



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**Evaluación de una Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa
para Diagnóstico de Linfadenitis Caseosa de los Pequeños
Rumiantes**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

DIANA BERENICE QUIROGA VENTOLERO

ASESOR : M. en C. José Luis Gutiérrez Hernández

COASESOR: Dr. José Francisco Morales Álvarez

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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
 SECRETARÍA GENERAL
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

ATN: I.A. 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**

Evaluación de una Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para Diagnóstico de la Linfadenitis Caseosa de los Pequeños Rumiantes

Que presenta la pasante: DIANA BERENICE QUIROGA VENTOLERO
 Con número de cuenta: 30957189-6 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 Izcalli, Méx. a 27 de Mayo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en E. Susana Elvira García Vázquez	
VOCAL	Dra. María Guadalupe Prado Ochoa	
SECRETARIO	M. en C. José Luis Gutiérrez Hernández	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Eréndira de la Fuente Mancera	
2do. SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Díaz Sánchez	

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

LMCF/ntm*

Dedicatoria

A mi hermano, siempre has sido más inteligente que yo y si yo puedo, evidentemente tú también, sólo necesitas esforzarte un poco más.

A mi mamá, por tu apoyo incondicional y por impulsarme siempre a superar lo que sé que puedo ser.

A mi abuelita, aunque ya no estés físicamente, me sigues enseñando que a pesar de todas las adversidades no debo rendirme.

Todo mi esfuerzo y mis logros son por y para ustedes.

...

A mi mejor amiga Karli por tu compañía durante cinco años de estudio, por todos los buenos y malos momentos que hemos pasado juntas y por tu amistad.

A Lilita Tovar por tu gran ayuda en tantos momentos y por confiar y seguir creyendo en mí.

Agradecimientos

Al Dr. José Francisco Morales Álvarez, por permitirme realizar el servicio social en su laboratorio y con esto abrirme nuevas puertas para mi desarrollo profesional.

Al M en C. José Luis Gutiérrez Hernández por su compromiso para realizar este trabajo y compartir su conocimiento conmigo.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio por su apoyo y confianza hacia mí, en este y otros proyectos.

A la Dra. Erika Gabriela Palomares Reséndiz, a la Biol. Isabel Tuxpan Galván y a la M en C. Lupita Martínez Serrano por su dedicación y paciencia para enseñarme a desarrollar dentro de un laboratorio.

Apoyo financiero

Este estudio fue parcialmente financiado por la Fundación Guanajuato Produce A. C., a través del proyecto **FGP636-15 “Establecimiento de una estrategia integral para la prevención y control de las principales enfermedades que afectan a caprinos en el Estado de Guanajuato”**.

ÍNDICE

1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1 Importancia de la producción ovina y caprina	9
2.2 Linfadenitis caseosa	10
2.3 Etiología	10
2.4 Factores de virulencia	11
2.4.1 Fosfolipasa D (PLD)	11
2.4.2 Ácidos corimicólicos	12
2.4.3 Genes asociados a la captación de hierro	13
2.5 Trasmisión	13
2.6 Patogenia	13
2.7 Signos clínicos	15
2.8 Diagnóstico	17
2.9 Prevención y control	19
3. Objetivo general	20
4. Objetivos específicos	20
5. Justificación	21
6. Hipótesis	21
7. Materiales y método	21
7.1 Obtención de muestras	21
7.2 Aislamiento bacteriológico y pruebas bioquímicas	21
7.3 Establecimiento de protocolos para la obtención de ADN	21
7.4 Detección de <i>C. pseudotuberculosis</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (PCRm)	22
7.5 Determinación de la sensibilidad de la PCRm	24
7.6 Análisis estadístico	24
7.6.1 Sensibilidad	24
7.6.2 Kappa de Cohen	25
7.6.3 Análisis de X^2	25
8. Resultados	25
8.1 Análisis de cuadros 2x2 para obtención de la sensibilidad	27
8.1.1 Sensibilidad del diagnóstico por bacteriología (<i>Gold Estándar</i>)	27
8.1.2 Sensibilidad del diagnóstico por PCRm acoplada al protocolo 1	28
8.1.3 Sensibilidad del diagnóstico por PCRm acoplada al protocolo 2	28
8.2 Análisis de cuadros 2x2 para obtención de índice de Kappa de Kohen y X^2	29
8.2.1 Bacteriología VS PCRm acoplada al protocolo 1	29
8.2.2 Bacteriología VS PCRm acoplada al protocolo 2	29
9. Discusión	30
10. Conclusión	33
11. Bibliografía	35
12. Anexo 1	46

ÍNDICE DE TABLAS E IMÁGENES

Tabla 1. Características bioquímicas de *C. pseudotuberculosis* utilizadas en el diagnóstico por pruebas bioquímicas (Pág 18).

Tabla 2. Lista de iniciadores utilizados en este estudio (Pág 23).

Tabla 3. Composición de reacción para PCR Múltiple (Pág 23).

Tabla 4. Condiciones para llevar a cabo la PCR Múltiple (Pág 24).

Tabla 5. Resumen de los resultados que presentan discrepancia entre ellos (Pág 26).

Tabla 6. Cuadro 2x2 para los resultados obtenidos mediante bacteriología (Pág 27).

Tabla 7. Cuadro 2x2 para los resultados obtenidos mediante PCRm acoplada al Protocolo 1 (Pág 28).

Tabla 8. Cuadro 2x2 para los resultados obtenidos mediante PCRm acoplada al Protocolo 2 (Pág 28).

Tabla 9. Cuadro 2x2 de Bacteriología VS PCRm acoplada al Protocolo 1 (Pág 29).

Tabla 10. Cuadro 2x2 de Bacteriología VS PCRm acoplada al Protocolo 2 (Pág 29).

Imagen 1. Perfil de amplificación de PCRm para *C. pseudotuberculosis* de muestras de caprino y ovino. (Pág 26)

1. RESUMEN

La linfadenitis caseosa (LC) es una enfermedad contagiosa crónica de los ovinos y caprinos producida por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se caracteriza clínicamente por la formación de abscesos con necrosis caseosa en los linfonodos superficiales y el tejido subcutáneo, también pueden presentarse en órganos internos. El diagnóstico definitivo de la enfermedad es el microbiológico, cultivando el material purulento colectado directamente de las lesiones. En la actualidad las herramientas diagnósticas de tipo molecular han tomado gran importancia en el ámbito veterinario, ya que poseen buena sensibilidad y especificidad. En este trabajo se evaluaron dos protocolos de extracción de ADN, el primero de ellos (protocolo 1) consistió en la extracción a partir de cultivo bacteriológico, el segundo (protocolo 2) se basó en la obtención del ADN a partir de exudado purulento; se evaluó también un tercero (protocolo 3) que consistió en la sensibilización de pared bacteriana para detectar el material genético de *C. pseudotuberculosis* mediante una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (PCRm). Para ello se analizaron 50 muestras de exudado caseoso de ovinos y caprinos de rebaños del Estado de Chiapas y Guanajuato que se diagnosticaron clínicamente con LC. Los resultados obtenidos se analizaron mediante cuadros de dos por dos para obtener la sensibilidad de la muestra, índice de Kappa de Kohen y X^2 . Treinta y nueve de las 50 muestras estudiadas resultaron positivas al diagnóstico bacteriológico y a la PCRm utilizando el protocolo 1 ($K=1$; $X^2=50$). La relación de resultados entre la bacteriología y la PCRm con protocolo 2 presentó variaciones en los resultados negativos. De las 11 muestras negativas para el diagnóstico bacteriológico, 7 resultaron positivas y 4 negativas para la PCRm con protocolo 2. ($K=0.47$; $X^2=15.4149$). Utilizando el protocolo 3 no fue posible amplificar el genoma de la bacteria en ninguna de las muestras.

Se concluye que la PCRm acoplada al protocolo 2 es la técnica más eficiente para el diagnóstico de Linfadenitis Caseosa, en comparación a los otros protocolos analizados, debido a su mayor sensibilidad y eficiencia, incluso ante la prueba definida como *gold standar* para esta enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Importancia de la producción ovina y caprina

Los ovinos y los caprinos fueron introducidos a América con la invasión española en 1492 (Nahed 2002). La mayoría de los que existen hoy en el territorio nacional son denominados “criollos” por descender de aquellos traídos por los españoles, aunque en los últimos 25 años nuevas razas de ambas especies han sido introducidas (Tovar, 2009). Así, los ovinos y caprinos han sido adaptados a la cultura rural y culinaria de México (Vázquez, 2015).

La ganadería menor ofrece una opción productiva de menor riesgo y constituye el componente principal de los sistemas de producción en las zonas áridas latinoamericanas. Los sistemas ganaderos más comunes incluyen rumiantes menores (cabras y ovejas); se manejan con procedimientos tradicionales que incluyen pocos insumos tecnológicos disponibles y operan con baja productividad en ambientes de gran demanda por productos de estas especies, en muchos casos insatisfecha por la producción local (Iñiguez, 2013).

La ganadería de pequeños rumiantes a nivel mundial se ha desarrollado paralelamente a la historia de la humanidad, en México se consolida cada vez más y crece con grandes avances que benefician a los productores y al país (SAGARPA, SIAP 2015). En los últimos cinco años, México ha presentado un incremento en el inventario ovino, de 7'287,446 cabezas en 2006 a 8'710,781 en 2015, así como una disminución en la población caprina de 8,890,384 en 2006 a 8,724,946 para el 2015 (SIAP, 2015).

En México se tienen registradas 53,000 unidades de producción ovina, el 53% de estas se localizan en la zona centro del país, 24% en el sur y sureste y el 23% en la zona norte. La zona centro produce carne y pieles con razas de lana y pelo, mientras que la zona sur y sureste se orienta a la producción de carne con razas de pelo y produce lana para uso artesanal con animales criollos en Oaxaca y Chiapas. La parte norte que anteriormente era la principal proveedora de lana, ahora se dedica a la producción de carne con razas de pelo (Partida et al., 2013). Durante los últimos años, el volumen de población de ovinos ha crecido principalmente en el Estado de México, Hidalgo, Veracruz y Oaxaca. Mientras que en los principales estados productores de carne ovina se encuentran, el Estado de México, Hidalgo, Veracruz, Zacatecas y Puebla (SAGARPA, 2016).

La población caprina se distribuye principalmente en las zonas áridas y semiáridas que corresponden al 60% del país, extendiéndose de sur a norte, siendo los estados de Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Guerrero, Coahuila, Zacatecas, Guanajuato y Michoacán, los que mayor número de cabezas de ganado caprino en pie tienen. Actualmente la producción de cabras sigue asociada mayormente a estratos de población rural con menores ingresos, siendo en un 80% sistemas de producción de subsistencia (Montemayor, 2017).

La producción de ovinos y caprinos en México se realiza en sistemas de producción muy variados, dependiendo de las condiciones de clima, disponibilidad de recursos y nivel socioeconómico de los productores. Estos sistemas van desde los altamente tecnificados que mantienen a los animales en completa estabulación sobre pisos elevados, hasta los

trashumantes que mantienen los animales en condiciones pastoriles extensivas y sin uso de tecnología básica (Partida et al, 2013). En México predominan los sistemas tradicionales, donde la alimentación es básicamente mediante el pastoreo de los animales en agostaderos naturales, la inversión de capital en alimentación, sanidad e infraestructura es mínima, y la mano de obra es generalmente familiar, lo que permite bajos costos de producción (Galaviz et al, 2011). Sin embargo, dado que las prácticas de suplementación alimenticia son nulas, la deficiente ingesta de microminerales, así como la mala condición de los pastizales, aunado a periodos de sequía, provocan desequilibrios nutricionales causantes de alta mortalidad, la cual se agudiza debido a malas o escasas prácticas sanitarias, provocando serios problemas por el desarrollo de enfermedades infecciosas que son consideradas como uno de los problemas que frenan la producción de pequeños rumiantes (Carrera, 2008). dentro de estas enfermedades, la linfadenitis caseosa (LC) es una de las que genera mayor impacto, debido al deterioro del estado general del animal, y la disminución en los índices de producción (Belchior et al, 2006).

2.2 Linfadenitis caseosa

La linfadenitis caseosa o pseudotuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa de evolución crónica, causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Para los patólogos veterinarios este microorganismo es considerado el "parásito perfecto", pues una vez establecido con éxito dentro del huésped, este evade el sistema inmune con aparente facilidad, dando como resultado infecciones crónicas que pueden durar la mayor parte o la totalidad de la vida de un animal, provocando también una baja respuesta al tratamiento, por lo que es difícil erradicar, provocando también una eficiente transmisión entre los animales de un rebaño. Estas características obligan a que las estrategias para establecer los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad sean integrales (Hernández et al, 2015; Baird y Fontaine, 2007).

2.3 Etiología

Corynebacterium pseudotuberculosis es una bacteria gram positiva, con morfología pleomórfica, de 0.5 µm a 0.6 µm de ancho por 1.0 µm a 3.0 µm de largo, intracelular facultativa, anaerobia facultativa, no esporulada, acapsulada y no móvil. (Martín, Aitken. 2000; Barrientos et al, 2008). Pertenece a la familia *Actinomycetaceae*, al igual que los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (grupo CMNR) que constituyen un grupo muy heterogéneo de bacterias que poseen características comunes como la estructura de la pared celular, caracterizada principalmente por la presencia de un gran complejo polimérico compuesto por peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos (Collins MD, et al, 1982).

Esta bacteria crece a una temperatura óptima de 37 °C, en pH de 7.0 a 7.2. En medios sólidos, las colonias bacterianas son pálidas, secas y de consistencia friable (Buxton y Fraser, 1977; Quinn et al, 1994). Después de la incubación durante 24 h, aparecen pequeñas colonias amarillentas, que aumentan su tamaño a un diámetro de 1-2 mm después de 48 h (Coyle et al, 1985).

En estudios realizados por Songer (1988), se identificaron dos biotipos de *C. pseudotuberculosis* basándose en la producción de la enzima nitrato reductasa. Con base a esta característica, se han denominado biovariedad "equi" a las que reducen nitratos, estas

cepas están mayormente asociadas a la linfadenitis equina (pigeon fever), a la linfangitis ulcerativa en bovinos y a procesos abscedativos en camellos, porcinos y alces (Foley et al, 2004; Baird y Fontaine, 2007), y la enfermedad de la piel edematosa (OSD) en los búfalos (Selim, 2001). La biovariedad “*ovis*” se refiere a todas aquellas cepas que no tienen la capacidad de reducir nitratos, esta última es comúnmente asociada como el agente etiológico de la LC en pequeños rumiantes (Songer et Al, 1988; Brown et al, 1987; Viscaino et al, 2002).

La reducción de nitrato se asocia con la capacidad de la bacteria para respirar en ausencia de oxígeno y con dos vías metabólicas diferentes (Ayers, 1977). En la primera de ellas, conocida como reducción asimilatoria de nitratos, el proceso de desnitrificación tiene lugar donde el nitrato se reduce secuencialmente a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso y finalmente a dinitrógeno (Brown et al, 1986; Zumft, 1997; Moreno et al, 1999). En la segunda vía, conocida como reducción disimilatoria de nitratos, el nitrato se convierte directamente en amoníaco, y es secretado por la célula, este es considerado un método menos común de reducción de nitratos en la mayoría de los ecosistemas (Zumft, 1997; Papaspyrou et al, 2014).

2.4 Factores de virulencia

Hasta el momento no se ha descrito alguna cepa avirulenta de *C. pseudotuberculosis*, a pesar de esto, los factores de virulencia siguen siendo poco conocidos. Debido a que no se han identificado plásmidos de *C. pseudotuberculosis*, debe suponerse la ausencia de determinantes de virulencia codificados por estos. Actualmente las investigaciones se han centrado principalmente en dos factores de virulencia identificados como fosfolipasa D y ácidos micólicos, sin embargo, se considera a un tercero conocido como genes putativos de captación de hierro. El genoma de *C. pseudotuberculosis*, aún no se ha secuenciado por completo, por lo que no se ha logrado identificar nuevas secuencias de genes que puedan codificar otros factores de virulencia (Baird y Fontaine, 2007).

2.4.1 Fosfolipasa D (PLD)

Es una exotoxina considerada como el principal factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, tiene una masa molecular de 31,4 kDa (Hodgson et al, 1990) y se expresa a partir de un gen cromosómico presente en *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis*, la cual está regulada por múltiples factores ambientales (Barksdale et al, 1981). Su producción se inicia en un rango de 37 a 43°C y comienza a disminuir luego de 20 minutos a 43°C, también está regulada por la densidad del cultivo y se expresa mayormente en los macrófagos infectados, en los que tiene un efecto pequeño pero significativo sobre la viabilidad de estos (McKean et al, 2007).

La PLD actúa específicamente catalizando la reacción de hidrólisis de enlaces éster de la esfingomielina, fosfolípido constitutivo importante de las membranas celulares de mamíferos, en fosfato de ceramida y colina. Es así como aumenta la permeabilidad de vasos sanguíneos, contribuyendo a la propagación de las bacterias desde el sitio inicial de infección a sitios secundarios dentro del huésped (Dorella et al, 2006). Además, provoca lesiones dermonecroticas y en dosis más altas, es letal para varias especies de animales de laboratorio y domésticos (Egen et al, 1989; Songer, 1997). Se han descrito también varias actividades biológicas para la PLD, que incluyen dermonecrosis, letalidad y lisis sinérgica de eritrocitos en presencia de la exotoxina de *Rhodococcus equi* (Pepin et al, 1994a; Baird y Fontaine, 2007).

La afirmación de que la PLD representa un factor de virulencia significativo está respaldada por mucha evidencia experimental. Los estudios en que las cepas de *C. pseudotuberculosis* en las que el gen *pld* que la codifica se ha eliminado del cromosoma o se ha inactivado por mutación, han demostrado que dichas cepas son incapaces de progresar desde el sitio de la infección hacia otras zonas, además de no poder causar los abscesos clásicos en los nódulos linfático de las ovejas desafiadas (Hodgson et al, 1992; McNamara et al, 1994; Pepin et al, 1994a).

La PLD puede ayudar también a la sobrevivencia del microorganismo. Se sabe que activa al complemento del sistema inmune innato y reduce su actividad en la región que rodea a las bacterias invasoras y las protege de la opsonización, también puede perjudicar la quimiotaxis de los neutrófilos y como consecuencia, disminuir la probabilidad de fagocitosis al principio de la infección (Yozwiak y Songer, 1993). Se ha comprobado que el PLD puede desempeñar un papel en el escape de la bacteria desde dentro de los macrófagos, es posible que esta característica esté relacionada con la acción de la PLD en las capas internas de fosfolípidos de la membrana celular del macrófago (Titball, 1993)

Se sabe que las exotoxinas similares a la PLD de *C. pseudotuberculosis* son importantes factores de virulencia para otros patógenos bacterianos, por ejemplo, hay un 97% de homología entre la PLD de *C. pseudotuberculosis* y la exotoxina activa de *C. ulcerans*, una causa frecuente de difteria en los humanos (McNamara et al, 1995).

2.4.2 Ácidos corimicólicos

C. pseudotuberculosis no tiene cápsula, en cambio posee una capa serosa de ácidos micólicos sobre la superficie de la pared celular, que no son más que ácidos grasos β -hidróxi- α -alquilramificados, considerados componentes estables de la pared celular de bacterias ácido-alcohol resistentes como *Nocardia spp*, *Rhodococcus spp* y *Mycobacterium spp* (Baird y Fontaine, 2007). Estos ácidos son usados en la diferenciación de estos géneros bacterianos incluido el género *Corynebacterium*, ya que la longitud de las cadenas carbonadas varía entre cada uno de ellos (Lechevalier et al, 1971).

En las infecciones naturales, la capa cerosa de ácido micólico de *C. pseudotuberculosis* proporciona al organismo una protección mecánica y química contra las enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas. Esto permite que la bacteria sobreviva a la fagocitosis y persista dentro del huésped como un parásito intracelular facultativo (Williamson, 2001). Es probable también que gracias a esta característica, la bacteria pueda migrar desde el punto inicial de entrada, al sitio final del desarrollo de la lesión. Además, la naturaleza tóxica del ácido micólico contribuye a la formación de abscesos, ya que, en infecciones artificiales en ratones, se demostró una relación directa entre la cantidad de lípidos de la pared celular producida por diferentes aislados de *C. pseudotuberculosis* y su capacidad para producir abscesos crónicos (Muckle y Gyles, 1983). Se ha descrito también que las propiedades citotóxicas de los lípidos superficiales contribuyen directamente a la formación de abscesos, la inyección subcutánea de ácidos micólicos provoca una respuesta inflamatoria localizada con necrosis hemorrágica central, induciendo la presencia de lesiones piogénicas estériles (Hard, 1975; Ayers, 1977).

Algunos autores han sugerido que la capa de ácido micólico permite que *C. pseudotuberculosis* sobreviva durante períodos prolongados en el medio ambiente, una característica común a otros miembros de la familia de los actinomicetos (West et al, 2002). Las temperaturas

ambientales bajas y la mezcla con fomites aumentan la supervivencia del organismo en descargas purulentas, permitiendo que las bacterias viables siguen presentes en las superficies inanimadas hasta 55 días después de la contaminación (Augustine y Renshaw, 1986). Incluso se ha informado que en granjas bajo condiciones frías y húmedas, el organismo puede permanecer viable durante 6 meses gracias a la presencia de estos ácidos (Batey, 1986)

2.4.3 Genes asociados a la captación de hierro

Un grupo de genes de captación de hierro de *C. pseudotuberculosis* tiene un papel importante en su virulencia. Los cuatro genes en este operón se identificaron como genes de adquisición de hierro y son denominados *fagA*, *fagB*, *fagC* y *fagD*. Dado que *C. pseudotuberculosis* es un patógeno intracelular, esta bacteria debe ser capaz de adquirir hierro de un entorno en el que este nutriente es escaso. Aunque no hubo alteración en la utilización de hierro por un mutante *fagB* in vitro, este mutante tenía una capacidad reducida para sobrevivir y causar abscesos en cabras infectadas experimentalmente (Billington et al, 2002).

2.5 Transmisión

La transmisión entre ovejas o cabras ocurre principalmente a través de la contaminación de heridas superficiales, que pueden aparecer durante procedimientos comunes tales como esquila, castración y marcado de orejas, o por lesiones en el cuerpo del animal generadas por otros eventos traumáticos (Paton et al. 1995; Williamson, 2001). Numerosas rutas de inoculación se han utilizado para inducir la enfermedad de manera experimental en ovejas. La inoculación intradérmica, subcutánea, intravenosa, intratraqueal, intravaginal e intralinfática han demostrado ser exitosas en el establecimiento de la enfermedad (Nagy, 1976; Burrell, 1978; Pepin et al, 1994b; Fontaine et al, 2006).

Además *C. pseudotuberculosis* puede diseminarse entre los animales por vectores como las moscas *Musca domestica* e *Hippobosca equina*. En el ganado bovino, así como en los búfalos, hay evidencia de transmisión mecánica de esta bacteria por moscas domésticas y por otros dípteros, aunque los mecanismos naturales de infección con *C. pseudotuberculosis* no están bien documentados. Este patógeno se puede encontrar en hasta 20% de las moscas en las proximidades de animales enfermos (Yeruham, et al, 1996; Braverman et al, 1999; Selim, 2001; Spier et al, 2004).

2.6 Patogenia

Una vez que la bacteria entra al organismo, la bacteria es fagocitada por macrófagos que migran del sitio de invasión. Los cuales viajan por vía linfática hasta alcanzar al nódulo linfático de drenaje local, ahí se desarrollan piogranulomas microscópicos múltiples que crecen en tamaño y se unen para formar abscesos más grandes (Batey, 1986; Brown et al, 1987; Davis, 1990; Collett et al, 1994). Viajando dentro de los macrófagos, *C. pseudotuberculosis* llega a diferentes órganos donde se repite la formación de abscesos (Belchior et al., 2006).

La capa cerosa de ácidos micólicos de *C. pseudotuberculosis* proporciona a la bacteria una protección mecánica y posiblemente bioquímica contra las enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas, esto le permite a la bacteria además de sobrevivir a la fagocitosis, la persistencia dentro de los macrófagos como parásito intracelular facultativo (Williamson, 2001). Hard (1972) demostró que los macrófagos que habían ingerido bacterias experimentaron una rápida degeneración y muerte celular, liberando bacterias en el espacio extracelular, mientras que estas permanecieron intactas, concluyó que *C. pseudotuberculosis* es capaz de sobrevivir dentro de los fagolisosomas y causa la muerte de sus células huésped debido al efecto tóxico de su lípido de superficie.

La acción de la PLD causa desestabilización de las membranas endoteliales, incrementando la permeabilidad vascular con formación de edema y por lo tanto, provoca lisis celular, también inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la degranulación de células fagocíticas. El complemento es activado por la vía alterna, ocasionando necrosis y trombosis de vasos linfáticos y favoreciendo la supervivencia y multiplicación del microorganismo (Belchior et al, 2006). Se ha demostrado que el receptor del complemento tipo 3 (CR3) desempeña un papel clave en el reclutamiento de células inflamatorias durante el curso de la infección. El tratamiento de ratones con un anti-CR3 dio lugar a la proliferación sin restricciones de las bacterias en el bazo y el hígado. Un examen histológico reveló también que los fagocitos mononucleares no migran a los sitios de la multiplicación bacteriana, como lo demuestra la inhibición de la migración de células inflamatorias y un gran número de bacterias en sus órganos. Estos resultados revelaron la importancia de la respuesta inmune innata a través del CR3 en la resistencia a la infección por *C. pseudotuberculosis* en ratones (Lan et al, 1999).

Dado que *C. pseudotuberculosis* tiene la capacidad de replicarse dentro de los macrófagos y escapar de ellos, se ha sugerido que la PLD también podría desempeñar un papel en el escape del fagosoma y los macrófagos (Pepin et al., 1994a; McKean et al., 2007). Tashjian y Campbell (1983) confirmaron esta hipótesis en un estudio de microscopía electrónica utilizando macrófagos mamarios caprinos infectados con *C. pseudotuberculosis*, observando que, a pesar de la fusión de los lisosomas con los fagosomas dentro de los macrófagos, estos experimentaron una degeneración progresiva mientras que la bacteria sobrevivió.

Luego de las 24 horas post-inoculación se producen varios microabscesos dentro de la región cortical del ganglio linfático que drena el sitio de la inoculación. A los seis días después de la inoculación, estos microabscesos se vuelven más numerosos y comienzan a expandirse y unirse para formar focos purulentos más grandes. Los abscesos tempranos contienen grupos de bacterias y desechos celulares, con una proporción relativamente alta de eosinófilos (Pepin et al, 1994b). El uso de células inflamatorias marcadas por radioisótopos demostraron que a las pocas horas de la inoculación subcutánea con bacterias, se reclutaron grandes cantidades de neutrófilos en el sitio de la inyección, y que a las 24 h después de la inoculación, estos neutrófilos comenzaron a aparecer en el drenaje local del nódulo linfático; en este mismo experimento se demostró que la importancia relativa de los neutrófilos disminuyó desde el día 3, mientras que el número relativo de macrófagos en el sitio de la inoculación aumentó drásticamente (Pepin et al, 1992).

El linfonodo superficial infectado actúa como iniciador para la posterior colonización de los linfonodos internos y las vísceras. Es probable que los émbolos purulentos se desprendan de los abscesos dentro de los linfonodos afectados, pasen al flujo linfático eferente y luego se

envíen al torrente sanguíneo (Radostits et al, 2000). Sin embargo, como se ha visto en otros patógenos intracelulares, la formación de granulomas da como resultado la encapsulación y el atrapamiento de las lesiones (Batey, 1986), por lo tanto, es probable que el escape de tales émbolos infecciosos ocurra con poca frecuencia. En consecuencia, se ha argumentado que en la mayoría de los casos cualquier colonización de órganos más allá del linfonodo de drenaje local debe ocurrir relativamente rápido después de la infección inicial, y que las células fagocíticas pueden volver a ser los vehículos (Pepin et al, 1994a).

En las primeras etapas, los contenidos purulentos del absceso son suaves y semifluidos, contienen grupos de bacterias y restos celulares, con una proporción relativamente alta de eosinófilos, dando al núcleo purulento un tono ligeramente verde, sin embargo, con el paso del tiempo, el material purulento dentro de la lesión adquiere una consistencia más sólida. El proceso continúa con una encapsulación de la lesión, lo que conduce a una disminución de la reacción inflamatoria en el parénquima del linfonodo. Continuamente se produce una expansión lenta de la lesión, caracterizada por necrosis licuefactiva central, rodeada de necrosis coagulativa, que contienen múltiples focos de mineralización aparentemente en capas concéntricas, todo esto es estrechamente delimitado por una capa de fibrosis que delinea la extensión de la lesión (Baird, 2003; Baird y Fontaine, 2007).

Como las bacterias permanecen viables en los abscesos, los animales no son capaces de eliminar la infección y a menudo, permanecen como portadores de por vida. Ocasionalmente, las bacterias escapan de los abscesos, posiblemente a través de la emigración de células fagocíticas infectadas, y se diseminan a través de la sangre o el sistema linfático a otros órganos o linfonodos donde se retienen en vasos sanguíneos pequeños y causan la formación de nuevas lesiones (Batey, 1986). Estos abscesos linfáticos superficiales pueden expandirse para alcanzar un diámetro de hasta 15 cm, aunque de 3 - 5 cm es el tamaño más común (Valli y Parry, 1993).

2.7 Signos clínicos

La infección por *C. pseudotuberculosis* en los pequeños rumiantes puede ser manifestada en dos formas. La primera de ellas conocida como LC superficial, involucra a los linfonodos que se encuentran localizados debajo de la piel, afectando en cabras principalmente a los submandibulares, parotídeos; mientras que en las ovejas las lesiones en cabeza y cuello son relativamente raras, siendo los nódulos preescapulares y precrales los más afectados. (Belchior et al., 2006). Esta manifestación clínica puede presentarse como uno o múltiples abscesos de 1-2 cm de diámetro, producto de la destrucción de neutrófilos (Hernández et al., 2005). La segunda forma corresponde a una presentación visceral de la enfermedad, la cual involucra a los linfonodos y a los órganos encontrados en las cavidades torácica y abdominal, especialmente los riñones, el hígado, los pulmones y los linfonodos mediastínicos (Binns et al, 2007; Díaz et al, 2015), algunas veces se presentan también causando cuadros de neumonía, hepatitis, pericarditis, mastitis y artritis (Foley et al, 2004; Baird y Fontaine, 2007). Los animales infectados están crónicamente debilitados, con poco peso, poca producción de lana y disminución en la producción de leche. La morbilidad de la infección puede llegar al 70% en los rebaños de cabras y puede incrementarse con la edad (Díaz et al, 2015).

La forma externa se caracteriza por la formación de abscesos en los linfonodos palpables. Cualquiera de los linfonodos superficiales del cuerpo puede ser afectado, dependiendo del punto de entrada original del microorganismo. Con menos frecuencia, pueden ocurrir lesiones purulentas localizadas no directamente asociadas con los linfonodos superficiales dentro de los tejidos subcutáneos. La lesión también se presenta con hinchazón, pérdida del pelo que cubre el área y eventual ruptura con descarga de pus (Radostits et al., 2000). Ayers (1977) sugiere que el linfonodo precarural es el más comúnmente afectado en los ovinos, seguido por los preescapulares; mientras que en las cabras son más comunes las lesiones en linfonodos de la cabeza y el cuello.

La forma visceral se asocia con abscesos en los linfonodos internos y otros órganos. La distribución generalmente aleatoria de las lesiones internas es dependiente de la diseminación hematológica o linfática (Batey, 1986). La ubicación principal de estas lesiones se presenta en el parénquima pulmonar, las lesiones pulmonares suelen tomar la forma de abscesos encapsulados similares a los observados en los linfonodos, pero en ocasiones también se registra una bronconeumonía más extensa (Valli y Parry, 1993). Esto último puede conducir a áreas de pleuritis, lo que resulta en el desarrollo de adherencias fibrosas hacia la pared torácica, el pericardio y el diafragma (Renshaw et al, 1979; Stoops et al, 1984)

En los animales que desarrollan abscesos pulmonares, ocasionalmente presentan lesiones en los linfonodos mediastínicos. Los abscesos dentro de estos pueden llegar a ser tan grandes como para ejercer presión sobre el esófago, lo que interfiere con la deglución y la rumia, conduciendo a una disminución crónica de la actividad (Paton et al., 2005).

En la ubre, la mastitis por *C. pseudotuberculosis* se encuentra por una extensión de la infección desde el linfonodo supramamario. Puede tomar la forma de una mastitis supurativa aguda, o aparecer como abscesos encapsulados crónicos dentro de la glándula mamaria (Valli y Parry, 1993).

Las lesiones en otros órganos como el hígado, riñones, testículos, útero, cerebro, articulaciones y médula espinal son menos comunes (Valli y Parry, 1993). En raras ocasiones, el organismo también se ha aislado del contenido del estómago y los tejidos de los fetos ovinos, de acuerdo con un rol en el aborto (Dennis y Bamford, 1966).

La naturaleza de las lesiones de la LC es de desarrollo lento, esta característica hace que se pueden recuperar bacterias viables de los abscesos varios años después de la infección inicial. La reactivación de la enfermedad también puede ocurrir con el desarrollo de nuevas lesiones después de un período considerable de aparente inactividad. (Batey, 1986; Brown et al, 1987; Davis, 1990; Collett et al, 1994).

A causa de la infección también pueden observarse signos como emaciación progresiva, inapetencia y muerte por desgaste del animal (Delgado et al, 2015). En algunas ocasiones los signos clínicos no son evidentes y sólo se observan lesiones visibles al examen *post-mortem*, lo que dificulta el diagnóstico de la enfermedad (Díaz et al, 2015)

2.8 Diagnóstico

El principal método de diagnóstico para la LC es el cultivo y la identificación bioquímica de *C. pseudotuberculosis* (*Gold Standar*). Por lo general, es posible aislar el organismo de lesiones de una manera sencilla, aunque el número de bacterias viables presentes en los abscesos crónicos puede ser bajo y ocasionalmente pueden encontrarse lesiones aparentemente estériles. Otros patógenos bacterianos como *Corynebacterium xerosis* (Hernández et al, 2016) *Bacillus licheniformis*, *Trueperella pyogenes* y *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* son capaces de producir linfadenopatía supurativa (Bek-Pederson, 1997; Pekelder, 2000).

Existen diferentes métodos empleados para diagnosticar la enfermedad. El diagnóstico bacteriológico se realiza cultivando el material purulento colectado en agar sangre al 5%, agar telurito de potasio, (Viscaino et al, 2002) o agar Columbia al 5% de sangre ovina, incubándolo en una estufa bacteriológica a 37° C por 48 a 72 horas. Transcurrido este lapso, *C. pseudotuberculosis* crece en colonias pequeñas de color blanco, rodeadas por una estrecha zona de hemólisis completa y tras varios días, las colonias presentan consistencia seca y de color crema. (Costa et al, 2013; Díaz et al, 2015)

C. pseudotuberculosis se puede identificar por su perfil enzimático y su capacidad para utilizar diversas fuentes de carbohidratos (Cuadro 1). La realización de pruebas bioquímica se ha simplificado en gran medida con la introducción de pruebas comerciales estandarizadas como, por ejemplo, la identificación del Índice Analítico de Perfil (API) (bioMeL rieux (UK), Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). La prueba "API Coryne" es utilizada para la identificación de bacterias corineformes y comprende 21 sustratos de prueba individuales para la determinación de la actividad enzimática (pirazinamidasas, pirrolidonil arilamidasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, α glucosidasa, N-acetilglucosaminidasa, β -glucuronidasa y reducción de nitratos y gelatina, hidrólisis de urea y esculina) y la fermentación de carbohidratos (glucosa, ribosa, D-xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa y glucógeno) (Bascomb et al, 1973). En un estudio realizado por Almuzara et al., en el 2006, en donde se trabajaron 178 cepas de bacterias corineformes incluidos los géneros *Corynebacterium*, *Listeria*, *Rhodococcus* y *Rothia*, se lograron identificar a nivel de género y especie 118 cepas (68.3%) de manera correcta sólo con el sistema API *Coryne* versión 2.0, mientras que 44 cepas (24,7%) requirieron pruebas adicionales para la identificación correcta, finalmente con 16 cepas (9%) no se llegó a la identificación correcta.

El fenómeno de lisis sinérgica denominada reacción de CAMP (Christie et al., 1944), también se utiliza como un método de diagnóstico. Cuando *C. pseudotuberculosis* y *Rhodococcus equi* se siembran juntas en medios sólidos que contienen sangre, las colonias de ambas especies muy próximas entre sí causan zonas amplias de lisis de eritrocitos (Fraser, 1961). Se encontró que la proteína de *R. equi*, llamada factor equi, implicada en la lisis sinérgica, es una enzima fosfolipasa C (Bernheimer et al., 1980). Sin embargo, debe notarse que *C. ulcerans* también produce PLD, por lo que la prueba no podría diferenciar entre ambas especies (Barksdale et al., 1981).

En contraste con la lisis sinérgica descrita anteriormente, se informó que *C. pseudotuberculosis* ejerció un efecto inhibitorio sobre la hemólisis producida por estafilococo β -hemolíticos, y se cree que el agente inhibitorio estaba asociado con la presencia de la PLD. También se ejerció una inhibición comparable de la actividad hemolítica sobre la toxina α de *Clostridium perfringens*. A

esta prueba se le denominó CAMP inverso, o inhibición de CAMP. Aunque se presenta el mismo problema de la producción de PLD por *C. ulcerans* y no podría ser diferenciada (Soucek et al, 1962 y 1967).

Tabla 1. Características bioquímicas de *C. pseudotuberculosis* utilizadas en el diagnóstico por pruebas bioquímicas (Dorella et al, 2006)

<i>Fermentación</i>		<i>Hidrólisis</i>	
Glucosa	+	Esculina	-
Arabinosa	d	Hipurato	-
Xilosa	-	Urea	+
Ramnosa	-	Tirosina	-
Fructuosa	+	Caseína	-
Galactosa	+		
Manosa	+	Fosfatasa	+
Lactosa	-	Pirazinamidaza	-
Maltosa	+	Rojo de metilo	+
Sucrosa	d	Reducción de Nitrato	d
Trehalosa	-	Catalasa	+
Rafinosa	-	Oxidasa	-
Salicín	-	Lipofilia	-
Dextrín	d		
Almidón	-		

+: más del 90% son positivas. d: 21-89% son positivas. -: más del 90% son negativos o resistentes

Hay investigaciones que resaltan la importancia del diagnóstico serológico dado que detecta la enfermedad en estados subclínicos, uno de ellos es el diagnóstico por ELISA que permite la detección de animales infectados subclínicamente, pero se ha demostrado que la mayoría de los ensayos desarrollados para este fin carecen de una buena sensibilidad o especificidad (Brown, et al., 1987; Dercksen, 2000; Sutherland, et al., 1987). Binns en 2007 desarrolló una prueba de ELISA utilizando un sonicado de *C. pseudotuberculosis*, optimizado para la detección total de anticuerpos y la detección mediante anticuerpos monoclonales dirigidos a las cadenas ligeras de IgG específicas contra *C. pseudotuberculosis*. La prueba se evaluó en un panel de 150 sueros de referencia positivos y 103 sueros de referencia negativos. La sensibilidad de detección del anticuerpo total fue del 71% (intervalo de confianza del 95%), y la sensibilidad de la detección del anticuerpo IgG a *C. pseudotuberculosis* fue del 83% (76-89%). La sensibilidad del ensayo de anticuerpos IgG puede ser mayor debido a la mayor afinidad de

los anticuerpos de clase IgG en comparación con los anticuerpos IgM también detectados por el ELISA de anticuerpos total.

Se han desarrollado otras técnicas de ELISA para detectar interferón gamma (IFN- γ), como un marcador de inmunidad mediada por células contra *C. pseudotuberculosis*. La prueba ELISA de IFN- γ parece ser más sensible que el ELISA de anticuerpos normales en la detección de la infección previa en cabras, y no parece verse afectada por la vacunación (Menzies et al, 2004).

Otra prueba para el diagnóstico serológico es la inhibición de la hemólisis sinérgica (IHS) que mide la respuesta de IgG a la exotoxina en el suero del paciente; la prueba detecta la dilución mayor que puede prevenir la hemólisis de *Rhodococcus equi* cuando se utilizan glóbulos rojos sensibilizados con exotoxina de *R. equi*. La reacción es interpretada a las 24H. Títulos de anticuerpos en suero equivalentes a 1:128 indican exposición y títulos 1:512 o mayores indican presencia de infección. El test IHS, ha sido utilizado en ovinos y caprinos para monitorear la prevalencia y exposición de animales y detectar infecciones subclínicas. El test tiene una sensibilidad del 98% para cabras y 96% para ovinos (Aleman y Spier, 2001; Brown y Olander, 1987, Ruiz, et al. 1995). También existen otros métodos de diagnóstico basados en técnicas de inmunofluorescencia indirecta (Valencia et al., 1987) microaglutinación, inmunodifusión (Menzies y Muckle, 1989), dot blot, western blotting (Ter et al., 1992) y fijación de complemento (Shigidi, 1979).

Para el diagnóstico molecular se ha desarrollado un ensayo de PCR basado en la detección del gen *16S rRNA* para identificar aislados de *C. pseudotuberculosis*. Aunque este ensayo es útil para estimar la prevalencia de LC en los animales estudiados, presenta algunas limitaciones, una de ellas es depender del cultivo bacteriano, además se ha demostrado que no es lo suficientemente específico como para discernir entre *C. pseudotuberculosis* y *Corynebacterium ulcerans* (Cetinkaya et al, 2002).

Para mejorar la detección de *C. pseudotuberculosis* por PCR, se desarrolló un ensayo de PCR múltiple (PCRm) en el que se adaptó un protocolo para extraer ADN bacteriano directamente de muestras clínicas. La amplificación de múltiples locus en una sola reacción a través de PCRm es una herramienta poderosa y ampliamente utilizada para la identificación rápida y específica de bacterias patógenas (Wadowsky et al, 1996; Halbert et al, 2005). Esta PCRm se diseñó para la detección de tres genes de *C. pseudotuberculosis*, el gen *16S rRNA*, que es elegido para la mayoría de los estudios de taxonomía microbiana (Cetinkaya et al., 2002; Khamis et al, 2004), el gen *rpoB*, que codifica a la subunidad β del ARN polimerasa y actualmente utilizado para estudiar relaciones filogenéticas en los géneros *Corynebacterium* y *Mycobacterium* (Khamis et al, 2004; Dorella et al, 2006) y el gen *pld*, que codifica la exotoxina PLD (McNamara et al., 1995).

2.9 Prevención y control

En los países donde la infección es endémica, se deben establecer medidas para controlar o para reducir los niveles de infección de los rebaños y entre los rebaños. La vigilancia es el principal método de control para prevenir la diseminación de la LC. Al momento de comprar ovejas se debería examinar cuidadosamente la presencia de abscesos en los nódulos linfáticos de la cabeza o en el cuerpo, animales sospechosos deben rechazarse (Lloyd, 1994).

Se debe examinar las ovejas antes de la esquila, idealmente las ovejas sospechosas deberían ser esquiladas separadas del resto del rebaño, aquellas que presenten abscesos deberían ser aisladas (Laven et al, 1997). Y más importante aún es mantener una buena higiene antes, durante y después de la esquila (Paton et al., 1988).

El tratamiento con antibioterapia es complicado. In vitro, *C. pseudotuberculosis* es sensible a una amplia variedad de antibióticos, previenen el crecimiento y la multiplicación de bacterias (Muckle y Gyles, 1983). Sin embargo, in vivo, la LC es generalmente resistente a la terapia con antibióticos, probablemente debido a la encapsulación gruesa alrededor de las lesiones típicas y la naturaleza caseosa de la lesión (Williamson, 2001). La naturaleza intracelular del organismo en algunas partes también se proporciona cierta protección contra los antibióticos comúnmente empleados. Se ha sugerido el tratamiento quirúrgico de las lesiones externas como una alternativa al sacrificio en el caso de animales particularmente valiosos (Davis, 1990).

Debido a la gran importancia de *C. pseudotuberculosis* en veterinaria y teniendo en cuenta la ineficacia de los antibióticos, se han desarrollado varias estrategias de vacunas, incluyendo el uso de bacterias atenuadas o inactivadas, fracciones de la pared celular, y las vacunas de ADN (Dorella et al., 2006). Las vacunas actuales se basan principalmente en la inactivación con formalina de la fosfolipasa D (Hodgson et al., 1999; Selvy et al., 2011). Sin embargo, no todas las vacunas disponibles para su uso en el ganado ovino tienen la misma eficacia en el ganado caprino (Windsor, 2011). Por ello existe la necesidad de una mejor caracterización de los factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y realizar comparaciones completas de los factores de virulencia de los distintos biotipos para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación, que sean capaces de proteger no sólo a los pequeños rumiantes, sino también a caballos y ganado bovino (Dorella et al., 2006).

A pesar de que se ha demostrado de manera experimental que las vacunas reducen marcadamente tanto la proporción y el número de abscesos en los animales infectados, no tiene una eficacia absoluta (Lloyd, 1994).

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar una Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa, acoplada a dos protocolos de extracción de ADN y a una sensibilización térmica de paredes celulares en muestras clínicas obtenidas de pequeños rumiantes.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Conocer la sensibilidad de la PCRm para el diagnóstico de LC en comparación con el diagnóstico bacteriológico, considerada la prueba de oro en el diagnóstico de la enfermedad.

Conocer la concordancia que existe entre los resultados obtenidos en la PCRm utilizando los protocolos de extracción de ADN y el protocolo de sensibilización térmica, con respecto a los resultados obtenidos en el diagnóstico bacteriológico (*Gold standard*).

5. JUSTIFICACIÓN

La LC es una enfermedad muy común en nuestro país que ocasiona importantes pérdidas económicas. En la actualidad, no se ha logrado el control absoluto de la enfermedad en parte por las escasas medidas de bioseguridad establecidas en los rebaños. La existencia de otras bacterias piógenas que pueden ocasionar lesiones similares pueden confundir el diagnóstico clínico, o bien, exacerbar el cuadro clínico, por ello es importante establecer estrategias de diagnóstico de laboratorio rápidas y confiables que permitan que este sea oportuno para favorecer la implementación de medidas preventivas contra esta y otras lesiones piogénicas provocadas por patógenos como *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus licheniformis*, *Trueperella pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, tanto en pequeños rumiantes como en otras especies.

6. HIPÓTESIS

La PCRm acoplada a un protocolo de extracción de ADN confiable puede otorgar mayor sensibilidad y rapidez para dar un resultado confiable en el diagnóstico de LC de los pequeños rumiantes, en comparación con el diagnóstico bacteriológico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de muestras

Para la realización de este trabajo se analizaron un total de 50 muestras de exudado caseoso, 20 de ovinos y 30 caprinos. Las muestras de ovinos corresponden distintos rebaños del estado de Chiapas y fueron recolectadas por médicos veterinarios del mismo estado y enviadas a 4°C al laboratorio de Enfermedades de los pequeños rumiantes del CENID Salud Animal del INIFAP. Las muestras de caprinos fueron recolectadas en rebaños del estado de Guanajuato utilizando la metodología descrita por Trejo, en el libro de Enfermedades de las Cabras (Díaz et al, 2015). Todas ellas fueron colectadas durante el periodo de agosto del 2017 a mayo del 2018 para confirmar el diagnóstico clínico de LC.

7.2 Aislamiento bacteriológico y pruebas bioquímicas

Las muestras se sembraron por dilución en agar sangre ovina al 5% y se dejaron incubar por 48 horas a 37 °C. Se seleccionaron las colonias pequeñas de color blanco, rodeadas por una estrecha zona de hemólisis completa y de consistencia seca. Posteriormente se realizó tinción de Gram para la observación microscópica y fueron usadas las pruebas bioquímicas de fermentación de la glucosa, ureasa, catalasa, nitratos y prueba de CAMP y CAMP reversa para asegurar que el crecimiento en el cultivo correspondía a *C. pseudotuberculosis* (Belchior et al, 2007).

7.3 Establecimiento de protocolos para la obtención del ADN

Para evaluar la capacidad de detección del ADN de *C. pseudotuberculosis* mediante la PCRm se establecieron tres protocolos. Para el primero de ellos (Protocolo 1), se tomaron los cultivos positivos a *C. pseudotuberculosis* y se les extrajo el ADN con el estuche comercial Quick g-DNA Mini Prep (Zymo Research, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo 1). El

segundo (Protocolo 2) consistió en una extracción de ADN con el mismo estuche comercial, pero esta vez, directamente de las muestras de exudado purulento sin previo aislamiento bacteriológico. El protocolo 3 consistió en una pre-sensibilización térmica de pared celular y no en una extracción de ADN propiamente, para ello se realizó una variante de la técnica descrita por Costa (et al. 2013) en la cual se tomó una asada del exudado purulento, la cual se hirvió en 500 µL de una suspensión de PBS 1x estéril durante 10 min. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos y se usó 1 µL del sobrenadante en la reacción final para la PCRm.

7.4 Detección de *C. pseudotuberculosis* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (PCRm)

Para realizar la PCR múltiple se utilizó la premezcla Multiplex PCR Kit® (QUIAGEN, Alemania), los iniciadores para la amplificación de los fragmentos de genes de *C. pseudotuberculosis* fueron sintetizados de acuerdo a las características descritas por Pacheco et al. (2007) (Cuadro 2). El volumen final para la reacción fue de 25 µL, constituido como se muestra en el cuadro 3. Las condiciones para la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos con etapas de desnaturalización a 95°C por 60 segundos, hibridación a 58°C durante 40 segundos y extensión a 68°C durante 90 segundos; por último se realizó una extensión final a 68°C durante 90 segundos (Cuadro 4). Como control positivo para la PCRm se utilizó el ADN de la cepa de *C. pseudotuberculosis* (ATCC® 19410).

Los productos finales de la PCRm fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% preparado en una solución amortiguadora de Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM (TAE 1X) mezclado con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Australia) a una concentración final de 0.5 µg/mL, se utilizó TAE 1X como amortiguador de corrida. El gel se visualizó en un lector de rayos UV corroborando así la presencia de genes específicos para género y especie de *C. pseudotuberculosis*

Tabla 2. Lista de iniciadores utilizados en este estudio

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicón (pb)
16S rRNA	16S-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	816
	16S-R	TCTCTACGCCGATCTTGTAT	
rpoB	C2700F	CGTATGAACATCGGCCAGGT	446
	C3130R	TCCATTTGCGCCGAAGCGCTG	
pld	PLD-F	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	203
	PLD-R2	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG	

Tabla 3. Composición de reacción para la PCRm

COMPONENTE	Volumen/Reacción	Concentración final
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	12.5µL	1.5 mM Mg ²⁺
16S-F	0.25µL	0.05 µM
16S-R	0.25µL	0.05 µM
C 2700 F	0.1µL	0.02 µM
C 3130 R	0.1µL	0.02 µM
PLD F	0.1µL	0.02 µM
PLD R2	0.1µL	0.02 µM
5x Q-Solution ¹	5µL	0.5x
H ₂ O libre de RNAsas	5.6µL	-
ADN Templado	1µL	≤1 µg ADN/Reacción
Volumen final de reacción	25 µL	

¹Para secuencias ricas en G+C

Tabla 4. Condiciones para llevar a cabo la PCRm

Etapa de la reacción	Temperatura y tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C durante 3 min	
Desnaturalización	95°C durante 60 seg	
Hibridación	58 °C durante 40 seg	40
Extensión	68 °C durante 90 seg	
Extensión final	68 °C durante 90 seg	
Incubación	4 °C	

7.5 Determinación de la sensibilidad de la PCRm

Se utilizó la técnica descrita por Pacheco (2007), para ello se tomó una muestra de ADN obtenido de la cepa ATCC® 19410 de *C. pseudotuberculosis* con una concentración y calidad de ADN previamente determinada mediante espectrofotometría. Esta se ajustó a una concentración de 2000 pg/μL y se realizaron cuatro diluciones en base 10 seriadas con la solución de elusión provista por el fabricante de la prueba de extracción de ADN, cada solución contuvo una concentración final de ADN de 1000 pg, 100 pg, 10 pg y 1 pg, de esta manera se determinó el límite de detección de ADN en la PCRm.

7.6 Análisis estadístico

Mediante un cuadro de 2x2 (Jaramillo et al, 2010) se calculó para el diagnóstico bacteriológico y para cada uno de los protocolos realizados la sensibilidad, concordancia y la significancia estadística de los resultados de la PCRm acoplada a cada protocolo.

7.6.1 Sensibilidad

Se calculó con base a la siguiente fórmula (Álvarez y Pérez, 2008; Pita y Pértegas 2003).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN}$$

Donde:

VP= Verdaderos Positivos

FN= Falsos Negativos

7.6.2 Kappa de Cohen

A través de ella se calculó la concordancia entre los resultados obtenidos en la PCRm acoplada a cada uno de los protocolos. Para conocer dicha concordancia se utilizó la fórmula descrita por Cohen (1960).

$$K = \frac{PO - PE}{1 - PE}$$

Donde:

PO= Porcentaje de acuerdo observado

PE= Porcentaje de acuerdo esperado

Los resultados obtenidos se interpretaron de acuerdo a los criterios descritos por Hernández-Nieto (2002), considerándose como una concordancia excelente a aquellos valores encontrados entre 0.76 y 1, como una concordancia satisfactoria valores entre 0.41 y 0.75 y concordancia insatisfactoria los valores encontrados entre 0.40 y -1

7.6.3 Análisis de χ^2

Para conocer si existía diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos en la PCRm acoplada a cada protocolo se realizó un análisis de χ^2 utilizando un nivel de confianza del 95% (Mendivelso y Rodríguez, 2018)

$$\Sigma = \frac{(fo - fe)^2}{fe}$$

Donde:

fo= Valores observados

fe= Valores esperados

8. RESULTADOS

Se analizó un total de 20 muestras de ovinos y 30 de caprinos. Las muestras fueron exudados colectados en bolsas plásticas obtenidos directamente de las lesiones.

Las muestras se reportaban positivas al diagnóstico bacteriológico cuando las características de cultivo y bioquímicas coincidían con las descritas por Belchior et al, 2007. Mediante el diagnóstico bacteriológico se obtuvieron 39 resultados positivos (14 muestras de ovinos y 25 de caprinos) y 11 resultados negativos (6 de ovinos y 5 de caprinos), los mismos resultados se obtuvieron para el diagnóstico de PCRm acoplada al protocolo 1. Los resultados negativos corresponden a la ausencia de crecimiento bacteriológico en ocho de las muestras analizadas y al crecimiento de colonias con características morfológicas y bioquímicas diferentes a *C. pseudotuberculosis* en tres más.

En el diagnóstico mediante PCRm acoplada al protocolo 2 se obtuvieron 46 resultados positivos (18 de ovinos y 28 de caprinos). Estos fueron considerados así cuando amplificaron las porciones de los genes *16S rRNA*, *rpoB* y *pld* (figura 1); cuatro de las muestras analizadas fueron negativas (2 de ovinos y 2 de caprinos), mismas que se consideraron negativas en el diagnóstico bacteriológico y en la PCRm acoplada al protocolo 1. Mediante la PCRm acoplada al protocolo 3, los resultados fueron negativos en las 50 muestras analizadas, debido a esto no se realizó análisis estadístico para el protocolo 3.

En el cuadro 5 se resumen los resultados de las muestras que presentan diferencias entre la bacteriología y los obtenidos mediante las PCRm utilizando cada uno de los protocolos analizados. Siete de los resultados que son negativos al diagnóstico bacteriológico, resultaron positivos con la PCRm acoplada al protocolo 2. Dos muestras que resultaron positivas a bacteriología y PCRm con protocolo 1 fueron también positivas con la PCRm acoplada al protocolo 2 cuando se realizó una dilución del ADN previamente cuantificado. El límite de detección de ADN en la PCRm fue de 10 pg/ μ L.

Tabla 5. Resumen de los resultados que presentan discrepancia entre ellos

No	REGISTRO	BACTERIOLOGÍA	PCR CON EXTRACCIÓN ADN		PCR DE MUESTRA SIN EXTRACCIÓN
			CULTIVO	MUESTRA	
1	7028 Hn 297	Negativo (CI)	Negativo	Positivo	Negativo
2	6896 292	Negativo (CI)	Negativo	Positivo	Negativo
3	B003 292	Negativo (CI)	Negativo	Positivo	Negativo
4	6329	Positivo	Positivo	Positivo (Dil)	Negativo
5	6313	Negativo (SC)	Negativo	Positivo	Negativo
6	649	Negativo (SC)	Negativo	Positivo	Negativo
7	869	Negativo (SC)	Negativo	Positivo	Negativo
8	838	Negativo (SC)	Negativo	Positivo	Negativo
9	300771	Positivo	Positivo	Positivo (Dil)	Negativo

SC: Sin crecimiento bacteriológico

Dil: Dilución de ADN

CI: Crecimiento de colonias sin características morfológicas y tintoriales sugerentes a *C. pseudotuberculosis*.

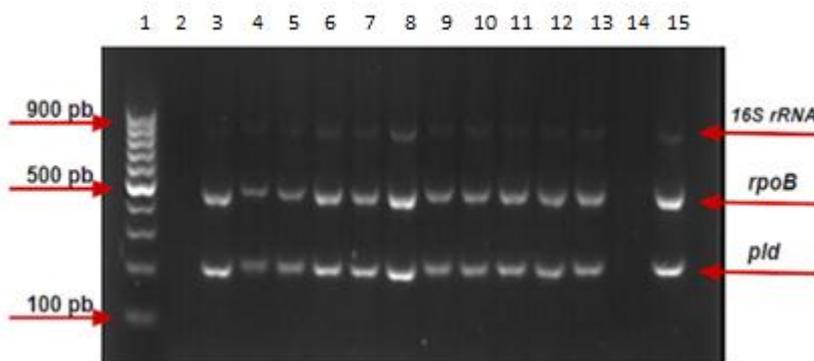


Imagen 1. Perfil de amplificación de la PCRm para *C. pseudotuberculosis* de muestras de caprino y ovino. Carril 1. Marcador de 100 pb, 2. Control negativo, 3. Control positivo, 4-9 Productos finales de la de muestras de caprino. 10-15 Productos finales de la de muestras de ovino. La muestra del carril 14 se observa negativa.

8.1 Análisis de cuadros 2 x 2 para obtención de la sensibilidad de las pruebas

En los cuadros 7 y 8 se muestra los procedimientos para el cálculo de la sensibilidad de la PCRm acoplada los protocolos 1 y 2, para ello, se considera en las columnas la “condición”, que se refiere a la presencia o ausencia de signología sugerente de LC, es positiva cuando los animales presentaban abscesos y negativa cuando no. Por este motivo, las 50 muestras obtenidas se incluyen en la columna de condición positiva. En las filas se muestran los resultados a cada uno de los métodos de diagnóstico, ya sea una prueba con resultado positivo o resultado negativo.

8.1.1 Sensibilidad del diagnóstico por bacteriología (Gold Standar)

Con el cuadro 6 se obtuvo la sensibilidad para el diagnóstico por bacteriología. Se observa que en 39 de las 50 muestras hay resultados positivos para *C. pseudotuberculosis*, los 11 restantes fueron negativos por este método de diagnóstico. Así, se obtiene una sensibilidad de 78%.

Tabla 6. Cuadro 2 x 2 para los resultados obtenidos mediante bacteriología

	Condición + (50)	Condición - (0)	TOTAL
TEST +	39	0	39
TEST -	11	0	11
TOTAL	50	0	50

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{(VP+FN)} = \frac{39}{(39+11)} = \frac{39}{50} = 0.78 \times 100 = 78 \%$$

8.1.2 Sensibilidad del diagnóstico por PCRm acoplada al protocolo 1

En el cuadro 7 se obtuvo la sensibilidad para el diagnóstico por PCRm con extracción de ADN a partir de cultivo bacteriano (Protocolo 1), los resultados que se obtuvieron fueron iguales al diagnóstico por aislamiento bacteriológico, debido a que la extracción de ADN, se realizó a partir de dicho cultivo. De las 11 muestras negativas, 3 presentan un crecimiento inespecífico, es decir, no se encontró ninguna colonia con las características de *C. pseudotuberculosis*, en 8 muestras no hubo crecimiento alguno.

Tabla 7. Cuadro 2 x 2 para los resultados obtenidos mediante la PCRm acoplada al Protocolo 1

	Condición + (50)	Condición - (0)	TOTAL
TEST +	39	0	39
TEST -	11	0	11
TOTAL	50	0	50

$$\text{Sensibilidad} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN}) = 39/(39+11) = 39/50 = 0.78 \times 100 = 78 \%$$

8.1.3 Sensibilidad del diagnóstico por PCRm acoplada al protocolo 2

De la misma manera se obtuvo la sensibilidad para el diagnóstico por PCRm acoplado al Protocolo 2 (Tabla 8). Se obtuvieron 46 resultados positivos mediante esta prueba, los 4 resultados negativos concuerdan con muestras que también fueron negativas al diagnóstico bacteriológico y por PCRm acoplado al protocolo 1, estos resultados coincidieron con las muestras donde no hubo crecimiento bacteriano. La sensibilidad de la prueba fue de 92 %.

Tabla 8. Cuadro 2 x 2 para los resultados obtenidos mediante la PCRm acoplada al Protocolo 2

	Condición + (50)	Condición - (0)	TOTAL
TEST +	46	0	39
TEST -	4	0	11
TOTAL	50	0	50

$$\text{Sensibilidad} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN}) = 46/(46+4) = 46/50 = 0.92 \times 100 = 92 \%$$

8.2 Análisis de cuadros 2 x 2 para la obtención de índice de Kappa de Kohen y χ^2

8.2.1 Diagnóstico bacteriológico VS PCRm acoplada al Protocolo 1 (Tabla 9)

Debido a que los resultados del diagnóstico bacteriológico y PCRm utilizando el protocolo 1 fueron idénticos, la prueba de Kappa entre ambos métodos mostró una concordancia excelente ($K=1$).

χ^2 es igual a 50, con un grado de libertad y una confianza de 0.95, por lo tanto, la asociación entre bacteriología y PCRm con protocolo 1 se considera que existe diferencia estadística significativa.

Tabla 9. Cuadro 2 x 2 de Bacteriología VS PCRm acoplada al protocolo 1

	Bacteriología + (39)	Bacteriología - (11)	TOTAL
PCRm P1 +	39	0	39
PCRm P1 -	0	11	11
TOTAL	39	11	50

8.2.2 Diagnóstico bacteriológico VS PCR acoplada al Protocolo 2 (Tabla 10)

En el cálculo de la concordancia entre bacteriología contra la PCRm acoplada al Protocolo 2, se obtuvo una concordancia satisfactoria ($K=0.47$).

χ^2 es igual a 15.4149, con un grado de libertad y una confianza de 0.95, por lo tanto, la asociación entre el diagnóstico bacteriológico y PCRm con protocolo 2 se considera que existe diferencia estadística significativa.

Tabla 10. Cuadro 2 x 2 de Bacteriología VS PCRm acoplada al protocolo 2

	Bacteriología + (39)	Bacteriología - (11)	TOTAL
PCRm P2 +	39	7	46
PCRm P2 -	0	4	4
TOTAL	39	11	50

9. DISCUSIÓN

Once de 50 muestras fueron negativas al diagnóstico bacteriológico (*gold standard*), de las cuales, cuatro presentaron resultados negativos para la PCRm acoplada a todos los protocolos evaluados, en donde no se observó crecimiento bacteriano y no hubo amplificación de los fragmentos de ADN de *C. pseudotuberculosis*, por estas razones, se consideran resultados verdaderamente negativos. Hernández (2005), Bek-Pederson (1997) y Pekelder (2000), mencionan que otras bacterias son capaces de producir linfadenopatía supurativa en los pequeños rumiantes, algunas de ellas son *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus licheniformis*, *Trueperella pyogenes*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*. Descartando a *Corynebacterium xerosis*, el resto de las bacterias mencionadas no presentan la capa de ácidos micólicos, una característica común a otros miembros de la familia de los actinomicetos, que algunos autores sugieren, permite que sobrevivan durante períodos prolongados en el medio ambiente (West et al., 2002). Conociendo estas características, si se hubiera tratado de un proceso piogénico ocasionado por *Corynebacterium xerosis*, el resultado estaría reflejado en la amplificación del gen 16S rRNA en alguna de las muestras negativas, apoyando este hecho con la investigación realizada por Khamis en 2004, donde menciona que la secuencia del gen 16S rRNA puede ser utilizado para la identificación de género *Corynebacterium* (Cetinkaya et al., 2002; Khamis et al., 2004)

De las siete muestras negativas restantes, tres son pertenecientes a muestras de caprinos y como se observa en el cuadro 5, hubo un crecimiento inespecífico de colonias bacterianas de las que no se obtuvo una identificación específica. Burillo, et al (2006) mencionan que en ocasiones, los microorganismos que colonizan las heridas de la piel provienen del entorno ambiental, siendo estos partes de la microbiota propia del tegumento o de las mucosas, pudiéndose considerar como contaminantes al momento de la siembra de las muestras, dificultando el crecimiento y enmascarando la presencia de los verdaderos patógenos procedentes de las lesiones directas. Por esta razón, la valoración de los primoaislamientos es de trascendencia, ya que permite aumentar el éxito en el diagnóstico, sobre todo en aquellas muestras en que existe una descripción detallada de la historia clínica, considerada información de gran utilidad. Tomando en cuenta que las lesiones de LC en muchas ocasiones se encuentran expuestas, durante la toma de muestra no sólo se recupera al microorganismo causante de la lesión, sino también a los propios de la piel del animal y del medio ambiente con que tiene contacto, disminuyendo la precisión de un diagnóstico certero mediante métodos poco sensibles como es el aislamiento bacteriológico.

Posterior al aislamiento y la observación macro y microscópica de las colonias, es necesario realizar pruebas bioquímicas como método confirmatorio del diagnóstico bacteriológico, para lo cual es necesario que se logre un aislamiento puro que garantice la obtención de resultados confiables. Una contaminación frecuente durante el cultivo bacteriológico es la que se presenta con el género *Proteus*, bacterias presentes en el suelo y en la materia orgánica (Manos y Belas, 2006). Este género bacteriano exhibe un tipo de desplazamiento en medios sólidos conocido como fenómeno de “*swarming*”, que se caracteriza por la extensión de sus colonias sobre las placas de agar sangre, formando una película que obstaculiza el crecimiento de cualquier otro microorganismo. Aunque este fenómeno no es exclusivo de *Proteus spp*, es el género en que más se ha estudiado. Otras bacterias que lo presentan son *Chromobacterium spp*, *Pseudomonas spp*, *Serratia spp*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Clostridium tetani*,

C. novyi, *C. septicum* y *Bacillus alvei*, entre otros (Belas, 1992). Con base a lo anterior, una muestra contaminada con alguno de los microorganismos antes mencionados no permitiría el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* de manera rápida y sencilla, resultando en una desventaja para la bacteriología como único método de diagnóstico, ya que aumentaría el tiempo en la emisión de un resultado, aunado a la baja sensibilidad que esta prueba tiene. Estas características pueden estar relacionadas con tres de las muestras de caprinos que se reportaron negativas al aislamiento de *C. pseudotuberculosis* y con crecimiento inespecífico observado en el cultivo, en donde hubo contaminación desde el primoaislamiento, además del crecimiento de múltiples bacterias con características muy diferentes a las de *C. pseudotuberculosis*. Cabe mencionar que estas mismas muestras fueron positivas a la PCRm con extracción de ADN mediante el protocolo 2, demostrando que la extracción de ADN directamente de las muestras clínicas puede favorecer a la sensibilidad en la confirmación del diagnóstico de LC.

Igualmente, cuatro de las muestras que pertenecen a ovinos, fueron negativas al diagnóstico bacteriológico y a la PCRm mediante la extracción del ADN con el protocolo 1 debido a que no se observó crecimiento bacteriano de ningún tipo, a pesar de esto, fueron positivas a la PCRm mediante extracción de ADN con el protocolo 2, estos resultados fueron considerados falsos negativos.

Bonini (2002) menciona que existen tres tipos de errores en el proceso de diagnóstico de una enfermedad, dos de ellos pueden estar muy relacionados con los resultados obtenidos en el presente estudio. Los pre-analíticos, asociados a la colecta y correcta conservación de muestras, influyen directamente en los resultados obtenidos durante la ejecución de la técnica diagnóstica. Siendo las muestras de ovinos recibidas directamente en el laboratorio, no es posible conocer los factores que pudieron contribuir a este error, aunque se pueden suponer los errores como en la técnica de toma de muestra, no usar el material adecuado para la recolección de la misma, la incorrecta conservación y el tiempo considerado para el envío de la muestra que asegure la viabilidad de los microorganismos asociados a la patología que se desea confirmar.

Los errores de la fase analítica abarcan todos los procedimientos relacionados directamente con el procesamiento de la muestra, la realización de las pruebas solicitadas y la validación e interpretación de los resultados emitidos. Nutting (1996), Plebani y Carraro (1997) estiman que, en la fase analítica, la incidencia de errores asciende al 13% del total que se producen, aunque hay otros autores como Wiwanitkit (2001) y Boone (1993) que consideran una incidencia de 4,35% y de 7% respectivamente. Los errores de la fase analítica pueden evitarse al tener un proceso estrictamente metódico, tal como fue realizado en este estudio, con los procedimientos anteriormente descritos y tomando en cuenta esto, se infiere que dentro de este estudio se redujeron los errores de esta fase, aun así, se deben considerar como errores comunes siempre y cuando se presenten en la frecuencia ya establecida.

Plebani y Carraro (1997) mencionan que altas concentraciones de material genético en las muestras pueden provocar una inhibición sobre la PCR, ya que los cebadores y DNTP's se agotan en los ciclos iniciales del termociclado o bien, puede también ocasionar la inhibición de la ADN polimerasa (Dittapongpitch, 2003; Altshuler, 2008). Se estima que la concentración máxima de ADN que debe ser utilizado por reacción es de 500 ng (Eguiarte et al. 2007). Por esta razón, se decidió hacer una dilución 1:4 en dos muestras que arrojaron un resultado negativo, posteriormente se volvió a realizar la PCRm, atribuyendo el primer resultado a una

inhibición por exceso de material genómico, ya que esas muestras presentaron concentraciones superiores a los 1000 ng. Los resultados que se presentaron en la segunda PCRm utilizando el ADN diluido, fueron positivos. De esta manera se comprobó que las altas concentraciones del ADN afectan directamente la confianza de los resultados de la prueba.

Un factor importante en la técnica de PCR es el método de extracción del ADN, porque los inhibidores de las polimerasas de ADN pueden ser extraídos conjuntamente y la calidad y cantidad de la secuencia blanco condicionan los siguientes pasos de la técnica, así pues, un resultado negativo puede deberse a la ausencia de la secuencia blanco, pero también a la inhibición total de la amplificación (falso negativo) (Poma, 2012). En este estudio se intentó realizar la PCRm prescindiendo de la extracción de ADN (Protocolo 3), aumentando todas las posibilidades de la presencia de los inhibidores de las polimerasas de ADN que pudieran estar contenidas en la muestra, los resultados que se obtuvieron fueron negativos. Esta constancia en los resultados se puede atribuir a una inhibición de la PCR debido a las posibles altas concentraciones de contaminantes orgánicos e inorgánicos incluidos en la muestra. De estos, se han reportado una amplia variedad y son particularmente abundantes en muestras complejas como fluidos animales, alimentos, suelos orgánicos y muestras con altas concentraciones bacterianas (Moreira 1998, Queiroz 2001).

Entre las sustancias inhibitoras de la PCR se encuentran los iones de hierro y calcio, los ácidos húmicos (Schriewer, 2011) y los taninos, cuyos grupos fenólicos libres se oxidan para formar quinonas que inactivan la polimerasa de ADN (Kontanis, 2006), el grupo hemo, la heparina, los anticuerpos, los lípidos (Kubista, 2006) y el tiocianato de guanidina, entre muchos otros. Como en cualquier reacción enzimática, la magnitud del impacto dependerá del tipo de inhibidor y de su concentración (Nolan, 2006). Dentro de una muestra de exudado purulento se van a encontrar múltiples restos celulares, tanto del patógeno como de huésped, y sin un proceso de eliminación de excesos de estos residuos, se puede producir una inhibición de la PCRm, una característica estructural de *C. pseudotuberculosis* es que posee una gran cantidad ácidos corimicólicos en su pared celular, la presencia de estos compuestos puede estar relacionados en la inhibición de la reacción cuando se utilizó el protocolo 3.

Ilhan, 2013, realizó una comparación similar a la realizada en éste estudio, utilizando como muestras los linfonodos completos recuperados de cadáveres de ovinos para después extraer el ADN mediante el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, la PCR usada en su estudio amplifica únicamente la porción del gen *pld* y al comparar los resultados de PCR con los obtenidos mediante la bacteriología, observó que existieron diferencias significativas con un análisis χ^2 , siendo la PCR el método más eficiente. En el presente estudio se demostró mediante la prueba de χ^2 que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en bacteriología y los obtenidos mediante la PCRm usando el protocolo 2, asegurando además una buena cantidad y calidad de material genético para el diagnóstico. En los resultados de PCR, Ilhan obtiene una sensibilidad del 98.76% mientras que en este estudio se obtuvo una sensibilidad de 92%, esto puede deberse a que no se tuvo el control de la toma y el envío de las 20 muestras pertenecientes a ovinos, en donde se observa que en seis de ellas no hay crecimiento bacteriano al primoaislamiento o hay contaminación con otras bacterias no identificadas.

El índice de Kappa obtenido entre la bacteriología y la PCRm acoplada al protocolo 1 fue de 1, referida como una concordancia perfecta. Para el diagnóstico bacteriológico y la PCRm acoplada al protocolo 2 fue de 0.47, estadísticamente considerada como una concordancia

satisfactoria (Hernández-Nieto, 2002; Landis y Koch, 1977). La diferencia de las concordancias obtenidas entre la bacteriología y los resultados de la PCRm con ADN obtenido en ambos protocolos es debido a que el protocolo de extracción 2 permitió la detección de 46 muestras positivas a LC, mientras que el aislamiento y el PCRm con extracción de ADN mediante el protocolo 1 solo lograron detectar a 39 de las 50 muestras analizadas. Al igual que lo previamente reportado por Pacheco (2007), el límite de detección obtenido en la PCRm utilizada en este trabajo fue de 0.001ng de ADN bacteriano.

Cetinkaya en el 2002, diseñó una PCR para la identificación de *C. pseudotuberculosis* a partir de la amplificación de una porción del gen *16S rRNA* y analizando un total 118 muestras de exudado purulento de ovejas y cabras, obtuvo 93 resultados positivos con la amplificación de la porción del gen *16S rRNA*, y 96 positivas mediante, pruebas bioquímicas, CAMP y CAMP reversa. Las tres muestras que no fueron similares presentaron resultados negativos a la producción de PLD y a la reducción de urea, es decir se obtuvieron tres resultados falsos positivos para las pruebas bioquímicas y pruebas de CAMP y CAMP reversa, lo que disminuye la especificidad de la prueba. En contraste con los resultados de Cetinkaya, en el presente trabajo se obtuvieron 11 resultados negativos a la bacteriología, de los cuales 7 fueron positivos a la PCRm acoplada al protocolo 2. La similitudes se observan en la amplificación a 815 pb de la banda correspondiente al gen *16S rRNA* para el 100% de los verdaderos positivos. A pesar de esto no se debe perder de vista que la amplificación de la porción del gen *16S rRNA*, determinará sólo el género bacteriano.

Khamis en 2004, localizó una región hipervariable del gen *rpoB* del género *Corynebacterium*, a partir de la cual desarrolló iniciadores específicos para este género. Alibi en 2015, mediante el mismo gen, realizó una identificación de diversas cepas de *Corynebacterium* incluidos todos los miembros de este género de importancia en medicina clínica, entre ellas *C. pseudotuberculosis*. Logrando ambos autores la amplificación de una banda de 446 pb para esta especie. Igualmente, en este estudio la amplificación de la banda correspondiente al gen *rpoB* es de 446 pb para el 100% de los resultados positivos a PCRm, sin importar el protocolo de extracción de ADN al cual sea acoplada. Por otro lado, el gen *pld* es el principal factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, esta proteína también es producida por *C. ulcerans*, por lo que Pacheco en 2007 diseñó un iniciador específico para el gen de cada género. Al igual que en la investigación de Pacheco, la amplificación del gen *pld* resultó en una banda de 206 pb para todas las extracciones de ADN de ambos protocolos en cepas de *C. pseudotuberculosis* o exudados purulentos que contenían a esta bacteria.

10. CONCLUSIÓN

Se demostró que la PCRm mediante la extracción de ADN a partir de muestras de exudado purulento (protocolo 2) es el más eficiente para el diagnóstico de la LC debido a su mayor sensibilidad y rapidez en la emisión de un diagnóstico, demostrando una mejor capacidad de detección del agente etiológico en comparación con la *gold standar*.

Debido a que *Corynebacterium pseudotuberculosis* puede afectar a diferentes especies animales donde no es hasta el momento un problema común, se sugiere que la PCRm puede ser implementada como un método de diagnóstico más preciso en enfermedades como pigeon fever en los equinos, linfangitis ulcerativa en los bovinos y porcinos, así como la enfermedad

de la piel edematosa en búfalos, además de tener potencial para ser utilizada en modelos experimentales de investigación.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aleman, M., Spier, S.J. (2001). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In Large Animal Internal Medicine 3 ed. 1078-1084.
- Alibi S., Ferjani A., Gaillot O., Marzouk M., Courcol R., Boukadida J. (2015) Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathologie-Biologie*. Vol 63. p 153 - 157
- Almuzara MN., De Mier C., Rodríguez CR., Famiglietti MR., Vay CA. (2006). Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la identificación de bacilos gram-positivos difteroides de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol 38. p 197-201.
- Altshuler ML. (2008). PCR troubleshooting the essential guide. Editorial Castier Academic Press. Reino Unido. p 51-52.
- Álvarez HE, Pérez E. (2008). Utilidad clínica de la tabla 2x2. *Revista de Evidencia e Investigación Clínica*. Vol 2. p 22 - 27.
- Augustine JL., Renshaw HW. (1986). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. *American Journal of Veterinary Research*. Vol 47. p 713-715.
- Ayers JL. (1977). Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol 171. p. 1251–1254.
- Baird, GJ. (2003). Current perspectives on caseous lymphadenitis. *Journal of Postgraduate Clinical Study*. Vol 25. p 62-68.
- Baird GJ., Fontaine MC. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*. Vol 137. p 179–210.
- Barksdale L., Linder R., Sulea IT., Pollice M. (1981). Phospholipase-D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the Genus *Corynebacterium*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 13. p 335-343.
- Bascomb S., Lapage SP., Curtis MA. Willcox WR. (1973). Identification of bacteria by computer: identification of reference strains. *Journal of General Microbiology*. Vol 77. p 291-315.
- Batey RG. (1986). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*. Vol 63. p 269-272.

- Barrientos JS, Cortés N, Tórtora JL, Alba F, Del Río JC, Valdivia G. (2008). Diferentes Biotipos de *Corynebacterium Pseudotuberculosis*. Revista Electrónica de Clínica Veterinaria. Revista Electrónica de Clínica Veterinaria. Vol 3. p 1-23.
- Bek-Pederson S. (1997). An outbreak of Morel's disease among Lacoune sheep imported to Denmark. Proceedings of the Sheep Veterinary Society. Vol 21. p 143-144.
- Belas, R. (1992) The swarming phenomenon of *Proteus mirabilis*. Intercellular communication and multicellular interactions may provide clues to this 100-years-old mystery. American Society for Microbiology News. Vol 58. p 15-22.
- Belchior SE., Gallardo A., Abalos A., Jodor N., y Jensen O. (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: El agente etiológico y la enfermedad. Veterinaria Argentina. Vol 23. p 258-278.
- Belchior SE., Gallardo A., Abalos A., Jodor N., y Jensen O., Díaz Y., Álvarez L., Callejo R., Prieto M. (2007). Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. Revista Argentina de Microbiología. Vol 39. p 44-46.
- Bernheimer AW., Linder R., Avigad LS. (1980). Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. Infection and Immunity. Vol 29. p 123-131.
- Billington SJ, Esmay PA, Songer JG, Jost BH. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. FEMS Microbiology Letters. Vol 208. p 41-45
- Binns S, Green L, Bailey M. (2007). Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. Veterinary Microbiology Vol 123. p 169–179.
- Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. (2002). Errors in laboratory medicine. Clinical Chemistry. Vol 48. p 691-698.
- Boone DJ. (1993). Governmental perspectives on evaluating laboratory performance. Clinical Chemistry. Vol 9. p 1461-1465.
- Braverman Y., Chizov-Ginzburg A., Saran A., Winkler M. (1999). The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. Revue scientifique et technique. Vol 18. p 681-690.
- Brown CC., Olander HJ., Zometa C., Alves SF. (1986). Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. American Journal of Veterinary Research. Vol 47. p 1461– 1463.
- Brown CC., Olander HJ., Alves SF. (1987). Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. Canadian Journal of Veterinary Research. Vol 51. p 46–49.

- Brown, CC., Olander, HJ. (1987). Caseous Lymphadenitis of Goat and Sheep: A Review. *Veterinary Bulletin*. Vol 57. p 1-12.
- Burillo A., Moreno A., Salas C. (2006). Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Vol 1. p 1-20
- Burrell DH. (1978). Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. *Research in Veterinary Science*. Vol 24. p 269-276.
- Buxton A., Fraser G. (1977). *Corynebacterium*. *Animal Microbiology*, Blackwell Scientific Publications. Vol 1. p. 177–183.
- Carrera B. (2008). La ovinocultura en México: ¿alternativa para los productores rurales? Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Cetinkaya B., Karahan M., Atil E., Kalin R., De Baere T., Vaneechoutte M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*. Vol 88. p 75-83.
- Christie R., Atkins NE., Munch-Petersen E. (1944). A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. Vol 22. p 197-200.
- Cohen J. (1960). A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement*. Vol 20. p 37- 46.
- Collett MG., Bath GF., Cameron CM. (1994). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Segunda edición. Ed Oxford University Press. Cape Town. p.1387-1395.
- Collins MD., Goodfellow M., Minnikin DE. (1982). Fatty Acid Composition of Some Mycolic Acid-containing Coryneform Bacteria. *Journal of General Microbiology*, Vol 128. p 2503-2509.
- Costa LF., Ribeiro D., Hirata R., Pacheco LG., Souza MC., Dos Santos L., Dos Santos C., Salah M, Da Costa M., Ribeiro M., Selim S., Carvalho V., Mattos AL. (2013) Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol 108. p 272-279
- Coyle MB., Hollis DG., Groman NB. (1985). *Manual of Clinical Microbiology*. Cuarta edición. Ed. American Society for Microbiology. *Corynebacterium* spp. and other coryneform organisms. pp.198-199.
- Davis EW. (1990). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in animals. *Large Animal Internal Medicine* Ed., C.V. Mosby Company. Toronto. p.1120-1126.

- Delgado A, Zárraga J, Chirino-Zárraga CI, Carrero LL. (2015). Caracterización epidemiológica de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Paraguaná, Venezuela. *Revista De Medicina Veterinaria*. Vol 31. p 35-45.
- Dennis SM., Bamford VW. (1966). The role of *Corynebacteria* in perinatal lamb mortality. *Veterinary Record*. Vol 79. p 105-108.
- Dercksen DP., Brinkhof MA., Dekker-Nooren T., Van Maanen K., Bode CF., Baird G., Kamp E.M. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*. Vol 75. p 167–175.
- Díaz E, Tórtora JL, Palomares EG, Gutiérrez JL. (2015). Enfermedades de las Cabras. SAGARPA. Linfadenitis caseosa. p. 209-216. México.
- Dittapongpitch V, Surat S. (2003). Detection of *Ralstonia solanacearum* in soil and weeds from commercial tomato fields using immunocapture and the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*. Vol 151. p 239-246.
- Dorella F., Pacheco LG., Oliveira S., Miyoshi A., Azevedo V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*. Vol 37. p 201-218.
- Egen NB., Cuevas W., McNamara PJ., Sammons DW., Humphreys R., Songer JG. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *American Journal of Veterinary Research*. Vol 50. p 1319–1322.
- Eguiarte LE., Souza V., Aguirre X. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: *Ecología Molecular*. 1a Edición. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. Ciudad de México. p 517-540
- Foley JE, Spier SJ, Mihalyi J, Drazenovich N, Leutenegger CM. (2004). Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. *American Journal of Veterinary Research*. Vol 65. p 1734-1737.
- Fontaine MC., Baird G., Connor KM., Rudge K., Sales J., Donachie W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*. Vol 24. p 5986-5996.
- Fraser G. (1961). Haemolytic activity of *Corynebacterium ovis*. *Nature*. Vol 189. p 246
- Galaviz JR., Vargas S., Zaragoza JL., Bustamante A., Ramírez E., Guerrero J., Hernández JS. (2011). Evaluación territorial de los sistemas de producción ovina en la región norponiente de Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. Vol 2. p 53-68.
- Halbert ND., Reitzel RA., Martens RJ., Cohen ND. (2005). Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the vapA gene. *American Journal of Veterinary Research*. Vol 66. p 1380–1385.

- Hard GC. (1972). Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. Journal of Medical Microbiology. Vol 5. p 483-491.
- Hard GC. (1975). Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. Infection and Immunity. Vol 12. p 1439-1449.
- Hernández AL., Díaz E., Aguilar RF, Vázquez NJ. (2005). Manual Para El Diagnóstico De Enfermedades En Ovinos y Caprinos En México. SAGARPA. Linfadenitis caseosa. p 78-81. México.
- Hernández León F. (2015) Caracterización Molecular De *Corynebacterium pseudotuberculosis* Aislados De Muestras De Casos Clínicos De Linfadenitis Caseosa En Ovinos Y Caprinos. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Del Estado De México. Estado De México, México.
- Hernández-Nieto RA. (2002). Contribuciones al análisis estadístico. IESINFO. Venezuela.
- Hernández F., Acosta J., Vázquez JC, Fernandez P., Montes de Oca R. (2016) Identification and molecular characterization of *Corynebacterium xerosis* isolated from a sheep cutaneous abscess: first case report in Mexico. BMC Research Notes. Vol 9. p. 1-6.
- Hodgson AL., Bird P., Nisbet IT. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Journal of Bacteriology. Vol 172. p 1256–1261.
- Hodgson, AL., Krywult J., Corner LA., Rothel JS., Radford AJ. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. Infection and Immunity. Vol 60. p 2900-2905.
- Hodgson, ALM., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, LA., McColl Mand, CA. (1999). Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D. Vaccine. Vol. 17. p. 802-808.
- Ilhan Z. (2013). Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. Revue de médecine vétérinaire. Vol 164.p 60-66.
- Íñiguez L. (2013). La Producción de Rumiantes Menores en las Zonas Áridas de Latinoamérica. EMBRAPA.
- Jaramillo A, Martínez M. (2010). Epidemiología veterinaria. Primera edición. Manual moderno. Consideraciones en el uso de pruebas diagnósticas. p. 147. México.
- Khamis A., Raoult D., La Scola B. (2004). rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. Journal of Clinical Microbiology. Vol 42. p 3925–3931

- Kontanis EJ., Reed FA. (2006). Evaluation of Real-Time PCR Amplification Efficiencies to Detect PCR Inhibitors. Vol. 51. p 795- 804
- Kubista M., Andrade JM., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. Vol 27. p 95-125.
- Lan DTB., Makino S., Shirahata T., Yamada M., Nakane A., (1999). Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon are Required for the Development of Protective Immunity to Secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Mice. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol 61. p. 1203-1208.
- Landis JR, Koch GG. (1977). An Application of Hierarchical Kappa-type Statistics in the Assessment of Majority Agreement among Multiple Observers, *Biometrics* Vol. 33 p. 363-374
- Laven RA., Pritchard GC., Jackson P.G. (1997). Generalized Caseous Lymphadenitis. *Veterinary Research*. Vol. 1 p. 141-479.
- Lechevalier H., Lechevalier M., Gerber N. (1971). Chemical Composition as a Criterion in the Classification of *Actinomycetes*. *Advances in Applied Microbiology*. Vol 14. p. 47 - 72.
- Lloyd S. (1994). Caseous lymphadenitis in sheep and goats. *In Practice*. Vol 16. p 24-27.
- López I, Pita S. (1999) Medidas de concordancia: el coeficiente kappa. *Cadernos de Atención Primaria*. Vol 6. p 169- 171.
- Manos, J. and Belas, R. (2006). The genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*, In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Editors), *The Prokaryotes*, Vol. 6, pp. 245–269, Springer Verlag, Berlin
- Martín W, Aitken ID. (2000). Enfermedades de la oveja. 2º edición. Acribia. Linfadenitis caseosa ovina. p 329-333. España.
- McKean SC., Davies JK., Moore RJ. (2007). 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*. Vol 153. p 2203-2211.
- McNamara PJ., Bradley GA., Songer JG. (1994). Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Molecular Microbiology*. Vol 12. p 921-930.
- McNamara PJ., Cuevas WA., Songer JG. (1995). Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene*. Vol 156. p 113-118.
- Mendivelso F, Rodríguez M. (2018) Prueba chi-cuadrado de independencia aplicada a tablas 2xn. *Revista Médicas Sanitas*. Vol 21. p 92-95

- Menzies, PI., Muckle, CA. (1989). The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. *Canadian Journal of Veterinary Research*. Vol. 53. p 313-318.
- Menzies PI., Hwang TI., Prescott JF. (2004). Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*. Vol 100. p 129–137.
- Montemayor A. (2017). Producción de caprino en México. VIII Foro Nacional Del Caprino. No 24. p 24-27.
- Moreira D. (1998). Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*. Vol. 26. p 3309 - 3310
- Moreno C., Cabello P., Martínez M., Blasco R., Castillo F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of Bacteriology*. Vol 181. p 6573– 6584.
- Muckle CA., Gyles CL. (1983). Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. *American Journal of Veterinary Research*. Vol 44. p 1149-1153.
- Nagy G. (1976). Caseous lymphadenitis in sheep methods of infection. *Journal of the South African Veterinary Association*. Vol 47. p 197-199.
- Nahed J. (2002). Animales domésticos y agroecosistemas campesinos. *Revista LEISA*. Vol 18. p 10-11.
- Nolan T., Hands RE., Bustin SA. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*. Vol 1. p 1559-1582
- Nutting PA., Main DS., Fischer PM., Stull T., Pontious M., Seifert M., Boone DJ., Holcomb S. (1996). Problems in laboratory testing in primary care. *Journal of the American Medical Association*. Vol 275. p 635-639.
- Pacheco LG., Pena RR., Castro L. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from purecultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*. Vol 56. p 480–486.
- Papaspyrou S., Smith C. J., Dong L. F., Whitby C., Dumbrell AJ, Nedwell DB. (2014). Nitrate reduction functional genes and nitrate reduction potentials persist in deeper estuarine sediments. Why? *Plos One*. Vol 9. p 1-13.
- Partida JA., Varela D., Severiano H., Ríos FG., Rodríguez G. (2013). Producción de Carne Ovina. Libro Técnico No. 5 CENID en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP

- Paton MW., Mercy AR., Wilkinson FC., Gardner JJ., Sutherland SS., Ellis TM. (1988). The Effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. Australian Veterinary Journal. Vol 65. p 117 - 119.
- Paton MW., Sutherland SS., Rose IR., Hart RA., Mercy AR., Ellis TM. (1995). The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. Australian Veterinary Journal. Vol 72. p 266–269.
- Paton MW., Collett MG., Pepin M., Bath GF. (2005) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. Infectious Diseases of Livestock. Tercera Edición. ED. Oxford University Press. África. p 1917-1930
- Pekelder JJ. (2000). Caseous lymphadenitis. Diseases of Sheep. Tercera edición. Ed. Blackwell Science. Oxford. p. 270-274.
- Pepin M., Cannella D., Fontaine JJ., Pittet JC., Le Pape A. (1992). Ovine mononuclear phagocytes in-situ: identification by monoclonal antibodies and involvement in experimental pyogranulomas. Journal of Leukocyte Biology. Vol 51. p 188-198.
- Pepin M., Paton M., Hodgson AL. (1994a). Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. Current Topics in Veterinary Research. Vol 1. p 63-82.
- Pepin M., Pittet JC., Olivier M., Gohin I. (1994b). Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. Journal of Leukocyte Biology. Vol 56. p 666-670.
- Pita Fernández S., Pértegas Díaz S. (2003). Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. Cuadernos de Atención Primaria. Vol 10. p 120 - 124
- Plebani M, Carraro P. (1997). Mistakes in a stat laboratory: Types and frequency. Clinical Chemistry. Vol 43. p 1348-1351.
- Poma H., Davies C., Gutiérrez D., Mora MC., Basombrío MÁ., Rajal V. (2012). Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR. Efecto de las sustancias inhibidoras. Revista Argentina de Microbiología. Vol 44. p 144-149.
- Queiroz PS., Santos FM., Sassaroli A., Hársi CM., Monezi TA., Mehnert DU. (2001) Electropositive Filter Membrane as an Alternative for the Elimination of PCR Inhibitors from Sewage and Water Samples. Applied and environmental microbiology. Vol 67. p 4614–4618.
- Radostits OM., Gay CC., Blood DC., Hinchcliff KW. (2000). Caseous lymphadenitis in sheep and goats. Veterinary Medicine. Novena edición. ED. W.B. Saunders, Londres. p 727-730.

- Renshaw HW., Graff VP., Gates NL. (1979). Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Moraxella* spp. from internal abscesses in emaciated ewes. American Journal of Veterinary Research. Vol 40. p 1110-1114.
- Ruiz, J., Quintana, M., Barrera, M. (1995). Aislamiento y clasificación Bioquímica de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la provincia de La Habana. Revista de Salud Veterinaria. Vol. 17. p 307-309.
- Selim SA. (2001). Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health. Vol 48. p 241-258.
- SAGARPA, SIAP (2015). Se consolida en México ganadería de pequeños rumiantes https://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_00190_27.aspx
- SAGARPA (2016). Plan rector sistema producto ovinos (2015-2024). Actualización 2016 (con base en resultados de la reunión de planeación estratégica. Febrero 2016)
- Schriewer A., Wehlmann A., Wuertz S. (2011). Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. Journal of Microbiological Methods. Vol 85. p 16–21.
- Selvy, PE., Lavieri, RR., Lindsley, CW., Brown, HA., (2011). Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. Chemical Reviews. Vol. 111. p. 6064-6119.
- Shigidi M.T.A. (1978). An indirect haemagglutination test for the sero-diagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Research in Veterinary Science Vol. 24. p 57-60.
- SIAP (2015). Ovino Población ganadera 2006 - 2015 Cabezas. <https://www.gob.mx/siap/poblacion-ganadera/>
- Songer JG., Beckenbach K., Marshall MM, Olson GB, Kelly L. (1988). Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. American Journal of Veterinary Research. Vol. 49. p 223-226.
- Songer JG. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence, Trends in Microbiology. Vol 5. p 156–160.
- Soucek A., Souckova, A., Mara, M. and Patocka, F. (1962). Observations on the biological properties of atypical haemolytic *Corynebacteria* isolated from man as compared with *Corynebacterium haemolyticum*, *Corynebacterium pyogenes bovis* and *Corynebacterium ovis*. II. In vitro investigations. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology. Vol 6. p. 13-23.

- Soucek A., Souckova A., Patocka F. (1967). Inhibition of the activity of α -toxin of *Clostridium perfringens* by toxic filtrates of corynebacteria. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology. Vol 11. p 123-124.
- Spier SJ., Leutenegger CM., Carroll SP., Loye JE., Pusterla JB., Carpenter TE., Mihalyi JE., Madigan JE. (2004). Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. American Journal of Veterinary Research. Vol 65. p. 829-834.
- Stoops SG., Renshaw HW., Thilsted JP. (1984). Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. American Journal of Veterinary Research. Vol 45. p. 557-561.
- Sutherland SS., Ellis TM., Mercy AR., Paton M., Middleton H. (1987). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. Australian Veterinary Journal. Vol 64. p 263–266.
- Tashjian JJ., Campbell SG. (1983). Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopic study. American Journal of Veterinary Research. Vol 44. p 690-693.
- Ter, EA., Bosch J., bijl GC., Schreuder, BE. (1992). 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. vol53, 1125-1132.
- Titball R.W. (1993). Bacterial phospholipases C. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol 57. p 347-366.
- Tovar Luna, Ignacio. (2009). Goat production in Mexico. Overview of the industry and its production practices. Proceedings of the 24th Annual Goat Field Day. Oklahoma, Universidad de Langston.
- Valencia, MC., Villalta, MP., García J., Gironés, O., Muzquiz, JL., Alonso, JL. (1987). Técnica de inmunofluorescencia indirecta aplicada a la detección de anticuerpos frente a la célula de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis. Medicina Veterinaria. Vol 4. p. 7-8.
- Valli VEO., Parry BW. (1993). Caseous lymphadenitis. Pathology of Domestic Animals, Vol. 3. Cuarta edición. Ed Academic Press. San Diego. p 238-240.
- Vázquez V. (2015). Ganado menor y enfoque de género. aportes teóricos y metodológicos. Desarrollo Rural, Colegio de Postgraduados, Carretera Federal México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Estado de México. 56230. Agricultura Sociedad y Desarrollo. Vol 12. p 515-531.
- Viscaino L., Valcárcel F., González M., Garrido F., Cubero MJ. (2002). Diagnóstico de la Pseudotuberculosis o linfadenitis caseosa. Dialnet. Vol. 78. p 33-49.

- Quinn PJ., Carter ME., Markey B., Carter GR. (1994). *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. Clinical Veterinary Microbiology, Wolfe Publishing Company, London, pp.137-143.
- Wadowsky RM., Michaels RH., Libert T., Kingsley LA., Ehrlich GD. (1996). Multiplex PCR-based assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab specimens. Journal of Clinical Microbiology. Vol 34. p 2645–2649.
- West DM., Bruere AN., Ridler AL. (2002). The Sheep: Health, Disease and Production. Ed. Foundation for Continuing Education. Caseous lymphadenitis. Nueva Zelanda. pp. 274-279.
- Williamson LH. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice. Vol 17. p 359-371.
- Windsor, PA. (2011). Control of caseous lymphadenitis. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice. Vol 27. p 193–202.
- Wiwantkit V. (2001). Types and frequency of preanalytical mistakes in the first. BMC Clinical Pathology. Vol 1. p 1-5.
- Yeruham I., Braverman Y., Shpigel NY., Chizov-Ginzburg A., Saran A., Winkler M. (1996). Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. Vet Q. Vol 18. p 87-89.
- Yozwiak ML., y Songer JG. (1993). Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. American Journal of Veterinary Research. Vol 54. p 392-397.
- Zumft WG. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification?. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 61. p 533–616.

ANEXO 1. Método de extracción de ADN mediante kit Comercial Zimo Research Quick g-DNA Mini Prep (Zimo Research, EUA).

El método de extracción consiste en agregar 200 μ L de PBS 1x, en un tubo Eppendorf en donde se agregó una asada de muestra o de cultivo, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, con esto se formó una pastilla en el fondo del tubo, y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 500 μ L de solución de lisis, se mezcló hasta deshacer la pastilla y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Continúa con una centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, nuevamente hubo una formación de una pastilla al fondo y el sobrenadante se transfirió a una columna con tubo colector, evitando estrictamente que la pastilla pase a la columna. Posteriormente se agregó 200 μ L de solución de pre-lavado, se centrifuga a 10 000 gravedades durante un minuto, se agregó 500 μ L de solución de lavado, se centrifuga a 10 000 gravedades durante tres minutos, la columna se cambia a un tubo Eppendorf estéril y se agrega 50 μ L de solución de elución y se dejó incubar durante 15 minutos y se realizó una centrifugación a 8 500 rpm durante un minuto. El ADN obtenido se dejó reposando a temperatura ambiente durante 15 minutos y se almacenó en congelación.