



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Respuesta serológica de ovinos vacunados y
revacunados contra linfadenitis caseosa.**

Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista.

Presenta:

Eloy Pérez Cabrera

Asesor: Dr. José Francisco Morales Álvarez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Respuesta serológica de ovinos vacunados y revacunados contra linfadenitis caseosa

Que presenta el pasante: PÉREZ CABRERA ELOY
Con número de cuenta: 40703991-9 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán zcalli, Méx. a 11 de septiembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
SECRETARIO	Dr. José Francisco Morales Álvarez	
1er. SUPLENTE	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Eréndira De la Fuente Mancera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/nrm*

Dedicatoria

A mis padres:

Juana y Rodrigo, por su apoyo a lo largo de todos estos años.

Mi esposa:

Aide Jocelin, gracias por el cariño, paciencia y por motivarme a seguir adelante.

Agradecimientos

Al Dr. José Francisco Morales Álvarez por sus enseñanzas y la paciencia al realizar este trabajo.

M. en C. Guadalupe Martínez por su ayuda en las pruebas de laboratorio.

A mis amigos Carlos, Octavio y Armando por su amistad y ayuda.

.Al M.V.Z. Saúl A. Rodríguez Zamora y M.V.Z. Eduardo Rodríguez Santiago por darme la oportunidad de colaborar con ustedes.

Índice

1.- Resumen	5
2.- Introducción.....	6
3.- Justificación.....	12
4.- Objetivos.....	13
5.- Hipótesis.....	13
6.- Metodología.....	14
7.- Resultados.....	18
8.- Discusión.....	29
9.- Conclusiones.....	33
10.- Bibliografía.....	34

1.- Resumen

La linfadenitis caseosa es una enfermedad causada por la bacteria Gram positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis* y afecta principalmente a ovinos y caprinos. Clínicamente se caracteriza por la formación de abscesos en linfonodos superficiales y de forma visceral, se caracteriza por la pérdida de peso gradual y afección de linfonodos internos, siendo esta última la forma más difícil de diagnosticar. En México, no se dispone de biológicos para la prevención de la enfermedad, por ello es de gran importancia realizar investigación y desarrollar herramientas para el control de la linfadenitis caseosa. El objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta serológica contra antígenos somáticos (obtenidos por sonicación), de secreción (Fosfolipasa D) y de superficie (BCPE, DCPE y Vapor fluente) en ovinos vacunados y revacunados con un biológico experimental tipo bacterina-toxoide contra la linfadenitis caseosa ovina. Se formaron 3 grupos de ovinos: Un grupo vacunado y dos grupos control sin vacunar. Se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero cada semana, antes y después de la vacunación y revacunación por un periodo de dos meses. A estos sueros se les realizó prueba de ELISA indirecto utilizando diferentes antígenos obtenidos por los siguientes métodos: sobrenadante rico en fosfolipasa D, extracto sonicado, extracto proteico de pared celular (BCPE); Extracto proteico de pared celular por desnaturalización química más calor (DCPE); y vapor fluente. Además estos antígenos fueron obtenidos de 2 cepas diferentes: Robus y ATCC 19410. Los resultados mostraron una respuesta adecuada a todos los antígenos a la vacunación. Sin embargo, los antígenos que mejor comportamiento tuvieron fue el antígeno obtenido por sonicación y el sobrenadante rico en fosfolipasa D. Esto es importante porque la fosfolipasa D es el principal factor de patogenicidad de la bacteria. Así mismo, los antígenos obtenidos de la cepa silvestre nacional (cepa Robus), en general tuvieron un mejor índice de detección. En conclusión, la vacunación contra la linfadenitis caseosa, utilizando un biológico tipo bacterina-toxoide, puede ser una alternativa para la prevención de esta enfermedad considerando la buena respuesta antigénica observada en este trabajo.

2.- Introducción

La linfadenitis caseosa es una enfermedad infecciosa de curso crónico, la cual afecta a ovinos y caprinos; es causada por la bacteria Gram positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Se caracteriza por lesiones supurativas y necrozantes en linfonodos, pulmones y otros órganos viscerales. Causando pérdidas económicas al afectar la calidad de la canal y la lana. (1, 2,3).

2.1.- Agente etiológico

Corynebacterium pseudotuberculosis es una bacteria Gram positiva, con morfología cocoide, filamentosa y bacilar (pleomorfismo). En los frotis aparece agrupado en empalizadas y racimos angulares recordando a las letras chinas. La mayoría de las bacterias del género *Corynebacterium* son catalasa positivas, anaerobias facultativas no forman esporas, intracelulares facultativas y necesitan medios enriquecidos para crecer (4, 5).

Corynebacterium pseudotuberculosis tiene similitud con los géneros de *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (grupo CMRN) debido a los altos contenidos de guanina y citosina; y una organización específica de la pared celular, compuesta de peptidoglicano, arabinogalactan y ácidos micólicos. Aunque las cadenas de ácidos micólicos de *Corynebacterium* son considerablemente más cortas (28 – 40 carbonos) que las de *Mycobacterium* (60 – 90 carbonos) y *Nocardia* (40 – 56 carbonos) y por lo general son saturadas y tienen doble enlace (5).

Las colonias de *C. pseudotuberculosis* son: pequeñas, blanquecinas, rodeadas de una estrecha zona de hemólisis completa en agar sangre, que es evidente hasta las 48 horas y tras varios días suelen ser secas, friables y de color crema. Se reconoce dos biotipos para *C. pseudotuberculosis* las cepas ovinas y caprinas que no reducen nitratos y las cepas equinas y bovinas que si los reducen (4, 6).

2.2.- Factores de Patogenicidad

C. pseudotuberculosis es un patógeno intracelular facultativo, capaz de replicarse y sobrevivir en el interior de los fagocitos. La virulencia está dada por los lípidos de pared celular y a la producción de la fosfolipasa D (FLD) (4).

La FLD es una proteína de 31 kDa, esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar la esfingomielina de las membranas celulares, liberando colina y contribuyendo a la difusión de la bacteria (factor de dispersión). Esta toxina tiene actividad en las células del endotelio y produce lisis de eritrocitos de ovino y bovino. Además de un efecto citotóxico en macrófagos de caprinos (1, 2, 4, 5).

La capa lipídica de la pared actúa como elemento quimiotáctico para los fagocitos, además de tener efecto leucotóxico causando degeneración y lisis. Además le da a la bacteria resistencia al medio ambiente, contribuye a la formación de abscesos y proporciona resistencia a las enzimas líticas del lisosoma (7,8).

2.3.- Especies afectadas

Los ovinos y caprinos son las principales especies afectadas, además se ha aislado en rumiantes silvestres como las gamuzas en Francia, los ciervos en Estados Unidos y cabras silvestres en Australia. Esto indica que la enfermedad no es poco común en estas especies salvajes sin embargo no indica nada sobre el origen exacto de la infección, es decir si fue a causa de estar en contacto con animales domésticos o son reservorios de la enfermedad (2).

2.4.- Patogénesis.

La linfadenitis caseosa es considerada una enfermedad de los ovinos y caprinos adultos, la presencia de abscesos es la forma más frecuente en la que se presenta la enfermedad en ovinos y caprinos de más de un año de edad. La forma más común de transmisión es por lesiones contaminadas de la piel por equipo de esquileo, baños y superficies contaminadas (9).

La bacteria se multiplica localmente formando abscesos, *C. pseudotuberculosis* es fagocitado por macrófagos pero el organismo sigue siendo viable, posteriormente es transportado a los nódulos linfáticos regionales causando abscesos caseosos y necrosis. La fosfolipasa D inhibe la quimiotaxis, evita la degranulación de células fagocíticas y además activa el sistema del complemento por la vía alterna causando necrosis. La bacteria tiene la capacidad de utilizar hierro extracelular a través de sus proteínas: serinas y proteasas, para desarrollar condiciones hostiles (10).

Se ha planteado que la inmunidad celular juega un papel primordial como mecanismo inmunológico en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, al ser *C. pseudotuberculosis* una bacteria compleja se involucran al mismo tiempo mecanismos tanto humorales como y celulares (2,11).

2.5.- Signos clínicos y lesiones.

El principal signo clínico es el aumento de tamaño de los linfonodos superficiales, principalmente de la cabeza y el cuello, con pérdida de pelo sobre estas lesiones, pueden romperse y liberar secreción purulenta pastosa, cremosa blanco amarillenta e incluso de color verdoso (1, 6,10).

La forma de presentarse la enfermedad en la visceral, debido a que los abscesos se presentan en órganos internos principalmente pulmón, hígado y linfonodos mesentéricos. Esta forma de la enfermedad se presenta de forma subclínica, los animales se ven “sanos”, algunos animales presentan cuadros de neumonía crónica y adelgazamiento progresivo es parte del “síndrome de la oveja flaca” (1, 6,10, 12).

2.6.- Tratamiento

A pesar de que la bacteria es sensible a penicilina y otros antibióticos, no se debe de dar tratamiento debido a que la bacteria es intracelular y se encuentra encapsulada en los abscesos. Lo más recomendable es debridar el absceso y lavar con una solución antiséptica (1, 6,10, 12).

2.7.- Diagnóstico

La identificación del agente se realiza mediante su aislamiento e identificación a partir de material purulento, los medios de rutina utilizados son agar sangre. Las placas se incuban a 37 °C durante 24 -48 horas (4).

Debido a la respuesta humoral a la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* se ha desarrollado pruebas serológicas: difusión en gel y ELISA (1,13).

Inmunodifusión en gel de agarosa: Es una prueba que evalúa la inmunidad humoral, consiste en utilizar un gel de agarosa, en el que se difunden el antígeno y el anticuerpo de manera radial desde pocillos separados en la placa, estableciéndose entre ellos un gradiente de concentración después del periodo de incubación en un ambiente húmedo. Se considera que tiene una sensibilidad del 52.63 % y una especificidad del 70.59% (13, 14).

Prueba de inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA): es una prueba de unión primaria que detecta un enlace específico de antígenos – anticuerpos y cuantifica los inmunocomplejos formados mediante un marcador enzimático que actúa como sustrato cromogénico. Se ha empleado pared celular o toxina de *C. pseudotuberculosis* tiene buena sensibilidad pero una especificidad moderada. En Holanda se empleó esta prueba en programas de erradicación contra linfadenitis caseosa (1, 6 14).

2.8.- Control

El control de linfadenitis caseosa es laborioso, difícil y es importante realizar el diagnóstico apoyado con pruebas serológicas para identificar y eliminar animales infectados, es importante también implementar medidas higiénicas como la desinfección de material quirúrgico, equipo de esquileo (1).

En países donde la enfermedad es endémica se recomienda la vacunación de los animales se han desarrollado diferentes vacunas (6).

Bacterinas: Las primeras bacterinas fueron probadas en Argentina, las cuales contenían *C. pseudotuberculosis* inactivados con formalina. Estas bacterinas disminuyen los efectos de la enfermedad en un 60%, pero no de las lesiones (3, 11).

Bacterina - Toxoide: debido a que la fosfolipasa D juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad, en Australia, en 1978, se comenzaron a producir las primeras bacterinas toxoides el cual contenía fosfolipasa D purificada. Este toxoide evita la aparición de la forma clínica de la enfermedad entre 70 – 80% (3, 11).

Vacunas combinadas: Se generó un compuesto de Fosfolipasa D con bacterias, además como adyuvante contiene aluminio en hidrogel. Se considera que proporciona una protección más completa, sin embargo algunos toxoides comerciales han dado resultados similares (3, 11, 15).

Vacunas vivas: son vacunas que ofrecen una buena respuesta humoral y celular, sin embargo a dosis elevadas generan la formación de abscesos en el sitio de inoculación (11).

En México se han realizado diversos trabajos sobre biológicos, Morales (16) en 1991, realizó un trabajos donde se inoculo una bacterina absorbido en hidróxido de aluminio con una concentración 3×10^9 / ml a tres grupos de cuyos. El grupo A se vacunó con la bacterina sin diluir vía subcutánea, al grupo B se vacunó con la bacterina diluida 1:10 y al grupo C se le administro agua destilada. Posteriormente se revacuno a los 21 días, y al día 34 se realizó la prueba de intradermorreacción; esta prueba se realizó con la toxina cruda y antígenos celulares completos. Al día 37 se realizó la lectura además determinaron en el grupo A no presentaron dermonecrosis ni problemas de mortalidad, el grupo B tuvo problemas de dermonecrosis y 10% de mortalidad y el grupo C tuvo problemas de dermonecrosis y mortalidad del 40%. Además se realizó pruebas de aglutinación en tubo dando como resultados el grupo A con mayores títulos de anticuerpos (16).

Ibarra (17) 2017, realizó un estudio donde se evaluó la respuesta inmune celular y humoral en ratones utilizando una cepa mutante de *C. pseudotuberculosis* en el gen aroA, que les permita resistir al desafío con la cepa virulenta. Se determinó que esta

cepa mutante genera producción de anticuerpos en suero y no generó una adecuada respuesta celular y solo protegió parcialmente en un 50% a los ratones frente al desafío experimental (17).

3.- Justificación

En el 2015 se calculó una población de 8.7 millones de ovinos en México y datos del último censo agropecuario indican 53 mil unidades de producción pecuaria dedicadas a esta actividad. Esto quiere decir que la ovinocultura representa una de las principales actividades pecuarias del país (18).

En el caso de la linfadenitis caseosa, ésta es una enfermedad que genera pérdidas económicas a causa de la eliminación prematura de animales, baja producción de lana y depreciación de la canal, además de disminuir los parámetros productivos de las ovejas. En México, no existen cifras oficiales que indiquen la prevalencia de la enfermedad pero a nivel mundial se tiene una estimación de 50 – 60% (13).

En México, no se dispone de biológicos para la prevención de la enfermedad por ello es de gran importancia realizar investigación para desarrollar herramientas para el control de la linfadenitis caseosa.

4.- Objetivos

Evaluar la respuesta serológica contra antígenos somáticos, de secreción y superficie, en ovinos vacunados y revacunados con un biológico experimental, tipo bacterina-toxoide contra la linfadenitis caseosa ovina.

5.- Hipótesis

Si los animales son inoculados con un biológico tipo bacterina-toxoide contra la Linfadenitis caseosa, entonces éstos animales tendrán una respuesta serológica contra antígenos de superficie, somáticos y de secreción de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Esta respuesta se incrementará de manera significativa después de una revacunación.

6.- Metodología

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal (CENID), en el Laboratorio de Diagnóstico. Se utilizó un total de 33 corderos entre 3 y 6 meses de edad provenientes de unidades de producción ovina sin antecedentes clínicos de la enfermedad.

Se formaron 3 grupos de corderos respectivamente,

- Grupo 1 (vacunados): se conforma con 20 corderos, se vacunaron y revacunaron con 2 ml vía subcutánea con la vacuna experimental tipo bacterina-toxoide contra la Linfadenitis caseosa. Este biológico contenía una concentración de 1×10^9 UFC/mL de bacterias inactivadas con formalina al 0.4 % y enriquecido con un sobrenadante de cultivo de 48 horas de incubación a 37 °C.
- Grupo 2 (control 1): El grupo de 10 corderos, al cual solo se le aplicó solución salina fisiológica estéril por vía subcutánea.
- Grupo 3 (control 2): Formado por 3 corderos, los cuales no recibieron ningún tratamiento.

Se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero cada semana antes y después de la vacunación por un periodo de dos meses.

Las muestras de suero fueron conservadas en congelación hasta su uso a -20 °C. Todas las muestras de suero fueron procesadas hasta el final del experimento. Para la detección de anticuerpos contra antígenos somáticos, antígenos de secreción y antígenos solubles se utilizó prueba de ELISA indirecta.

6.1.- Obtención de Antígenos

Los antígenos que se utilizaron para estas pruebas consisten en un sobrenadante crudo del cultivo en medio líquido de *C. pseudotuberculosis* rico en Fosfolipasa D, un extracto proteico de pared celular obtenido por desnaturalización química más calor (DCPE) y un extracto proteico obtenido únicamente con calor (BCPE), un antígeno obtenido mediante sonicación y un antígeno obtenido por vapor fluente.

El procedimiento para la extracción de todos los antígenos mencionados y que se describen a continuación, fueron obtenidos a partir de dos cepas diferentes de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Una fue obtenida en México a partir de un aislado de campo en el estado de Tlaxcala a partir de un absceso de un semental ovino de aproximadamente 3 años de edad, la cual fue caracterizada bioquímicamente y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cepa "ROBUS". La otra cepa fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) No. 19410 (22).

Extracto proteico de pared celular (BCPE). Es un antígeno de superficie y para obtenerlo se cultivó *Corynebacterium pseudotuberculosis* en agar sangre ovina a 37°C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas. Las colonias obtenidas se cosecharon y se suspendieron en PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos), posteriormente se centrifugó a 1.6 g (gravedad) y se eliminó el sobrenadante, este proceso se repitió 3 veces (13).

El sedimento se resuspendió en PBS y se calentó a 100 C° durante 5 minutos, después se centrifugó y el sobrenadante se utilizó como antígeno proteico de pared celular.

Extracto proteico de pared celular por desnaturalización química más calor (DCPE). Es un antígeno de superficie y para obtenerlo se cultivó *C. pseudotuberculosis* en agar sangre ovina a 37°C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas. Las colonias obtenidas se cosecharon y se suspendieron en PBS, posteriormente se centrifugó a 1.6 g y se eliminó el sobrenadante, este proceso se repitió 3 veces.

El sedimento obtenido después de los lavados se re suspendió en 5 ml de solución amortiguadora de preparación de antígeno (0.5 M Tris pH6.8; 5.2 % SDS; 8.7% 2 – mercaptoetanol) se hirvió a 100C° por 5 minutos. Se centrifugó a 1.6 g rpm y el sobrenadante se utilizó como antígeno.

Extracto de antígeno por vapor fluente: Este antígeno de superficie se obtuvo cultivando *Corynebacterium* en agar sangre ovina a 37°C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas. Las colonias obtenidas se cosecharon y se suspendieron en 10 ml de SSF (solución salina fisiológica). Se centrifugó a 0.94 g por 30 minutos.

Se eliminó el sobrenadante y se vuelve a reconstituir para lavar las células y volver a centrifugar. Después de hacer este procedimiento, finalmente se reconstituye con SSF y se coloca por 30 minutos en la autoclave a vapor fluente (sin presión). Después de este tiempo se dejó enfriar por 30 minutos y se centrifugó por 30 minutos a 0.94 g para poder recuperar el sobrenadante.

Se dializó con 2 cambios de agua destilada, se centrifugó a 2.09 g durante 50 minutos, se repite 2 veces dejando reposar 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se filtró con membranas de 0.45 µM de diámetro.

Extracción de antígeno por sonicación: Se cultiva *Corynebacterium* en agar sangre ovina a 37°C bajo atmósfera de oxígeno por 48 horas. Las colonias obtenidas se cosecharon y se suspendieron en 10 ml de solución salina fisiológica (SSF). Se inactiva a baño maría a 90°C durante 15 minutos.

Se procedió a sonicar 10 ciclos de 30 segundos y posteriormente 30 segundos de descanso, para este procedimiento se utilizó un sonicador. Al final de este proceso, se centrifugó a 0.94 g durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 1.29 g por 6 minutos. El sobrenadante que contenía todas las fracciones celulares y denominados “antígenos somáticos” se utilizó como antígeno de prueba.

Sobrenadante rico en fosfolipasa D. Este antígeno de secreción se obtuvo cultivando *C. pseudotuberculosis* en un medio de agar sangre ovina a 37 °C por 48 horas. 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 x 10⁶ colonias a 400ml de medio PPLO.

Se dejó incubar a 37°C en agitación bajo atmósfera de oxígeno por 72 horas. 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°C (13).

6.2.- Prueba de ELISA indirecta

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 (13).

Para la realización de la prueba de ELISA se utilizaron los siguientes antígenos: De superficie (DCPE, BCPE y Vapor Fluente), Somáticos (extracto de antígeno por sonicación) y de secreción (un sobrenadante de cultivo de *C. pseudotuberculosis* de 48 horas). Además se hizo por duplicado utilizando la cepa Robus y 19410.

Para realizar la prueba se antígeno y sensibilizó la placa con los respectivos antígenos utilizados; se dejó incubar 24 horas a 4°C y se lavó 4 veces con PBS Tween 20; se bloqueó con leche descremada al 2% por 1 hora a 37 C°; se lavó 4 veces con PBS Tween 20 y posteriormente se secó; se colocó el anticuerpo primario (suero problema) y se incubó 1 hora a 37C°; se lavó la placa 4 veces con PBS Tween 20 y se colocó como anticuerpo secundario conjugado anti IgG ovino (antiglobulina G ovina Peroxidase-conjugated

AffiniPure Rabbit AntiSheep IgG (H+L) code: 313-035-003) en una dilución 1:1000; por 1 hora a 37 C°. Se lavó 4 veces con PBS Tween 20 y se colocó ABTS (revelador) se dejó reposar por 15 minutos y finalmente se realizó la lectura con una longitud de onda de 450.

6.3.- Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó la prueba de análisis de varianza con $p = < 0.05$.

7.- Resultados

7.1.- Cinética de la respuesta serológica a los diferentes antígenos.

7.2.1.- Resultados con antígeno sonicado.

a) Cepa 19410

La Figura 1, muestra la respuesta serológica de los diferentes grupos experimentales a los antígenos somáticos de *C. pseudotuberculosis*. Se observa que en la semana 1 los corderos de todos los grupos tienen niveles similares de anticuerpos. A partir de la segunda semana se observó un incremento de los niveles de anticuerpos en el grupo de animales inmunizados, posterior a la cuarta semana, la cual corresponde a la revacunación, hubo un incremento muy marcado de anticuerpos en el grupo vacunado comparado con el grupo testigo y control.

Después de la semana 8, cuando se desafiaron los grupos vacunado y control 1, se observó un incremento ($p < 0.005$) de anticuerpos en estos grupos con respecto al grupo control 2.

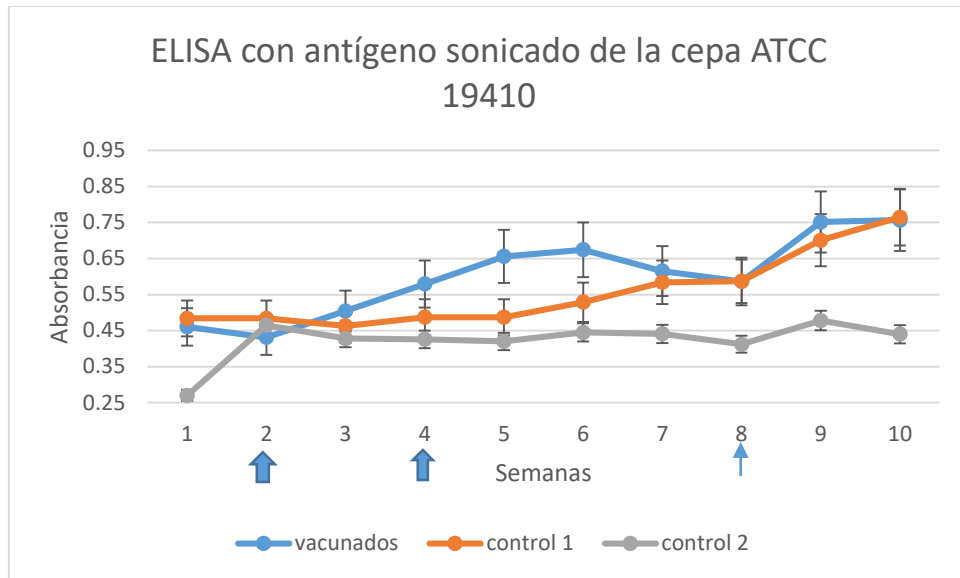


Figura 1. Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos sonicado de la cepa 19410 de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

b) Cepa Robus

En la Figura 2, se observó un incremento gradual de los niveles de anticuerpo en los vacunados a partir de la segunda semana posvacunación. Posterior a la semana 8 se notó un incremento ($p < 0.05$) de anticuerpos siendo muy similares entre el grupo control 1 y vacunados. En el caso del grupo control 2 los niveles de anticuerpos se mantuvieron constante a lo largo del experimento.

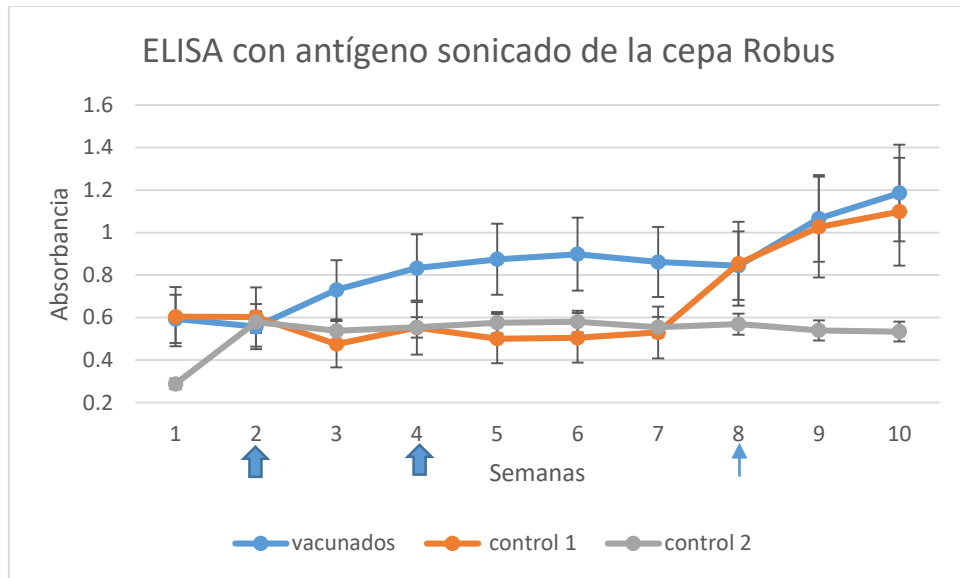


Figura 2 Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos sonicado de la cepa Robus de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

7.2.2.- Resultados con antígeno BCPE

a) Cepa 19410

En la Figura 3, se observó un incremento ($p < 0.05$) de anticuerpos en el grupo vacunado a partir de la semana 2. Después de la revacunación hay un incremento mayor, en la semana 6 disminuye y después del desafío en la semana 8 el grupo vacunado y control 1 son similares ($p > 0.05$), mientras que el grupo control 2 es diferente ($p < 0.05$).

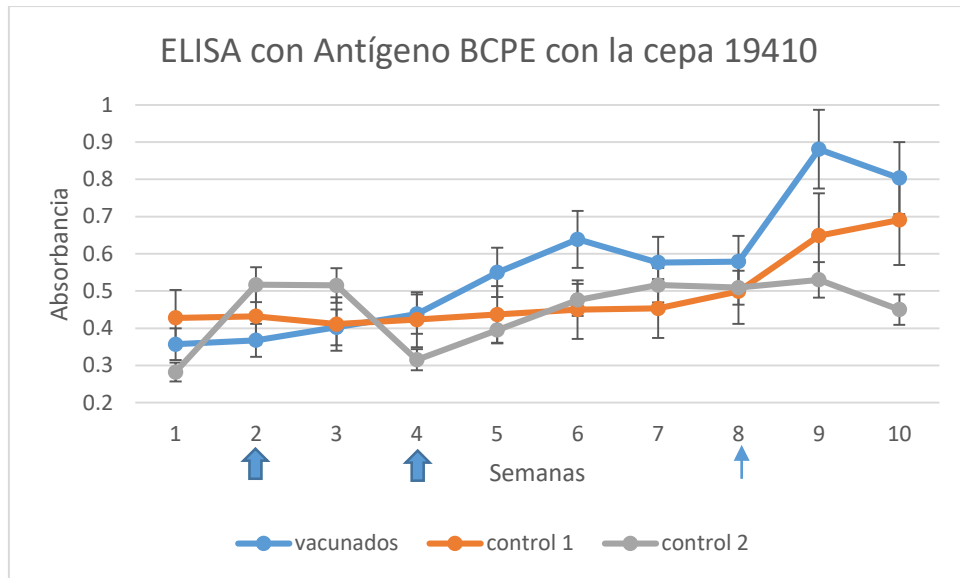


Figura 3. Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos BCPE de la cepa 19410 de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

b) Cepa Robus

En la Figura 4, se muestra la respuesta serológica a los antígenos de superficie de *C. pseudotuberculosis*. En la tercera semana se observó un incremento de los niveles de anticuerpos en el grupo vacunado. En la semana 8 el grupo vacunado y el grupo control 1 tienen niveles de anticuerpos similares ($p > 0.05$), mientras que el grupo control 2 se mantiene constante.

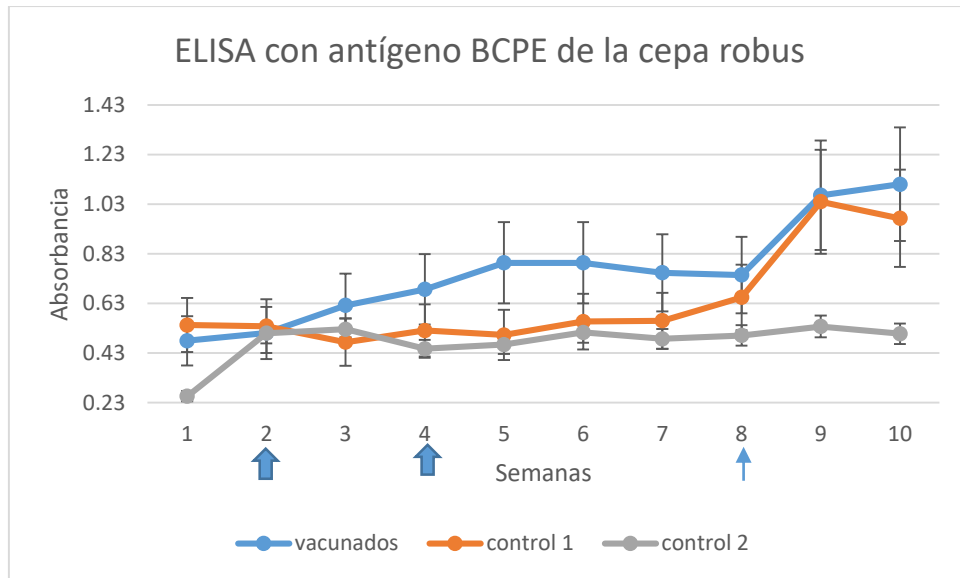


Figura 4. Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos BCPE de la cepa Robus de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

7.2.3.- Resultados con antígeno DCPE

a) Cepa 19410

En la figura 5, se observó una diferencia significativa posterior a la semana 4 y 8 del grupo vacunados ($p < 0.05$). Los grupos control 1 y control 2 se mantuvieron sin cambios y ambos fueron muy similares ($p > 0.05$).

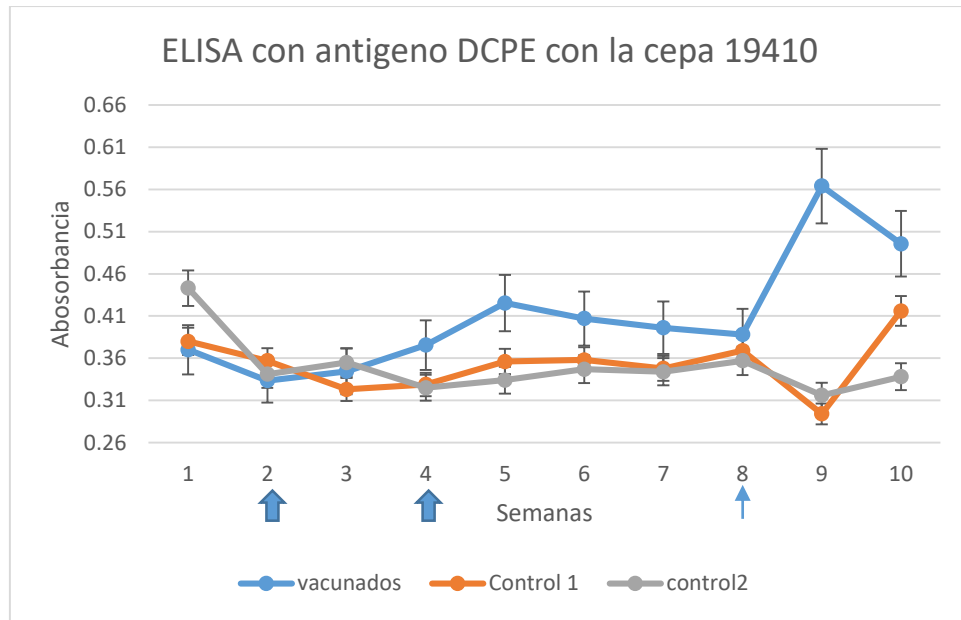


Figura 5. Promedios \pm Desviación estándar (DE) de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos DCPE de la cepa 19410 de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

b) Cepa Robus

En la figura 6,

En la Figura 6, se muestra que el grupo control 2 se mantiene debajo de los demás grupos, y posterior a la semana 8 los grupos vacunado y control 1 incrementan ($p < 0.05$) significativamente en anticuerpos a comparación del grupo control 2.

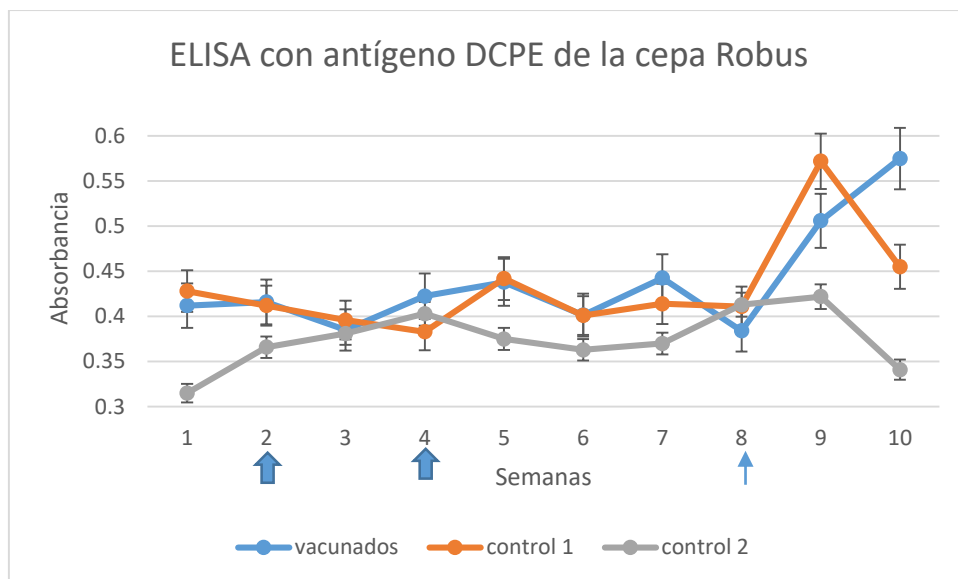


Figura 6. Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos DCPE de la cepa Robus de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

7.2.4.- Respuesta con sobrenadante de 48 horas

a) Cepa 19410

En la figura 7, se observó que el grupo que presentó una diferencia significativa es el vacunado, hay un incremento significativo ($p < 0.05$) en la semana 8.

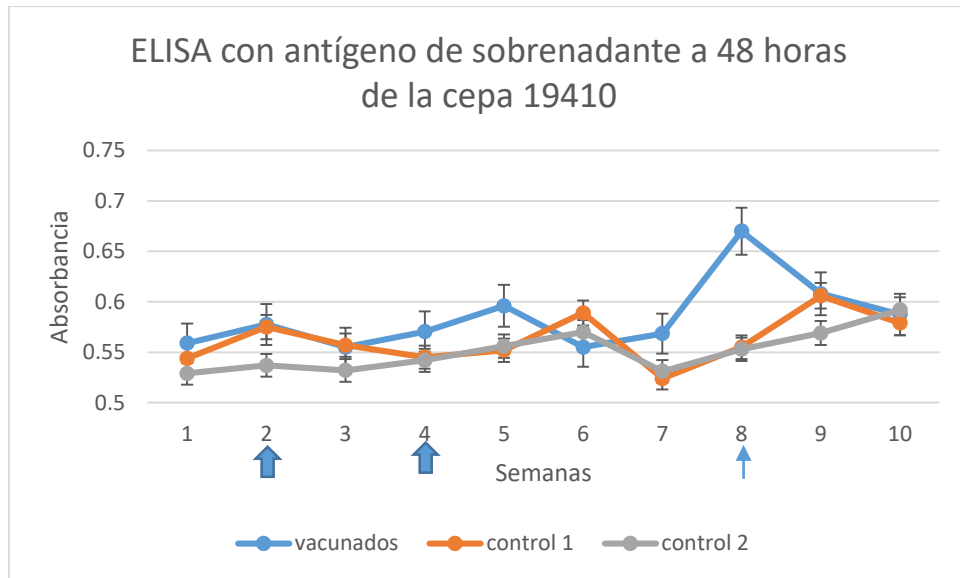


Figura 7. Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos sobrenadante de la cepa 19410 de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

b) Cepa Robus

La Figura 8, se observó que después de la vacunación hay un incremento ($p < 0.05$) de los niveles de anticuerpos en el grupo vacunado y posteriormente va en descenso. El grupo control 1 incrementó los anticuerpos en la semana 9 de manera significativa ($p < 0.05$).

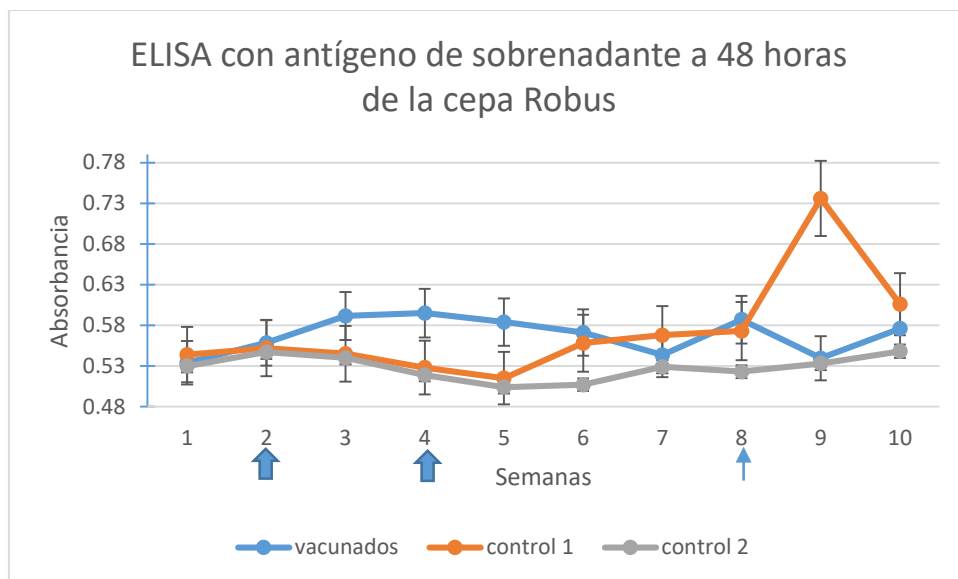


Figura 8. Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos sobrenadante de la cepa Robus de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

7.2.5.- Respuesta con Antígeno obtenido por vapor fluente.

a) Cepa 19410

En la Figura 9, el grupo vacunado muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) a comparación de los demás grupo además desarrolla mayor respuesta, tanto a la vacunación, revacunación y al desafío.

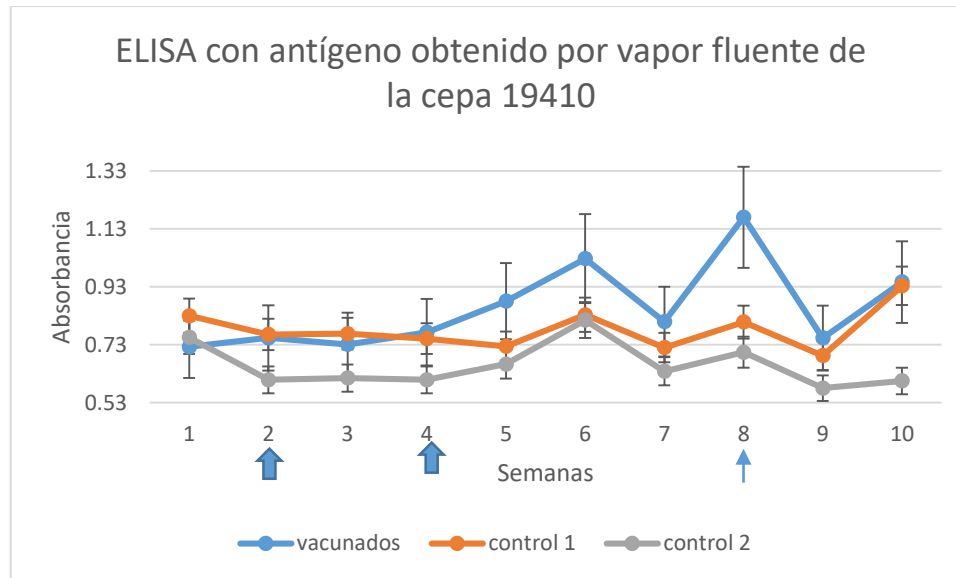


Figura 9. Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos Vapor fluente de la cepa 19410 de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

b) Cepa Robus

El grupo vacunado, muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) posterior a la revacunación y al desafío comparado con los demás grupos.

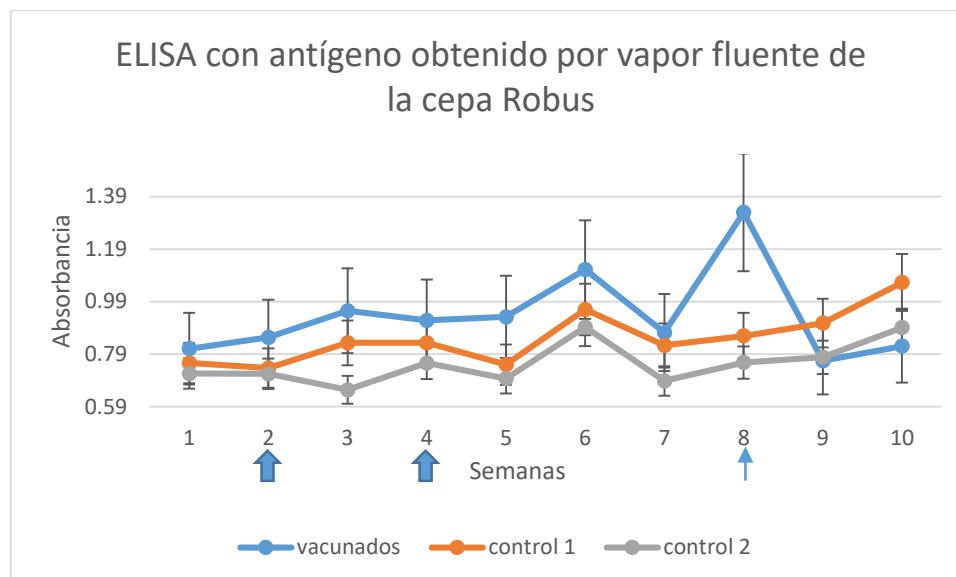


Figura 10. Promedios \pm Desviación estándar de los niveles de IgG sérica, que reconocen antígenos Vapor fluente de la cepa Robus de *C. pseudotuberculosis* de ovinos vacunados y revacunados. Semana 2 vacunación, Semana 4 revacunación y semana 8 desafío.

7.2.- resultados generales

7.2.1.- Anticuerpos inducidos por la vacunación

Los animales que fueron inmunizados con el biológico experimental, tipo bacterina-toxoide para la prevención de la Linfadenitis caseosa, mostraron incrementos significativos ($p < 0.05$) en su respuesta serológica para los diferentes antígenos utilizados en la prueba de ELISA. Esta diferencia se observó en los animales inmunizados respecto a los animales del grupo no inmunizado y no hubo diferencia significativa en la respuesta serológica para los diferentes antígenos evaluados (BCPE, DCPE, Vapor Fluente, Sonicado y PLD), ni tampoco entre el origen de los antígenos (cepa ROBUS y 19410).

8.- Discusión

En el presente trabajo se evaluó la respuesta serológica inducida por el biológico experimental tipo bacterina – toxoide hacia los diferentes antígenos de *C. pseudotuberculosis*. De los antígenos utilizados se observó una mayor respuesta para los antígenos obtenidos por el método de sonicación y los extraídos por calor (BCPE).

En estudios realizados en el Reino Unido, utilizando antígenos obtenidos por sonicación y sueros provenientes de ovinos clínicamente enfermos de Linfadenitis Caseosa, se obtuvo una sensibilidad del 83% y una especificidad del 71 %, lo que la hace una técnica confiable al utilizar este tipo de antígenos (19). En el presente estudio también se demostró, que en animales vacunados contra la linfadenitis caseosa, los animales producen anticuerpos de manera importante contra antígenos somáticos y de superficie de la bacteria. Esto se puede explicar porque la respuesta hacia los antígenos sonicados se debe a que en el método empleado, se genera lisis celular y se obtienen antígenos de superficie y somáticos de manera íntegra y sin desnaturalización de proteínas.

En el caso del antígeno obtenido por calor (BCPE), se obtienen antígenos más íntegros, a comparación de los antígenos obtenidos por calor y desnaturalización química (DCPE). De estos dos métodos, la BCPE resultó más útil para evaluar antígenos de superficie. En el trabajo realizado por Corona (13), en 2011, donde se utilizaron estos dos métodos, se observa cierta discrepancia con el trabajo actual, debido a que este autor determinó una mayor eficiencia en el diagnóstico utilizando como antígeno de detección los obtenidos por el método DCPE. Sin embargo, en el trabajo de Corona, los individuos bajo estudio, fueron animales con signología clínica de la enfermedad (animales enfermos) y en condiciones de campo. Es probable, que la infección activa, induzca una respuesta diferente en los animales, comparada con los anticuerpos inducidos por vacunación, ya que en la infección activa, y tratándose de un agente intracelular facultativo, el procesamiento de antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), trae como consecuencia una respuesta inmune diferente (13, 14).

En otros trabajos, se han desarrollado otros métodos de extracción por calor, en el que la metodología utiliza diferentes temperaturas para obtener los antígenos, con resultados poco satisfactorios (8).

Al evaluar la respuesta de los anticuerpos, utilizando antígenos de secreción entre los que se encuentra la Fosfolipasa D de *C. pseudotuberculosis* se observó una buena respuesta contra este antígeno. Esto es importante porque la fosfolipasa D es el principal factor de virulencia de la bacteria (20) y la presencia de anticuerpos neutralizantes de la toxina es sinónimo de protección o respuesta inmune. Hoelzle *et al* (21) 2013, determinaron en un experimento, que el uso de PLD como antígeno detectó el 100% de caprinos infectados y solo el 70% de los ovinos infectados. Sin embargo, estos mismos autores mencionan, que para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa, no es suficiente la detección de un solo antígeno. Ellos determinaron que la combinación en la detección de proteínas inmunodominantes (150, 74, 48, y 30 kDa) de la bacteria y los antígenos de secreción, como la PLD incrementan la capacidad diagnóstica de la enfermedad (21).

Al utilizar antígenos obtenidos por vapor fluente, se obtuvieron buenos resultados en la prueba de ELISA en animales vacunados, esto puede deberse a que se utilizó calor continuo y presión moderada, por lo que pudieron mantenerse integras muchas proteínas de la bacteria.

Por otro lado, de las dos cepas de *C. pseudotuberculosis* utilizadas para este trabajo, se encontraron mejores resultados empleando la cepa "Robus", a comparación con la cepa 19410. Esto puede deberse a que la cepa "Robus" es una cepa recientemente obtenida en México de un absceso subcutáneo, mientras que la cepa 19410 es una cepa de referencia obtenida en Estados Unidos de glándula mamaria de una oveja (13, 22). Se ha demostrado la presencia de diferencias fenotípicas entre cepas de *C. pseudotuberculosis* dependiendo de su origen. Estas diferencias, se sugiere pueden ser debidas a mecanismos de mutación, adaptación, o regulación genética de la bacteria, en diferentes ambientes oxidativos o de disponibilidad de sustratos (23). Aunque las cepas utilizadas en el presente trabajo tienen un origen similar con respecto al daño, los sitios anatómicos afectados son diferentes, además de que la

cepa de referencia 19410 tiene mayor tiempo de aislamiento a comparación con la cepa Robus. (22)

En muchos países se han desarrollado una gran variedad de ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*, sin embargo, en la mayoría de los casos éstos no están disponibles de manera comercial. Por ejemplo, en un estudio realizado por Dercksen, et al 2000, se desarrollaron 4 métodos de ELISA donde destacan el ELISA indirecto y Doble Sándwich. Demostrando que ELISA doble sándwich utilizando como antígeno PLD purificado y sueros hiperinmunes tiene mayor sensibilidad 79% y especificidad 99%, considerándolo una prueba apta para llevar a cabo erradicación de la enfermedad (24).

También, los métodos de ELISA, han sido utilizados para dar seguimiento a las respuestas serológicas inducidas por vacunación, por ejemplo, Hodgson et al (25) en 1999 evaluaron y dieron seguimiento a grupos de ovinos vacunados con una bacterina que contiene sobrenadante rico en PLD; y otra vacuna PLD recombinante. Encontrado que el ELISA, utilizando como antígeno sonicado y toxoide, fue un método adecuado para medir la respuesta inmune humoral frente a la PLD. Los resultados obtenidos en el estudio mencionado indicaron que la vacuna con toxina inactivada con formalina dio un 95% de protección frente a la vacuna con PLD recombinante el 44% (19). También se demostró que la fosfolipasa D es un antígeno que induce una respuesta de protección, y que derivó en el desarrollo de un toxoide eficaz denominado Glanvac 22 – 24 en 1984 en Australia. Esta vacuna ha demostrado un efecto protector en diferentes desafíos contra *C. pseudotuberculosis* (25).

En reino Unido realizaron un estudio utilizando diferentes vacunas contra *C. pseudotuberculosis*, un derivado recombinante de Fosfolipasa D, una bacterina con formalina y una bacterina con Fosfolipasa D recombinante. Para poder evaluar la respuesta a la vacunación y la infección. En estos trabajos también se realizó el seguimiento con pruebas de ELISA empleando PLD como antígeno y sueros antiPLD; se determinó que las vacunas que contienen Fosfolipasa D proporcionan una

protección estadísticamente significativa, además de evitar la diseminación de la enfermedad y evitar su presentación visceral (26).

Como se ha mencionado en diferentes estudios realizados, la prueba de ELISA ha sido una herramienta fundamental para realizar seguimiento epidemiológico y para evaluar los biológicos que se han desarrollado. Sin embargo así como en México y otros países carecen de pruebas estandarizadas para realizar estudios, por lo que ha sido necesario trabajar en diferentes métodos para obtener antígenos útiles para el diagnóstico y la evaluación de la respuesta inmune de animales vacunados. Es importante utilizar las cepas de *C. pseudotuberculosis* que prevalecen en determinadas regiones geográficas para obtener resultados más precisos.

9.- Conclusiones.

- En el presente trabajo fue posible obtener antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a través de diferentes métodos, con lo cual fue posible evaluar la respuesta serológica contra estos antígenos en corderos vacunados.

- Los antígenos obtenidos se utilizaron para dar el seguimiento de la respuesta a la vacunación de ovinos a través de una prueba de ELISA indirecta.

- Los antígenos obtenidos por sonicación y el sobrenadante rico en Fosfolipasa D, mostraron la mejor respuesta serológica en los animales vacunados.

- Los antígenos obtenidos de la cepa nacional, tuvieron un mejor comportamiento en el reconocimiento de sus antígenos en animales vacunados.

- La vacunación contra la linfadenitis caseosa, utilizando un biológico tipo bacterina-toxoide, puede ser una alternativa para la prevención de esta enfermedad considerando la buena respuesta antigénica observada en este trabajo.

10.- Bibliografía.

1. Martín WB, Aitken ID. Enfermedades de las ovejas, 2ª ed., editorial Acribia, Zaragoza España, 2000. PP. 329
2. Charles LP Blancow J, Chermette, Vilenberg G. Infectious and parasitic diseases of livestock, vol. 2. 2010, France.
3. Windsor PA. Control of caseous lymphadenitis, Vet clin Food animal 27; 2011: 193 – 202.
4. Quinn PJ, Markey BK. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Acribia. España. 2004.
5. McVex S, Kennedy M Chengappa. Veterinary Microbiology. 3º Ed. Wiley – Black well. India. 2013.
6. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW, Medicina Veterinaria volumen 1. 9ª ed. España.
7. Martínez CL. Comparación de la eficacia y costo de dos tratamientos para linfadenitis caseosa en cuatro rebaños de ovinos de pelo en la zona de Irapuato, Guanajuato (Tesis de licenciatura). FES – Cuautitlán: UNAM. 2012.
8. De La Fuente ME. Producción de Antígeno de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislado de muestras de abscesos en ovinos (Tesis de licenciatura). FES – Cuautitlán: UNAM. 2012.
9. Gyles Crlton L. Prescott J. Songer. Pathologenesis of bacterial infections in animals 4ª edición. Wiley – Blackwell. E.U. 2010.

10. Díaz AE, Tórtora PJL, Palomares REG, Gutiérrez HJL. Enfermedades de las cabras, INIFAP, 2015.
11. Miranda NI, Revisión bibliográfica sobre la inmunidad que se presenta en la linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos (Tesis de licenciatura). FES – Cuautitlán: UNAM. 2010.
12. Tórtora PJL, Síndrome de la oveja flaca, Fortalecimiento del sistema producto ovinos.
<http://www.uno.org.mx/sistema/pdf/sanidad/sindromedelaovejaflaca.pdf>
13. Corona TC. Evaluación de dos pruebas de diagnóstico para linfadenitis caseosa en ovinos utilizando tres métodos de obtención de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Tesis de licenciatura). FES – Cuautitlán: UNAM. 2011.
14. Gómez LE, Del Mar BM, Doménech A. Manual de inmunología veterinaria, Pearson Educación. España. 2006.
15. Ruiz L, Jerónimo R, Barrera VM, Frias MT. Linfadenitis caseosa II: Diagnóstico, control y aspectos epizootiológicos. RECVET, Vol. III, Abril, 2008.
16. Morales EA. Evaluación de una bacterina de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en cuayos (Tesis de licenciatura). FES – Cuautitlán: UNAM. 1991.
17. Ibarra ZC. Evaluación de la mutante *aroA* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, como candidato a inmunógeno en el modelo murino (Tesis de doctorado). Ciudad Universitaria: UNAM. 2017.

18. www.gob.mx/siap/poblacion/ganadera/ovinos
19. Binns S, Green L, Bailey M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary microbiology*. 2007;123: 169- 179.
20. Tachedjian M, Krywult J, Moore RJ, Hodgson ALM. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine*, 13; 1995: 1785 - 1792 1995.
21. Hoelzle L, Scherrer T, Muntwyler J, Wittenbrink M, Philipp W, Hoelzle K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune in sheep and goats. *Veterinary Microbiology* 2013; 164: 359 – 365.
22. <https://www.atcc.org/Products/All/19410.aspx#history>
23. Barrientos JPS, Cortés DAN, Tórtora PJL, Alba HF, García DR, Valdivia AG, Diferentes biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* están involucrados en la Linfadenitis Caseosa Cutánea y Visceral. *RECVET Vol. III, No. 4, Abril 2008*.
24. Dercksen DP, Brinkhof JMA, Nooren TD, Maanena K, Bodec CF, Bairdd G, Kampb EM. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology* 2000; 75: 167 – 175.

25. Hodgson ALM, Carter K, Tachedjian M, Krywult, Corner LA, McColl M, Cameron A. Efficay of an ovine caseus lymphadenitis formulated using genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, 1999; 17: 802 – 808.
26. Fontaine M, Baird G, Connor KM, Rudgea 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.