína con peso molecular de 31.1 kDa^{16, 19, 60}. Utilizando una muestra del PLDS esterilizado por filtración, se demostró la capacidad de la proteína para inhibir por si misma la β-hemólisis de *Staphylococcus aureus*^{12, 13, 22, 60}.

El antígeno DCPE se extrajo con una metodología similar a la utilizada por Kaba, 2001, quien también analizó la solución por medio de Western Blot, sin embargo los resultados los comparó de manera cualitativa con sus resultados de ELISA, por lo tanto no se puede comparar si las 10 proteínas obtenidas de la cepa Robus son las mismas que obtuvo Kaba, 2001¹⁷.

La prueba de ELISA fue estandarizada utilizando el antígeno a la mayor concentración y diluyendo el suero 1:80 debido a que Crowther, 2001 recomienda

utilizar la mayor concentración de antígeno posible con la menor concentración de suero. Con las constantes elegidas se obtiene una diferencia entre suero control positivo y control negativo de 0.700 nm, la lectura del suero control negativo es 5 veces mayor a la del suero control negativo⁴⁴.

El punto de corte se determinó de acuerdo a las recomendaciones de Crowther, 2001, mismas que fueron aplicadas en un trabajo de Espinoza, 2003. El método recomienda sumar 2 o 3 veces la desviación estándar de los sueros control negativo a su media aritmética o restar 2 o 3 veces la desviación estándar de los sueros control positivo a su media aritmética. Para este trabajo se utilizó solo 1 vez la desviación estándar debido a que se obtuvieron los mejores valores de sensibilidad y especificidad además al usarse un intervalo entre 2 criterios se puede obtener un grupo de sueros sospechosos. Tener un grupo de resultados sospechosos disminuye la cantidad de resultados falsos positivos o negativos y por lo tanto aumenta tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba. Se recomienda que a los sueros con resultado serológico sospechoso se les vuelva a correr la prueba y que el médico responsable de un seguimiento tanto clínico como serológico en fechas posteriores a la primera prueba^{44, 58}.

La estandarización de la prueba de IDGA solo requirió encontrar la mejor dilución del antígeno a la cual se observara la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo⁵⁴.

Aunque se determinó la sensibilidad y especificidad de cada prueba, el resultado no es el mejor indicador de que una prueba es mejor que otra, por lo que se utilizó el índice de concordancia κ para seleccionar la mejor prueba.

La interpretación del índice de concordancia de las pruebas comparadas con el diagnóstico clínico se interpreta de acuerdo al criterio de Daniel, 2002 quien menciona que el índice de concordancia κ permite comparar 2 resultados eliminando el factor de azar. Al obtener una concordancia tan baja en la prueba de

IDGA (0.19), no se puede confiar en la sensibilidad y especificidad obtenidas a diferencia de los resultados de la prueba de ELISA, en los cuales la concordancia con el diagnóstico clínico es moderada (0.57) pero mayor. Finalmente al comparar la eficacia general de ambas pruebas, la prueba de ELISA obtuvo un resultado de 81%, mucho mayor al resultado de la prueba de IDGA que obtuvo solamente 58%⁵⁹.

El antígeno DCPE que fue utilizado para la prueba de IDGA, se obtuvo con una metodología muy similar a la utilizada por Kaba, 2001, sin embargo en su trabajo utilizó el antígeno para una prueba de ELISA obteniendo una sensibilidad del 85% y una especificidad del 96%. Kaba, 2001 justifica sus resultados con una prueba de concordancia comparada con los resultados del Western Blot, obteniendo un índice κ de 0.93. Por lo tanto aunque el antígeno produce una precipitación visible de antígeno anticuerpo, el resultado de eficacia de la prueba no es el mismo que obtuvo Kaba, 2001 con la prueba de ELISA¹⁷. Otro punto importante a discutir es el de la identificación adecuada de la cepa de campo Robus, ya que el perfil bioquímico realizado detecta las principales características de *C. pseudotuberculosis* pero para una identificación más exacta se recomienda utilizar un kit APY CORYNE complementado con pruebas de catalasa y CAMP tanto con *Staphylococcus aureus* como con *Rhodococcus equi*^{13, 22} o identificación por PCR en base a la región hipervariable de gen *rpoB*^{38, 39, 40}.

Para evaluar la eficacia de la prueba seleccionada (ELISA), en total se revisaron 3 trabajos en los que se desarrolló una prueba de ELISA basada en un sobrenadante crudo con un procedimiento de obtención similar al utilizado para obtener PLDS en el presente trabajo. Chirino-Zárraga, 2009 obtuvo una sensibilidad de 72.73% y una especificidad de 67.74%, menores a las obtenidas en la prueba de ELISA desarrolladas por Carminati, 2003 y Seyffert, 2010 que obtuvieron una sensibilidad de 93.5% en ambos trabajos y una especificidad de 93.5% y 98.5% respectivamente. Es difícil saber el papel que juega la concentración proteica utilizada en cada caso para influir sobre la eficacia de la

prueba, sin embargo en los 3 trabajos se utilizó un sustrato diferente: Chirino-Zárraga, 2009 utilizó ABTS, Carminati, 2003 utilizó TMB y Seyffert, 2010 utilizó OPD. Por lo tanto el sustrato podría afectar de manera significativa la eficacia de la prueba, sobre todo porque Seyffert, 2010 obtuvo una mejor sensibilidad que Carminati, 2003 utilizando la misma metodología cambiando únicamente el sustrato por OPD^{18,28, 48}.

Las condiciones para la obtención del antígeno en este trabajo fueron muy similares a las utilizadas por Chirino-Zárraga, 2009 con una modificación en la concentración de proteína, aquí se utilizó una solución de 1120 µg/ml en lugar de 10 µg/ml. Además de la concentración del antígeno, también se sustituyó el tipo de sustrato por OPD, por lo tanto la sensibilidad y especificidad pudieron haber aumentado a causa del cambio de sustrato como ocurrió en el trabajo de Seyffert, 2010 con respecto al de Carminati, 2003^{18,28, 48}.

Otra diferencia entre el trabajo de Chirino-Zárraga, 2009 con respecto a los trabajos de Carminati, 2003 y Seyffert, 2010 es que estos 2 últimos autores no suplementaron el medio de cultivo con el detergente Tween 80. La suplementación con Tween 80 permite un mayor crecimiento de la bacteria y una mayor producción de exotoxina¹⁴, sin embargo el detergente permanece soluble en el medio por lo que dificulta la unión del antígeno a la microplaca de poliestireno considerando que el Tween 20, un detergente similar al Tween 80, se utiliza para realizar lavados en la prueba de ELISA. En este trabajo no se suplementó con Tween 80, factor que pudo favorecer la eficacia con respecto a Chirino-Zárraga, 2009^{18,28, 48}.

Comparando los resultados de este trabajo con los de Carminati, 2003 y Seyffert, 2010, es difícil determinar la razón por la que se obtuvo una eficacia más baja ya que en ninguno de los 2 trabajos se realizó un estudio profundo del antígeno utilizado, no mencionan la concentración de proteína utilizada ni la pureza del antígeno. En este trabajo se identificó la presencia de 2 proteínas solubles en el

sobrenadante, una de ellas identificada como PLD y otra proteína con un peso de 93.5 kDa que no fue identificada y que puede alterar la sensibilidad y especificidad, sin embargo no se comprobó^{28, 48}.

La prueba de ELISA desarrollada por Menzies, 1994 utilizando la PLD recombinante de Songer, 1990 obtuvo una sensibilidad de 86.3% y una especificidad de 82.1% que resultan más bajas que las obtenidas por Carminati, 2003 y Seyffert, 2010. El kit comercial ELITEST CLA que también se basa en una PLD recombinante mejoró la especificidad a 96.7% pero con una menor sensibilidad que fue de 84%; sin embargo sin alcanzar los valores obtenidos por Carminati, 2003 y por Seyffert, 2010. Este resultado revela que el sobrenadante crudo contiene otras proteínas específicas no reportadas por los autores que mejoran la eficacia de la prueba comparada con el uso de una PLD purificada^{51, 52, 53}.

Otra forma de mejorar la eficacia de la prueba es mediante el uso de un ELISA más específico y sensible como un ELISA tipo sandwich. La prueba oficial utilizada en Holanda para el programa de erradicación en la década de 1990 consistía en un ELISA tipo sandwich desarrollado a partir del uso de un suero hiperinmune obtenido a partir de la inoculación a animales de laboratorio de un sobrenadante crudo. Este estudio apoya la suposición de la presencia de otros antígenos solubles en el sobrenadante que mejoran la eficacia de la prueba^{49, 50}.

Se corrió la prueba de ELISA para diagnosticar a los animales clínicamente sanos ya que García, 1986 menciona que en el 90% de los casos no se observan los signos clínicos². En este caso, de un total de 172 animales clínicamente sanos, 51 animales resultaron positivos, es decir, un 29.65%. Esta cifra podría aumentar con una prueba serológica con mayor eficacia como las citadas anteriormente ya que el 16% de estos animales clínicamente sanos resultaron sospechosos con la prueba de ELISA. No se determinaron las causas por las que estos animales resultaron positivos ya que no se confirmó enfermedad visceral o cutánea que no

se hubiera detectado. En México existe la ventaja de que los productores no utilizan vacuna contra linfadenitis caseosa, por lo tanto el diagnóstico serológico es más veraz⁴⁷.

A nivel mundial Lloyd, 2000 menciona una prevalencia de 50 a 60%¹, Çetinkaya, 2002 menciona que en Norteamérica la prevalencia promedio es de 8%⁹, Ivanović, 2009 reporta una prevalencia de 22%¹². Seyffert, 2010 utilizó la prueba de ELISA anteriormente mencionada, para realizar un estudio de prevalencia en 108 unidades de producción caprina en Brasil reportando una prevalencia de 78.9%²⁸. En este trabajo no se puede evaluar la prevalencia de todas las UPO debido a que se seleccionaron a los animales de acuerdo a su diagnóstico clínico en la mayoría de ellas, sin embargo vale la pena mencionar el resultado de la UPO identificada como Chalma. En esta UPO se realizó el muestreo del total de la población, estimando una prevalencia de 25.71% con un 12.38% de animales con diagnóstico sospechoso. La prevalencia estimada para la UPO Chalma es muy similar a lo reportado por Ivanović, 2009, superior al promedio de Norteamérica e inferior a la prevalencia mundial mencionada por Lloyd, 2000¹.

En México no se han hecho reportes oficiales de prevalencia, sin embargo existe una publicación en la que se realizó el diagnóstico clínico en cabras lecheras de la comarca lagunera, estimando una prevalencia del 3.38% sin diagnóstico serológico¹¹. En la UPO Chalma se reportó un 6% de animales clínicamente enfermos, cifra muy por debajo de la prevalencia estimada en base al diagnóstico final ya que 20.41% de los animales clínicamente sanos resultaron positivos. Por lo tanto se recomienda realizar un estudio serológico en trabajos futuros para determinar la prevalencia de la enfermedad en México.

8 Conclusiones

Se aisló y caracterizó una cepa de campo de *C. pseudotuberculosis* que se utilizó como fuente de antígeno de proteínas de pared y membrana celular para utilizarse en la prueba de IDGA.

La prueba de ELISA utilizando el antígeno PLDS obtuvo una mejor eficacia que la prueba de IDGA utilizando el antígeno DCPE.

Los resultados del presente trabajo establecen las bases para el diagnóstico serológico de linfadenitis caseosa, el antígeno obtenido demostró ser altamente efectivo; sin embargo se recomienda profundizar en la investigación para mejorar la especificidad de la prueba.

9 Referencias bibliográficas

- ¹ Lloyd SS. Linfadenitis caseosa en ovejas y cabras. En: Editores Melling M, Alder M. Manual Para La Práctica Veterinaria. Práctica Ovina y caprina. 1ª Ed. Argentina: Inter-Médica; 2000: 165-174.
- ² García VS, Ciprian CA. Linfadenitis caseosa. En: Editores Pijoan P, Tortora J. Principales Enfermedades De Los Ovinos y Caprinos. 1ª Ed. México: UNAM; 1986: 235-239.
- ³ Smith MC, Sherman DM. Goat Medicine. 1st Ed. USA: Lea & Febiger; 1994: 46-49; 259-260.
- ⁴ Hernández AL. Linfadenitis caseosa. En: Editores Díaz AE, Aguilar RF, Vázquez NJ. Manual Para El Diagnóstico De Enfermedades En Ovinos y Caprinos En México. México: Comité De Salud y Producción Ovina y Caprina; 2005: 78-81.
- ⁵ Norma Oficial Mexicana NOM-030-ZOO-1995, Especificaciones y Procedimientos Para La Verificación De Carne, Canales, Visceras y Despojos De Importación En Puntos De Verificación Zoonosanitaria.
- ⁶ Pugh DG. Sheep & Goat Medicine. 1st Ed. USA: Saunders; 2002: 126-127; 207-209
- ⁷ Linklater KA, Smith MC. Color Atlas of Diseases and Disorders of the Sheep and Goat. 1st Ed. UK: Wolfe; 1993: 205
- ⁸ Pekelder JJ. Linfadenitis Caseosa Ovina. En: Editores Martin WB, Aitken ID. Enfermedades de la oveja. 2ª Ed. España: Acribia; 2002: 329-333.
- ⁹ Çetinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, De Baere T, Vaneechoutte M. Identification Of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates From Sheep And Goats By PCR. Veterinary Microbiology 2002; 88: 75-83.
- ¹⁰ Hodgson ALM, ET. Al. Efficacy Of An Ovine Caseous Lymphadenitis Vaccine Formulated Using A Genetically Inactive Form Of The *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D. Vaccine 1999; 17: 802-808.

- ¹¹ Carrillo GM, Ortega SJL, Hernández SJR. Prevalencia de Linfadenitis Caseosa en Hatos Caprinos de la Comarca Lagunera de Durango. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas 2005; 4 (1): 51-56
- ¹² Ivanović S, Žutić M, Pavlović I, Žujović M. Caseous Lymphadenitis In Goats. Biotechnology in Animal Husbandry 2009; 25: 999-1007.
- ¹³ Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azebedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. EDP Sciences, Vet. Res. 2006; 37: 201-218.
- ¹⁴ Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. 1st Ed. Spain: Mosby; 1994: 137-143.
- ¹⁵ Al-Gaabary MH, Osman SA, Oreiby AF. Caseous Lymphadenitis In Sheep And Goats: Clinical, Epidemiological And Preventive Studies. Small Ruminant Research 2009; 87: 116-121.
- ¹⁶ García VSE, Martínez RHA, Muñoz GMA, Mendoza SMA, Sánchez PMJ, Urquiza PMP. Establecimiento de una prueba de ELISA para el diagnóstico de Linfadenitis Caseosa en cabras. Memorias de XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Guadalajara, México 2008: 956-960
- ¹⁷ Kaba J, Kutschke L, Gerlach G. Development Of An ELISA For The Diagnosis Of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infections In Goats. Veterinary Microbiology. 2001; 78: 155-163.
- ¹⁸ Chirino-Zárraga C, Rey-Valeirón C, Scaramelli A, Carrero L. Diagnosis Of Caseous Lymphadenitis By ELISA In Naturally Infected Goats From Venezuela. Small Ruminant Research. 2009; 87: 92-95.
- ¹⁹ Ruiz LJR, Barrera VM, Frias MT. Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. RECVET 2007; Vol. II, No. 8: 1-22
- ²⁰ Medrano GG, Hung ChA, Alvarado SA, Li EO. Evaluación De Una Vacuna Contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* En Ratones Albinos. Rev Inv Vet Perú 2003; 14 (1): 61-67.
- ²¹ Moore R, Miyoshi A, Pacheco LGC, Seyffert N, Azevedo V. *Corynebacterium* And *Arcanobacterium*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO Editors.

Pathogenesis Of Bacterial Infections In Animals. 4th Ed. Singapore: Wiley-Blackwell; 2010: 133-147.

²² Baird GJ, Fontaine MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* And Its Role In Ovine Caseous Lymphadenitis. J. Comp. Path. 2007; 137: 179-210

²³ Matthews JG. Enfermedades de la cabra. 1^a Ed. España: Acribia; 1999: 131-139.

²⁴ Fontaine MC, Baird GJ. Caseous Lymphadenitis. Small Ruminant Research 2008; 76: 42-48.

²⁵ Valli VEO. Hematopoietic System. In: Maxie MG, Jubb KVF Editors. Jubb, Kennedy And Palmer's Pathology Of Domestic Animals. 5th Ed. China: Elsevier Saunders; 2007: Vol 3, 292-294

²⁶ Leite-Browning M. Caseous Lymphadenitis (CL) in Goats and Sheep. Alabama Cooperative Extension System 2007; UNP 85: 1-4

²⁷ Sargison N. Sheep Flock Health. 1st Ed. Singapur: Blackwell Publishing; 2008: 414-422.

²⁸ Seyffert N, ET Al. High Seroprevalence Of Caseous Lymphadenitis In Brazilian Goat Herds Revealed By *Corynebacterium pseudotuberculosis* Secreted Proteines-Based ELISA. Research In Veterinary Science. 2010; 88: 50-55.

²⁹ Belchior SE, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Jensen O. Actualización Sobre Linfadenitis Caseosa: El Agente Etiológico y la Enfermedad. Veterinaria Argentina 2006; 23(224): 258-278.

³⁰Chirino-Zárraga C, Scaramelli A, Rey-Valeirón C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. Small Ruminant Research 2006; 65: 170 - 175

³¹ Windsor PA. Control of Caseous Lymphadenitis. Vet Clin food Anim. 2011; 27: 193-202.

³² Vázquez NJ. Actinobacilosis (*Actinobacillus lignieresii*). En: Editores Díaz AE, Aguilar RF, Vázquez NJ. Manual Para El Diagnóstico De Enfermedades En Ovinos y Caprinos En México. México: Comité De Salud y Producción Ovina y Caprina; 2005: 19-21.

- ³³ Schlafer DH, Miller RB. Female Genital System. In: Maxie MG, Jubb KVF Editors. Jubb, Kennedy And Palmer's Pathology Of Domestic Animals. 5th Ed. China: Elsevier Saunders; 2007: Vol 3, 429-564.
- ³⁴ Stanford K, Brogden KA, McClelland LA, Kozub GC, Audibert F. The Incidence Of Caseous Lymphadenitis In Alberta Sheep And Assessment Of Impact By Vaccination With Commercial And Experimental Vaccines. Can J Vet Res. 1998; 62: 38-43.
- ³⁵ Fontaine MC, Baird G, Connor KM, Rudge K, Sales J, Donachie W. Vaccination Confers Significant Protection Of Sheep Against Infection With A Virulent United Kingdom Strain Of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vaccine. 2006; 24: 5986-5996.
- ³⁶ Ruiz LJR, Barrera VM, Frias MT. Linfadenitis Caseosa II: Diagnóstico, control y aspectos epizootiológicos. RECVET 2008; Vol. III, No. 4: 1-27.
- ³⁷ Pacheco LGC y cols. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. Journal of Medical Microbiology. 2007; 56: 480 - 486
- ³⁸ Pavan ME, Robles C, Cairó FM, Marcellino R, Pettinari MJ. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). Research in Veterinary Science. 2011; Doi:10.1016/j.rvsc.2011.02.007 Article in press, corrected proof.
- ³⁹ Khamis A, Raoult D, La Scola B. *rpoB* Gene Sequencing for Identification of *Corynebacterium* Species. Journal of Clinical Microbiology. 2004; Vol. 42, No. 9: 3925-3931.
- ⁴⁰ Retamal P, Ríos M, Cheuquepán F, Abalos P, Pizarro-Lucero J, Borie C, Gutierrez J. Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis rpoB* gene sequence. Veterinary Microbiology. 2011; Doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.012 Article in press.
- ⁴¹ Tizard IR. Veterinary Immunology: An introduction. 7th Ed. USA: Elsevier; 2004: 181-197.

- ⁴² Prescott JF, Menzies PI, Hwang YT. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. *Veterinary Microbiology*. 2002; 88: 287 - 297.
- ⁴³ Rebouças MF and cols. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011; 23: 213 - 220.
- ⁴⁴ Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods in molecular biology*; Vol. 149. USA: Humana press; 2001: 1 - 8; 45 - 82.
- ⁴⁵ Binns SH, Bailey M, Green LE. Evaluation of an ELISA for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, New Zealand. 2003.
- ⁴⁶ Binns SH, Green LE, Bailey M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary Microbiology*. 2007; 123: 169 - 179.
- ⁴⁷ Solanet JJ, Malena R, Estein SM, Belchior SE, Paolicchi F. Desarrollo de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en carneros vacunados o infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Argentina de Microbiología*. 2011; 43: 9 - 17 .
- ⁴⁸ Carminati R y cols. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *R. Ci. méd. biol., Salvador*. 2003 2 (1): 88 - 93
- ⁴⁹ Ter Laak EA, Bosch J, Bijl GC, Schreuder BE. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *American journal of veterinary research*. 1992; 7: 1125 - 1132.
- ⁵⁰ Dercksen DP, Brinkhof JMA, Dekker-Nooren T, van Maanen K, Bode CF, Baird G, Kamp EM. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. 2000; 75: 167 - 175.

- ⁵¹ Songer JG, Libby SJ, Iandolo JJ, Cuevas WA. Cloning and Expression of the Phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 1990; 58: 131 - 136.
- ⁵² Menzies PI, Muckle CA, Hwang YT, Songer JG. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. Small Ruminant Research. 1994; 13: 193 - 198.
- ⁵³ Brunnée T, Seeberger A, Kleine-Tebbe J, Kunkel G. Comparison between two automated systems to determine specific IgE: CAP and ELitest. Clinical and experimental allergy journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 1996; Volume 26, Issue 12: 1420 - 1427.
- ⁵⁴ OIE. Enfermedades de ovejas y cabras en la lista B. En: Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). 5ta Ed. Francia: Office international des epizooties; 2004: 635 - 643
- ⁵⁵ Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248 - 254
- ⁵⁶ Ellis JA, Hawk DA, Mills KW, Pratt DL. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1991; 28: 303 - 316
- ⁵⁷ Johnson R, Kuby P. Estadística elemental, lo esencial. 2da Ed. México: International Thomson Editores; 1998: 101 - 144
- ⁵⁸ Espinoza Y y cols. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana. Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2003; 64 (1): 7 - 12
- ⁵⁹ Daniel W. Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4a Ed. México: Limusa Wiley; 2002: 150 - 202
- ⁶⁰ McKean SC, Davies JK, Moore RJ. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. Microbiology. 2007; 153: 2203 - 2211

Anexo I

Cuadro 16. Cuadro general de resultados						
UPO	Identificación	Diagnóstico clínico	Densidad óptica (nm)	Resultado (%)	Interpretación ELISA	Diagnóstico final
CDO	1044	ED	0.173	22.85	Sospechoso	Positivo
CDO	29	Sospechoso	0.241	31.93	Positivo	Positivo
CDO	63	ED	0.348	46.23	Positivo	Positivo
CDO	64	Sospechoso	0.219	28.99	Sospechoso	Sospechoso
CDO	68	EA	0.202	26.72	Sospechoso	Positivo
CDO	95	EA	0.329	43.69	Positivo	Positivo
CDO	99	EA	0.131	17.23	Negativo	Positivo
CDO	lamb 480	Sospechoso	0.002	0.00	Negativo	Negativo
Chalma	032	Sospechoso	0.546	72.68	Positivo	Positivo
Chalma	1	Sospechoso	0.189	24.98	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	10	ED	0.187	24.72	Sospechoso	Positivo
Chalma	10-66	Sospechoso	0.195	25.78	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	105	ED	0.229	30.33	Positivo	Positivo
Chalma	106	Sospechoso	0.235	31.13	Positivo	Positivo
Chalma	11	Sospechoso	0.119	15.63	Negativo	Negativo
Chalma	11-101	Sospechoso	0.059	7.62	Negativo	Negativo
Chalma	115	Sospechoso	0.345	45.82	Positivo	Positivo
Chalma	12	Sospechoso	0.120	15.76	Negativo	Negativo
Chalma	12102	Sospechoso	0.041	5.21	Negativo	Negativo
Chalma	13	Sospechoso	0.142	18.70	Negativo	Negativo
Chalma	13103	Sospechoso	0.047	6.01	Negativo	Negativo
Chalma	14	Sospechoso	0.202	26.72	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	14-1	Sospechoso	0.082	10.69	Negativo	Negativo
Chalma	14-104	Sospechoso	0.023	2.81	Negativo	Negativo
Chalma	15	Sospechoso	0.194	25.65	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	16	Sospechoso	0.100	13.09	Negativo	Negativo
Chalma	17	Sospechoso	0.175	23.11	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	18	Sospechoso	0.172	22.71	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	187195	Sospechoso	0.438	58.25	Positivo	Positivo
Chalma	19	Sospechoso	0.141	18.57	Negativo	Negativo
Chalma	2	Sospechoso	0.079	10.29	Negativo	Negativo
Chalma	2-68	Sospechoso	0.021	2.54	Negativo	Negativo
Chalma	20	Sospechoso	0.079	10.29	Negativo	Negativo
Chalma	21	Sospechoso	0.178	23.51	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	22	Sospechoso	0.059	7.62	Negativo	Negativo
Chalma	24	ED	0.332	44.09	Positivo	Positivo
Chalma	25	Sospechoso	0.239	31.66	Positivo	Positivo
Chalma	26	Sospechoso	0.513	68.27	Positivo	Positivo

Cuadro 16. Cuadro general de resultados						
UPO	Identificación	Diagnóstico clínico	Densidad óptica (nm)	Resultado (%)	Interpretación ELISA	Diagnóstico final
Chalma	28	Sospechoso	0.299	39.68	Positivo	Positivo
Chalma	29	Sospechoso	0.232	30.73	Positivo	Positivo
Chalma	3	Sospechoso	0.144	18.97	Negativo	Negativo
Chalma	3-69	Sospechoso	0.145	19.10	Negativo	Negativo
Chalma	30	Sospechoso	0.665	88.58	Positivo	Positivo
Chalma	34	Sospechoso	0.220	29.12	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	35	Sospechoso	0.090	11.76	Negativo	Negativo
Chalma	36	Sospechoso	0.113	14.83	Negativo	Negativo
Chalma	37	Sospechoso	0.102	13.36	Negativo	Negativo
Chalma	4	Sospechoso	0.093	12.16	Negativo	Negativo
Chalma	4-70	Sospechoso	0.059	7.62	Negativo	Negativo
Chalma	4-75	Sospechoso	0.075	9.75	Negativo	Negativo
Chalma	43	Sospechoso	0.124	16.30	Negativo	Negativo
Chalma	44	Sospechoso	0.108	14.16	Negativo	Negativo
Chalma	44-1	Sospechoso	0.051	6.55	Negativo	Negativo
Chalma	45	Sospechoso	0.196	25.92	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	46	ED	0.253	33.53	Positivo	Positivo
Chalma	47	Sospechoso	0.147	19.37	Negativo	Negativo
Chalma	48	Sospechoso	0.089	11.62	Negativo	Negativo
Chalma	49	Sospechoso	0.389	51.70	Positivo	Positivo
Chalma	5	Sospechoso	0.066	8.55	Negativo	Negativo
Chalma	5-71	Sospechoso	0.032	4.01	Negativo	Negativo
Chalma	50	Sospechoso	0.366	48.63	Positivo	Positivo
Chalma	51	Sospechoso	0.194	25.65	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	51-1	Sospechoso	0.169	22.31	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	52	Sospechoso	0.169	22.31	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	53	Sospechoso	0.010	1.07	Negativo	Negativo
Chalma	53	Sospechoso	0.074	9.62	Negativo	Negativo
Chalma	54	Sospechoso	0.062	8.02	Negativo	Negativo
Chalma	54-2	Sospechoso	0.257	34.07	Positivo	Positivo
Chalma	54-3	Sospechoso	0.167	22.04	Sospechoso	Sospechoso
Chalma	55	ED	0.156	20.57	Sospechoso	Positivo
Chalma	55-1	Sospechoso	0.012	1.34	Negativo	Negativo
Chalma	56	Sospechoso	0.263	34.87	Positivo	Positivo
Chalma	56-1	Sospechoso	0.090	11.76	Negativo	Negativo
Chalma	57	Sospechoso	0.110	14.43	Negativo	Negativo
Chalma	57	Sospechoso	0.360	47.83	Positivo	Positivo
Chalma	58	Sospechoso	0.071	9.22	Negativo	Negativo
Chalma	59	Sospechoso	0.249	33.00	Positivo	Positivo
Chalma	6-72	Sospechoso	0.048	6.15	Negativo	Negativo
Chalma	60	Sospechoso	0.060	7.75	Negativo	Negativo

Cuadro 16. Cuadro general de resultados						
UPO	Identificación	Diagnóstico clínico	Densidad óptica (nm)	Resultado (%)	Interpretación ELISA	Diagnóstico final
Chalma	60	Sospechoso	0.309	41.02	Positivo	Positivo
Chalma	61	Sospechoso	0.255	33.80	Positivo	Positivo
Chalma	62	Sospechoso	0.082	10.69	Negativo	Negativo
Chalma	63	EA	0.120	15.76	Negativo	Positivo
Chalma	64	Sospechoso	0.125	16.43	Negativo	Negativo
Chalma	64-1	Sospechoso	0.053	6.81	Negativo	Negativo
Chalma	65	Sospechoso	0.078	10.15	Negativo	Negativo
Chalma	65-1	Sospechoso	0.019	2.27	Negativo	Negativo
Chalma	66	Sospechoso	0.282	37.41	Positivo	Positivo
Chalma	67	Sospechoso	0.055	7.08	Negativo	Negativo
Chalma	67-1	Sospechoso	0.062	8.02	Negativo	Negativo
Chalma	68	Sospechoso	0.112	14.70	Negativo	Negativo
Chalma	69	Sospechoso	0.047	6.01	Negativo	Negativo
Chalma	7	Sospechoso	0.135	17.77	Negativo	Negativo
Chalma	7-73	Sospechoso	0.031	3.87	Negativo	Negativo
Chalma	70	Sospechoso	0.036	4.54	Negativo	Negativo
Chalma	71	Sospechoso	0.062	8.02	Negativo	Negativo
Chalma	72	Sospechoso	0.031	3.87	Negativo	Negativo
Chalma	73	Sospechoso	0.032	4.01	Negativo	Negativo
Chalma	75	Sospechoso	0.044	5.61	Negativo	Negativo
Chalma	76	Sospechoso	0.015	1.74	Negativo	Negativo
Chalma	77	Sospechoso	0.008	0.80	Negativo	Negativo
Chalma	78	Sospechoso	0.040	5.08	Negativo	Negativo
Chalma	79	Sospechoso	0.417	55.44	Positivo	Positivo
Chalma	8	Sospechoso	0.150	19.77	Negativo	Negativo
Chalma	8-74	Sospechoso	0.061	7.88	Negativo	Negativo
Chalma	80	Sospechoso	0.142	18.70	Negativo	Negativo
Chalma	83	Sospechoso	0.005	0.40	Negativo	Negativo
Chalma	84	Sospechoso	0.016	1.87	Negativo	Negativo
Chalma	85	Sospechoso	0.020	2.40	Negativo	Negativo
Chalma	87	Sospechoso	0.236	31.26	Positivo	Positivo
Chalma	88	Sospechoso	0.036	4.54	Negativo	Negativo
Chalma	Semental Blanco	Sospechoso	0.070	9.08	Negativo	Negativo
Chalma	Semental Café	ED	0.313	41.55	Positivo	Positivo
"El Terrero"	106	Negativo	0.267	35.34	Positivo	Sospechoso
"El Terrero"	110	Negativo	0.162	21.31	Sospechoso	Sospechoso
"El Terrero"	110's son	Negativo	0.061	7.82	Negativo	Negativo
"El Terrero"	135	Negativo	0.142	18.64	Negativo	Negativo
"El Terrero"	137	Negativo	0.246	32.53	Positivo	Sospechoso
"El Terrero"	141	Negativo	0.113	14.76	Negativo	Negativo
"El Terrero"	142	Negativo	0.147	19.31	Negativo	Negativo

Cuadro 16. Cuadro general de resultados						
UPO	Identificación	Diagnóstico clínico	Densidad óptica (nm)	Resultado (%)	Interpretación ELISA	Diagnóstico final
"El Terrero"	144	Negativo	0.197	25.99	Sospechoso	Sospechoso
"El Terrero"	145	Negativo	0.251	33.20	Positivo	Sospechoso
"El Terrero"	48	Negativo	0.226	29.86	Sospechoso	Sospechoso
"El Terrero"	6 Semental	Negativo	0.265	35.07	Positivo	Sospechoso
"El Terrero"	8 Semental	Negativo	0.095	12.36	Negativo	Negativo
"El Terrero"	lamb 1	Negativo	0.063	8.08	Negativo	Negativo
"El Terrero"	lamb 2	Negativo	0.141	18.50	Negativo	Negativo
"El Terrero"	lamb 3	Negativo	0.069	8.88	Negativo	Negativo
"El Terrero"	lamb 4	Negativo	0.091	11.82	Negativo	Negativo
"El Terrero"	lamb 5	Negativo	0.056	7.15	Negativo	Negativo
Huamantla	1	EA	0.310	41.08	Positivo	Positivo
Huamantla	2	Sospechoso	0.214	28.26	Sospechoso	Sospechoso
Huamantla	3	EA	0.334	44.29	Positivo	Positivo
Huamantla	33	Sospechoso	0.418	55.51	Positivo	Positivo
Huamantla	398	Sospechoso	0.542	72.08	Positivo	Positivo
Huamantla	4	EA	0.189	24.92	Sospechoso	Positivo
Huamantla	401	EA	0.465	61.79	Positivo	Positivo
Huamantla	5	Sospechoso	0.228	30.13	Sospechoso	Sospechoso
Huamantla	9392	Sospechoso	0.236	31.26	Positivo	Positivo
Huamantla	9398	Sospechoso	0.221	29.26	Sospechoso	Sospechoso
Huamantla	9399	Sospechoso	0.140	18.44	Negativo	Negativo
Huamantla	lamb 1	Sospechoso	0.118	15.43	Negativo	Negativo
Huamantla	lamb 2	Sospechoso	0.109	14.23	Negativo	Negativo
Quinta Mejor	001	Sospechoso	0.160	21.04	Sospechoso	Sospechoso
Quinta Mejor	0101	ED	0.220	29.06	Sospechoso	Positivo
Quinta Mejor	104	Sospechoso	0.167	21.98	Sospechoso	Sospechoso
Quinta Mejor	105	ED	0.164	21.58	Sospechoso	Positivo
Quinta Mejor	107	Sospechoso	0.203	26.79	Sospechoso	Sospechoso
Quinta Mejor	108	Sospechoso	0.276	36.54	Positivo	Positivo
Quinta Mejor	113	ED	0.287	38.01	Positivo	Positivo
Quinta Mejor	203	ED	0.751	100.00	Positivo	Positivo
Quinta Mejor	205	ED	0.349	46.29	Positivo	Positivo
Quinta Mejor	208	ED	0.403	53.51	Positivo	Positivo
Quinta Mejor	210	ED	0.339	44.96	Positivo	Positivo
Quinta Mejor	33	ED	0.187	24.65	Sospechoso	Positivo
Quinta Mejor	347	ED	0.163	21.44	Sospechoso	Positivo
Quinta Mejor	35	ED	0.161	21.18	Sospechoso	Positivo
Quinta Mejor	371	ED	0.108	14.09	Negativo	Positivo
Quinta Mejor	434	Sospechoso	0.178	23.45	Sospechoso	Sospechoso
Quinta Mejor	458	Sospechoso	0.139	18.24	Negativo	Negativo
Quinta Mejor	467	Sospechoso	0.136	17.84	Negativo	Negativo

Cuadro 16. Cuadro general de resultados						
UPO	Identificación	Diagnóstico clínico	Densidad óptica (nm)	Resultado (%)	Interpretación ELISA	Diagnóstico final
Quinta Mejor	487	Sospechoso	0.144	18.90	Negativo	Negativo
Tlaxcala	01	Sospechoso	0.317	42.02	Positivo	Positivo
Tlaxcala	04	Sospechoso	0.369	48.96	Positivo	Positivo
Tlaxcala	06	Sospechoso	0.326	43.22	Positivo	Positivo
Tlaxcala	09	ED	0.331	43.89	Positivo	Positivo
Tlaxcala	10	Sospechoso	0.320	42.42	Positivo	Positivo
Tlaxcala	100	Sospechoso	0.121	15.83	Negativo	Negativo
Tlaxcala	101	EA	0.676	89.98	Positivo	Positivo
Tlaxcala	102	Sospechoso	0.276	36.54	Positivo	Positivo
Tlaxcala	104	Sospechoso	0.361	47.90	Positivo	Positivo
Tlaxcala	105	Sospechoso	0.461	61.26	Positivo	Positivo
Tlaxcala	106	Sospechoso	0.155	20.37	Sospechoso	Sospechoso
Tlaxcala	107	ED	0.297	39.35	Positivo	Positivo
Tlaxcala	108	Sospechoso	0.358	47.49	Positivo	Positivo
Tlaxcala	109	EA	0.363	48.16	Positivo	Positivo
Tlaxcala	11	Sospechoso	0.274	36.27	Positivo	Positivo
Tlaxcala	110	Sospechoso	0.262	34.67	Positivo	Positivo
Tlaxcala	111	Sospechoso	0.233	30.79	Positivo	Positivo
Tlaxcala	112	Sospechoso	0.470	62.46	Positivo	Positivo
Tlaxcala	115	Sospechoso	0.224	29.59	Sospechoso	Sospechoso
Tlaxcala	118	Sospechoso	0.334	44.29	Positivo	Positivo
Tlaxcala	36	EA	0.510	67.80	Positivo	Positivo
Tlaxcala	41	Sospechoso	0.279	36.94	Positivo	Positivo
Tlaxcala	50	Sospechoso	0.074	9.55	Negativo	Negativo
Tlaxcala	55	Sospechoso	0.027	3.27	Negativo	Negativo
Tlaxcala	78	Sospechoso	0.192	25.32	Sospechoso	Sospechoso
Tlaxcala	90	Sospechoso	0.102	13.29	Negativo	Negativo
Tlaxcala	CH-1	ED	0.333	44.15	Positivo	Positivo
Tlaxcala	CH-2	Sospechoso	0.290	38.41	Positivo	Positivo
Tlaxcala	CH-4	ED	0.542	72.08	Positivo	Positivo
Tlaxcala	CH-5	EA	0.274	36.27	Positivo	Positivo
Tlaxcala	CH-6	ED	0.110	14.38	Negativo	Positivo
Tlaxcala	J-10	ED	0.361	47.90	Positivo	Positivo
Tlaxcala	J-14	Sospechoso	0.097	12.63	Negativo	Negativo
Tlaxcala	J-18	Sospechoso	0.096	12.49	Negativo	Negativo
Tlaxcala	J-19	Sospechoso	0.086	11.16	Negativo	Negativo
Tlaxcala	J-2	Sospechoso	0.066	8.48	Negativo	Negativo
Tlaxcala	J-24	Sospechoso	0.071	9.15	Negativo	Negativo
Tlaxcala	J-25	Sospechoso	0.075	9.69	Negativo	Negativo
Tlaxcala	J-26	Sospechoso	0.109	14.23	Negativo	Negativo
Tlaxcala	J-3	Sospechoso	0.377	50.03	Positivo	Positivo

Cuadro 16. Cuadro general de resultados						
UPO	Identificación	Diagnóstico clínico	Densidad óptica (nm)	Resultado (%)	Interpretación ELISA	Diagnóstico final
Tlaxcala	J-37	Sospechoso	0.233	30.79	Positivo	Positivo
Tlaxcala	J-5	Sospechoso	0.268	35.47	Positivo	Positivo
Tlaxcala	J-7	ED	0.319	42.28	Positivo	Positivo
Tlaxcala	K-1	Sospechoso	0.176	23.18	Sospechoso	Sospechoso
Tlaxcala	K-IA	Sospechoso	0.620	82.50	Positivo	Positivo
Tlaxcala	M1	Sospechoso	0.240	31.73	Positivo	Positivo
Tlaxcala	Roja	Sospechoso	0.244	32.26	Positivo	Positivo
Tlaxcala	s/oreja	Sospechoso	0.490	65.13	Positivo	Positivo