



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Concordancia entre pruebas de ELISA, PCR y aislamiento
bacteriano, para diagnóstico de linfadenitis caseosa en pequeños
rumiantes

Tesis

Para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista

Presenta

David López Machorro

Asesores: Dra. María Guadalupe Martínez Serrano

Dr. José Francisco Morales Álvarez

Cuautitlán Izcalli. Estado de México 2023



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.

Dedicatoria

Este trabajo es dedicado

Al pueblo de México, que con el esfuerzo de su trabajo diario contribuyen a la formación de muchos estudiantes como yo que salen de las universidades públicas ya que si no fuera por ese gran esfuerzo colectivo muchos nos veríamos excluidos del estudio.

A los trabajadores del campo que dedican su vida a producir nuestros alimentos.

A los animales que entregan sus vidas para alimentarnos y hacernos compañía, y que hermocean el mundo que vivimos.

A todos ellos les ofrezco mi vida y mi trabajo. Esperando ser buen servidor y contribuir con una pequeña parte para el bienestar de los que me rodean.

Agradecimientos

A Dios Padre de todo, por el amor que proviene de Él, y que me levanto en los momentos en donde ni yo confiaba en mí

A mis papás que han sacrificado con amor muchas cosas para permitir que su hijo se prepare y sea un buen servidor en este mundo y porque han sabido ser una excelente escuela de la vida y el amor.

A los profesores que me han formado académicamente

En especial al Doctor José Francisco Morales Álvarez y a la Doctora María Guadalupe Martínez Serrano que han dedicado su tiempo, y han sido una luz en la oscuridad, al momento de guiarme para realizar este trabajo.

A los compañeros y amigos que me han apoyado en mi etapa de estudiante.

Así como al Laboratorio de Diagnóstico del CENID Salud Animal e Inocuidad del INIFAP y a su personal, en especial a la doctora Sara y la doctora Nancy de las cuales aprendí muchas cosas.

Gracias a todos.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
El ganado ovino en México.....	2
La enfermedad	3
El agente.....	4
Factores de virulencia.....	5
Patogénesis.....	7
Diagnostico de la enfermedad	8
Justificación	10
Hipótesis	11
Objetivos	11
General	11
Específicos	11
Materiales y Métodos	12
Aislamiento Bacteriano	14
Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR	15
Ensayo De Inmunoabsorción Ligado A Enzimas ELISA	17
Modelo estadístico	18
Resultados	20
Discusión	26
Conclusión	29
Referencias	30
Anexos I	33
A.- Tinción de Gram	33
B.- Protocolo de extracción de ADN	34

Concordancia entre pruebas de ELISA, PCR y aislamiento bacteriano, para diagnóstico de linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes¹

Resumen

La linfadenitis caseosa es una enfermedad causada por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, afecta principalmente a ovinos y caprinos. Se manifiesta con la presencia de abscesos en los linfonodos de los animales. Existen dos presentaciones, la cutánea en donde se observan los abscesos en los linfonodos superficiales; y la presentación visceral en donde los abscesos se presentan en linfonodos viscerales. Esta enfermedad se puede diagnosticar de varias formas, por ejemplo, se puede hacer basado en cuadro clínico, sin embargo, esta opción no permite saber con certeza si *C. pseudotuberculosis* es la causante de las lesiones, o se trata de otras bacterias que también generan abscesos. Para tener esa certeza se puede hacer uso de pruebas de laboratorio, la principal prueba utilizada es el cultivo para el aislamiento bacteriano, esta es considerada la prueba de oro para el diagnóstico de esta enfermedad, sin embargo, tiene limitaciones, como el hecho de que no puede identificar animales con la presentación visceral, a menos de que se haga la necropsia y se obtengan muestras de lesiones sugestivas, además de que el análisis bacteriológico requiere de varios días para poder tener resultados. Otra prueba utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ésta es más rápida, y presenta muy buena sensibilidad y especificidad. Como el aislamiento bacteriano también necesita del material purulento por lo que tampoco se puede utilizar para detectar animales con la presentación visceral. El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), es otra prueba que se puede utilizar para el diagnóstico de linfadenitis caseosa, y a diferencia de las anteriores, utiliza muestras sanguíneas, lo que permitiría detectar animales con la presentación visceral de la enfermedad.

En este trabajo se comparó el aislamiento bacteriano con la prueba de ELISA, para determinar el índice de concordancia. El cálculo del índice, reveló un valor de 0.59, lo que indica que hay un grado de acuerdo moderado y por lo tanto la prueba de ELISA tiene validez diagnóstica aceptable. La prueba de PCR, que se utilizó para identificar las colonias obtenidas en el aislamiento bacteriano, en lugar de las pruebas bioquímicas, fue una alternativa excelente para la identificación de *C. pseudotuberculosis*. También se realizó el grado de concordancia entre la prueba de ELISA y la presencia o ausencia de abscesos superficiales, donde se obtuvo una índice *kappa* de 0.1225. Este grado bajo de acuerdo, se dio por un número alto de animales sin abscesos superficiales que dieron positivos a la ELISA, lo que podría sugerir que estos animales pudiesen tener linfadenitis caseosa de tipo visceral, por lo que no descarta a la prueba de ELISA, como alternativa de diagnóstico.

¹ Este trabajo de tesis fue financiado por el proyecto: “Estandarización y elaboración de un paquete tecnológico sobre técnicas de diagnóstico de las principales enfermedades de los pequeños rumiantes”. No. De SIGI: 1434034757

Introducción

El ganado ovino en México

En México, como en otras partes del mundo el sector productivo primario es primordial para garantizar la seguridad alimentaria de la población, para conseguir ese objetivo son necesarias las actividades agropecuarias y de entre ellas la ganadería resulta pieza fundamental ya que provee una gran variedad de productos que necesarios para la buena alimentación de la población. En México los ganados ovino y caprino van abriéndose paso entre los ganados tradicionales (bovino, porcino y avícola), en el caso de la carne la producción de ovino ha ido incrementando en los últimos años pasando de 55 mil toneladas en 2010 a 64 mil en el año 2019, los caprinos no tienen la misma tendencia puesto que aquí la producción ha sufrido una disminución durante el mismo periodo, pasando de 44 mil toneladas en 2010 a 40 mil toneladas en 2019, en cuanto a la leche de cabra la producción se ha mantenido estable en los últimos años siendo esta de 160 millones en promedio entre los años 2010 y 2019. (32)

Actualmente, el ganado ovino tiene un 0.3% de participación nacional en la producción pecuaria, principalmente por la producción de carne; los caprinos, por otro lado, participan un 0.9% mayormente por la producción de leche (0.7%). La producción de carne de ovino fue alrededor de 64 mil toneladas en 2019 lo que equivale a 4 804 millones de pesos. A diferencia de la carne ovina, la producción de carne caprina no ha tenido un crecimiento sostenido, en diez años en promedio de esta producción ha sido de 41 toneladas por año, en 2019 la producción fue de 40 toneladas lo que representó un valor de 2 696 millones de pesos. La producción de leche ha tenido un valor en 2019 de 903 millones de pesos. Si bien los ingresos generados por estos ganados no se comparan con los generados por la producción de otras especies, (el ganado vacuno genera 139 millones de pesos al año, las aves 114 millones y el ganado porcino 73 millones al año) su aportación es importante debido al tipo de población que se dedica a esta actividad, que son principalmente unidades productivas familiares que provee no la totalidad de los ingresos de las familias, pero sí una parte importante de ellos. (32)

Uno de los rubros más importantes para lograr tener una óptima producción es el control sanitario, evitar las enfermedades emergentes y controlar las existentes ha sido desde siempre

una preocupación de los ganaderos. Las enfermedades infecciosas han acompañado a la humanidad desde el inicio de los tiempos, sin embargo, en los últimos siglos se han ido generando métodos de diagnóstico y tratamiento para las enfermedades que más estragos generaban sin embargo todavía se sigue padeciendo de sus efectos.

La enfermedad

Tal es el caso de la linfadenitis caseosa (LC), una enfermedad conocida desde hace varios siglos que es conocida también como pseudotuberculosis, apostema de los ovinos, enfermedad de Preisz-Nocard. (2,3) Esta es una enfermedad de cursos crónico (de meses a años) caracterizada por la aparición de granulomas (abscesos) en linfonodos. Afecta a ovinos y caprinos domésticos, ferales y según algunos autores, silvestres. (1) Es causada por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*). Se reconocen dos presentaciones, la superficial, que afecta los linfonodos retrofaríngeos, parotídeos, poplíteos, submandibulares, preescapulares, precurales y mamarios, y la presentación visceral. No se caracteriza por causar gran mortandad, ya que tiene poco efecto en la salud general de los animales, a menos que se generalice la enfermedad, su mayor efecto en la producción es por las pérdidas económicas que genera debido a los decomisos de canales cárnicas, disminución en la producción de leche, carne y lana, también se menciona que está relacionado con el síndrome de debilitamiento progresivo. (5, 7, 9, 28, 36, 37)

La LC está presente en todos los continentes habitados, principalmente en países que tienen una gran producción de pequeños rumiantes, como Australia, Nueva Zelanda, Reino Unido, Los Países Bajos, Estados Unidos, Argelia, Irán, Argentina, España, Francia, Noruega, etc. Se ha sugerido que esta enfermedad surgió en Europa y fue distribuida por el mundo desde la época colonial, por las principales potencias navales de la época, españoles, británicos y holandeses, que llevaron su ganado caprino y ovino a los territorios que invadieron. (13, 28)

La prevalencia actual de esta enfermedad es baja, sin embargo, todavía a mediados del siglo XX se decía que en países como Australia tenía en sus diferentes regiones prevalencias de entre 50 y 90%, en 1983 se empezó a vacunar en ese país y actualmente reportan que tienen entre 20 y 30%. En otros países donde la producción ovina no tiene un peso tan grande como en Australia, las prevalencias son bajas. En la zona norte de México, en las regiones áridas de Durango y Coahuila donde se produce leche de cabra principalmente (además de carne de

ovino y caprino), se han reportado prevalencias de entre 2 y 5%, muy diferente a lo visto en Australia. No está bien definido el porqué de esta gran diferencia, podemos pensar que las diferencias entre formas de diagnóstico, la tecnificación de los sistemas de producción, los climas tal vez puedan influir. (8, 26, 27, 33)

El agente

La bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa Gram positiva. La enfermedad que provoca fue descrita por primera vez en 1888 por un veterinario francés a partir de un caso de linfangitis ulcerativa. Fue descrita como el “bacilo Preiz-Nocard”, fue hasta 1923 que se clasificó dentro de la familia *Corynebacterium* con la especie *ovis*, fue hasta mediados del siglo XX que quedó clasificada de manera definitiva como *C. pseudotuberculosis*. (5, 13, 28)

Se sabe que *C. pseudotuberculosis* genera dos enfermedades, la linfangitis ulcerosa que se presenta en bovinos y equinos, y la linfadenitis caseosa que se presenta en ovinos, caprinos y en algunas regiones se ha observado que también la presentan los camélidos. En México encontramos dos biovariedades, *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* y *C. pseudotuberculosis* biovar *equi*, clasificadas así en 1988 con base en los huéspedes que prefieren, y por la capacidad de reducir nitrato, la biovariedad *C. pseudotuberculosis ovis* siendo incapaz de reducirlo y afectando principalmente a pequeños rumiantes. La capacidad de reducir el nitrato se da por la expresión del gen *narG* presente en la biovariedad variedad *C. pseudotuberculosis equi*. (7, 25)

C. pseudotuberculosis es parte de la familia *Actinomycetaceae* y parte del grupo CNMR, que contiene bacterias relacionadas filogenéticamente entre sí de los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus*. *C. pseudotuberculosis* es una bacteria Gram positiva (aunque se indica que esta tinción llega a ser irregular), es pleomórfica, mayormente se encuentran en forma de bastones (0.5-0.6 a 1.0-3.0 μm), es un patógeno intracelular facultativo, no esporulada, sin cápsula, fimbriada, no es ácido alcohol resistente, posee una pared celular quimiotipo IV (con ácido meso-diaminopimélico), compuesta principalmente por peptidoglicanos, arabinogalantán y ácidos micólicos (estos son similares a los de *Mycobacterium*), ácidos grasos celulares de cadena corta saturados e insaturados; suele agruparse en forma de letras chinas. Junto con *C. diphtheriae* y *C. ulcerans*, *C.*

pseudotuberculosis, puede albergar un bacteriófago que induce la generación de exotoxina diftérica. *C. pseudotuberculosis* puede crecer en condiciones aerobias y anaerobias cuando está a 37 °C. En medios sólidos forma colonias blanquecinas, secas y de consistencia friable. En las primeras 24 h de incubación se pueden observar pequeñas colonias amarillentas bajas que se hacen más grandes y con las características antes mencionadas a las 48h. Entre las 48 y 72 h puede observarse una tenue β -hemólisis, cuando se cultiva en agar sangre de carnero. En medio líquido forma grumos debido a los ácidos micólicos, estos se encuentran en el exterior de la pared. Los ácidos de *Corynebacterium* son los más cortos del grupo CNMR, con una longitud de 20 y 36 átomos de C₁₄, en comparación con los de *Mycobacterium spp* con que son de 60 y 90 átomos de C₁₄. El hipoclorito de calcio y la formalina pueden inactivar esta bacteria, sin embargo, son poco eficaces cuando hay gran cantidad de materia orgánica. (5, 13, 37)

Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* son varios, entre los cuales están los glucolípidos y ácidos micólicos en la pared, las exotoxinas fosfolipasa D (PLD) y la esfingomielinasa, (las principales y más estudiadas son los ácidos corinomicólicos y la PLD), la PLD es una glicoproteína con una composición similar al colágeno, esta enzima es capaz de hidrolizar una o más enlaces éster en glicerofosfolípidos, el daño que produce en la membrana de las células del huésped se traduce en la necrosis del tejido. En las células eucariotas las fosfolipasas colaboran con la transmisión de señales y mantenimiento de la membrana. (5)

La PLD interfiere con la quimiotaxis de neutrófilos, también hidroliza la esfingomielina, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana endotelial, también causa necrosis dérmica e inflamación. (13, 36)

Las membranas celulares de los mamíferos son mayormente lipoproteicas, lo que las hace susceptibles a invasiones microbianas que han adaptado sus mecanismos de invasión a este tipo de células, tal es el caso de *C. pseudotuberculosis*, en la bacteria la PLD ayuda a la protección de integridad de la membrana. La PLD fue descubierta en 1940 y desde ese entonces se ha encontrado en los aislamientos de las dos biovariedades conocidas. Cuando

se elimina el gen *pld* se ha observado que la bacteria se vuelve incapaz de formar los abscesos. (13)

El gen *pld* codifica una proteína de 31.4 kDa consistente con el tamaño de PLD, se transcribe a partir de ARNm de aproximadamente 1.1 kilobases de longitud que aparece en una sola copia en el genoma de *C. pseudotuberculosis*. (1)

Los ácidos corinomicólicos representan del 5-8% del peso de la célula bacteriana, estos dan las características de cultivo (colonias caseosas, película en la superficie del caldo de cultivo) también ayuda a resistir la acción de las células de defensa (neutrófilos, macrófagos) esto le confiere la capacidad de ser un parásito intracelular. Se ha relacionado que entre mayor contenido de ácidos corinomicólicos es mayor la virulencia de la bacteria, también se sugiere que estos permiten que *C. pseudotuberculosis* sobreviva por periodos prolongados en el ambiente. (13, 28)

C. pseudotuberculosis puede sobrevivir en el ambiente por largo tiempo ayudado por las bajas temperaturas, la humedad, y fómites. Se han encontrado bacterias viables hasta seis meses en ambiente de granja y en el suelo se han encontrado hasta ocho meses después. La enfermedad inicia cuando la bacteria entra en el organismo por medio de lesiones en la piel o por mucosas, algunos mencionan que incluso puede entrar a través de la piel intacta, también se indica que algunos artrópodos pueden participar de manera mecánica en la transmisión de esta enfermedad. (4, 7, 13, 28, 35)

Cuando la vía de entrada es la piel lesionada lo más común es que afecte linfonodos superficiales, el más cercano al lugar de la inoculación. En países con alta producción de ovinos, como Australia y Nueva Zelanda, se menciona que los linfonodos más afectados son los preescapulares y los poplíteos, debido a la práctica de la esquila, en cabras se menciona que los linfonodos afectados más comunes son los submandibulares y los retrofaríngeos. Aunque en países con una producción más modesta estos patrones pueden variar. (4)

Cuando *C. pseudotuberculosis* entra en el organismo en los primeros momentos de la infección cutánea, muchos neutrófilos aparecen en la zona de inoculación, tiempo después (24 h) de este primer contacto, los neutrófilos ahora aparecen en el drenaje más cercano al sitio de inoculación y a partir del tercer día, la acción de los neutrófilos empieza a disminuir

y el número de macrófagos empieza a aumentar de manera drástica. Los macrófagos fagocitan las bacterias y así las transportan a los linfonodos cercanos, siendo este el principal sitio de colonización. (13)

Los ácidos micólicos y el PLD juegan aquí un papel muy importante, ya que hidrolizan la lisofosfatidilcolina y esfingomielina de las membranas endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos. La desestabilización de la membrana celular provoca lisis celular aumentando la permeabilidad vascular, generando edemas y facilitando la diseminación de la bacteria, la PLD inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos, la degranulación de células fagocíticas y activa el sistema del complemento por la vía alterna. (2)

Las bacterias que son fagocitadas resisten a los fagolisosomas, gracias a la capa lipídica de la célula bacteriana. Esta capa de ácidos micólicos es piogénica pero no es inmunogénica. (3)

Patogénesis

Los abscesos se forman cuando hay una gran acumulación de microorganismos, la fagocitosis por parte de las células de defensa, y la degeneración celular de las mismas que genera la liberación de enzimas lisosomales. Esto genera la separación huésped-infección, mediante capas de células mononucleares y tejidos fibrosos, esto hace que la lesión tenga una forma acedollada característica. Cuando los macrófagos capturan las bacterias y las llevan al linfonodo, empiezan a formar microabscesos en la región cortical del linfonodo que drena el sitio donde fue la inoculación. A los pocos días (1 semana aproximadamente) estos primeros abscesos se van fusionando y debido a esta expansión y al aumento de tamaño se forman abscesos más grandes. Estos primeros piogranulomas contienen bacterias, detritus celulares, una gran cantidad de eosinófilos que le dan el característico color verdoso. Los monocitos y macrófagos son las células dominantes en la lesión. Luego la lesión se encapsula lo que disminuye la inflamación. Si el absceso se revienta, el proceso vuelve a iniciar. El ciclo de fagocitosis, multiplicación en los macrófagos, degeneración celular y la formación de la capa es la base para entender lo crónico de esta enfermedad. (4, 13, 28)

El contenido purulento va cambiando de aspecto de acuerdo con el tiempo que lleve la enfermedad. En la presentación crónica de la enfermedad, el contenido purulento se solidifica, se hace más blanquecino y el centro se calcifica, estos tienen menor cantidad de bacterias, pero como se ha mencionado, estas pueden estar viables por mucho tiempo, los

abscesos que se forman pueden alcanzar tamaños de hasta 15 cm, pero lo más común es que sean de 3-5 cm de circunferencia.

A partir de la cuarta semana postinfección se empiezan a detectar anticuerpos, el pico máximo de estos lo encontramos en la decimoséptima semana, perdurando por lo menos veinte semanas. (4, 5, 13)

El periodo de incubación de la inoculación, hasta la formación de los abscesos es de 2-6 meses. El sistema inmune del huésped puede contener y eliminar infecciones tempranas, sin embargo, en infecciones crónicas, la bacteria puede persistir en el huésped a pesar de la respuesta humoral y mediada por células. Los huéspedes expuestos a una primoinfección tienen protección a una segunda exposición por varios meses, pero siguen siendo portadores en los sitios de infección primarios por lo que el animal se considera infectado por el resto de su vida. (35)

Se pueden encontrar bacterias viables en los abscesos varios años después de la infección, incluso se ha visto que pueden reactivar la infección.

Existen varias rutas de inoculación experimental de la enfermedad (donde hay mucosas), pero en la infección natural la principal ruta de infección es la cutánea. En la forma visceral los órganos más afectados por la infección natural son los pulmones. (13)

Cuando se inocula la bacteria en sangre, se ha visto que los órganos más afectados son los pulmones y los riñones, debido que se acumulan los émbolos bacterianos en los pequeños sistemas vasculares de estos órganos. En los pulmones generan también bronconeumonías, pleuritis que genera adherencias fibrinosas en la pared torácica o diafragma. Los linfonodos más afectados en las infecciones viscerales son los mediastínicos y bronquiales. (4,13, 28, 35)

Diagnóstico de la enfermedad

El aislamiento bacteriano es el diagnóstico definitivo para LC, éste se puede hacer a partir de material purulento recuperado de los abscesos debridados, se puede tomar con punción o por medio de un hisopo. Es muy importante mantener medidas estrictas de higiene al momento de tomar las muestras, pues se corre el riesgo de contaminar el ambiente y así diseminar más la bacteria, además de contaminar la muestra con organismos saprofitos que nos dan

resultados equivocados principalmente (falsos negativos) ya que *C. pseudotuberculosis* es más sensible que las bacterias que normalmente encontramos en la piel, por esto, es recomendable desinfectar y realizar la tricotomía de la zona de donde se obtendrá el material purulento.

El medio que se utiliza para sembrar esta bacteria es el agar sangre, suplementado con 5% de sangre de carnero sin fibrina, en el cual se hace un sembrado inicial y se deja crecer de 24-48h a 37 °C. Las colonias observadas son blanquecinas, secas, y con una ligera beta hemólisis alrededor. Las colonias tomadas de estos cultivos son teñidas con tinciones de Gram y algunos autores recomiendan Ziehl-Neelsen. Se pueden realizar pruebas bioquímicas o utilizar kits comerciales para identificación bacteriana

Este diagnóstico es económico, pero requiere de habilidad para recolectar las muestras y así evitar contaminación que afecte nuestro resultado. Es un método algo tardado y que requiere de un laboratorio de bacteriología; además de ser el método más difundido y actualmente el definitivo; sin embargo, al requerir de material purulento, no es útil para detectar las formas viscerales ni para enfermedades en etapas tempranas, animales recuperados o con la infección subclínica. (5, 13, 16, 17, 20, 23, 28)

Se han desarrollado varias pruebas serológicas para el diagnóstico de LC como las pruebas de aglutinación en tubo, fijación del complemento, hemoaglutinación indirecta, precipitación por difusión en gel, inhibición de antihemolisina, inhibición de la hemolisina. Estas pruebas han tenido resultados controversiales entre médicos e investigadores, ya que por sí mismas no son confiables puesto que arrojan falsos positivos y negativos, dependen de la evolución de la enfermedad. En países donde se vacuna contra LC estas pruebas no distinguen entre anticuerpos vacunales y de campo. La inmunidad materna también arroja resultados falsos positivos. Para que estas pruebas funcionen de mejor manera se deben elaborar planes donde se corran más de una prueba, y detectar un cambio en el título de anticuerpos. (17)

La prueba de análisis de inmunoensayo de adsorción ligado a enzimas (ELISA) ha demostrado tener los mejores resultados para el diagnóstico de LC. Para realizar estas pruebas se pueden utilizar células bacterianas, toxinas y proteínas secretadas por *C. pseudotuberculosis*. Se ha observado que la prueba de ELISA-I basada en PLD ha

demostrado sensibilidad y especificidad de 93.5% 100% respectivamente. La ELISA para detectar INF γ en cambio tiene sensibilidad y especificidad de 91% y 98%. (3)

Las pruebas serológicas que tienen como antígeno la PLD, se basan en la detección de la respuesta humoral puesto que va dirigido a la IgG del hospedador, mientras que tienen INF γ , se basan en la detección de la respuesta celular.

Para la prueba se han utilizado varias preparaciones de antígenos, como los de la pared, la PLD cruda, sobrenadante celular y exotoxina recombinante.

En general, la prueba funciona de buena manera, aunque algunos autores indican que en cabras es más efectiva. Las variaciones de especificidad son debido a las reacciones cruzadas con especies bacterianas relacionadas. Es recomendable no depender de un solo antígeno para el diagnóstico, ya que uno solo no es suficiente para detectar todos los casos de LC. (13, 23)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular cuyo fundamento es detectar y amplificar fragmentos específicos de ADN. Las pruebas de PCR detectan de manera directa el material genético de *C. pseudotuberculosis*. Las muestras requeridas pueden ser el material purulento de los abscesos, o las colonias aisladas de cultivos bacterianos. En algunos trabajos se menciona que se puede realizar la prueba a muestras de sangre, sin embargo, los resultados no han sido del todo positivos, ya que se ha visto un gran número de falsos negativos. La PCR, es la prueba más rápida y específica de la que se dispone en la actualidad. Se han desarrollado pruebas simples que detectan el gen *rpoB* y pruebas múltiples que amplifican los genes *16S rDNA*, *rpoB* y *pld*. La PCR simple tiene la desventaja de no poder diferenciar entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, la PCR múltiple si puede hacerlo ya que toma encuentra varios genes a la vez.

Justificación

El diagnóstico preciso de la linfadenitis caseosa causada por *C. pseudotuberculosis* es fundamental para establecer un control sanitario de la enfermedad. Las pruebas utilizadas actualmente tienen ventajas y limitaciones que se deben tener en cuenta al momento de elegir. Para este trabajo se realizaron tres pruebas diagnósticas porque son las que más comúnmente se utilizan, en primer lugar, el aislamiento bacteriano, ya que esta es la prueba de referencia

que nos permite identificar directamente a *C. pseudotuberculosis*, organismo responsable de esta enfermedad. También se llevó a cabo la prueba de ELISA, una prueba serológica que detecta la presencia de anticuerpos específicos contra el agente causal presentes en el suero de los animales infectados. Es una prueba sencilla y que permite procesar varias muestras diferentes a la vez, sin embargo, suele presentar varios falsos positivos o falsos negativos, además de depender mucho del tipo de antígeno que se esté utilizando. La prueba PCR tiene buena sensibilidad y especificidad (más del 90% según varios autores) además de ser rápida, aunque el costo es más elevado y no puede ser utilizada como prueba tamiz.

Las pruebas de concordancia brindan fiabilidad y validez a los métodos de diagnóstico, una prueba con una concordancia alta indica que los resultados obtenidos entre dos pruebas son similares, si una de esas pruebas es confiable, la otra también será confiable, por otra parte, si la concordancia es baja los resultados son diferentes o contradictorios lo que genera incertidumbre en el diagnóstico.

Hipótesis

Si en la prueba de ELISA se utiliza como base antigénica componentes estructurales obtenidos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, entonces, esta prueba tendrá una concordancia alta con respecto al aislamiento bacteriano, por lo que representaría una alternativa para el diagnóstico de laboratorio de la linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos. La prueba de PCR también tendrá un buen grado de acuerdo con la prueba de aislamiento bacteriano, por lo que representa una opción para el diagnóstico de la enfermedad.

Objetivos

General

Determinar el nivel de concordancia entre la prueba de ELISA y la PCR respecto al aislamiento bacteriano, considerada prueba de oro para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa en rebaños de ovinos y caprinos en la zona centro de México.

Específicos

- Colectar muestras de suero sanguíneo y exudado purulento de animales con diagnóstico clínico de linfadenitis caseosa en unidades de producción ovina en la zona

central de México. Así mismo, se tomarán muestras de sangre de animales clínicamente sanos, para realizar los estudios comparativos.

- Realizar pruebas de ELISA a las muestras de suero sanguíneo.
- Realizar el análisis bacteriológico encaminado al aislamiento de *C. pseudotuberculosis* a partir de muestras de exudado purulento.
- Identificar los aislados a través de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa.
- Calcular el índice de concordancia *kappa* entre las pruebas de ELISA y el aislamiento bacteriano.

Materiales y Métodos

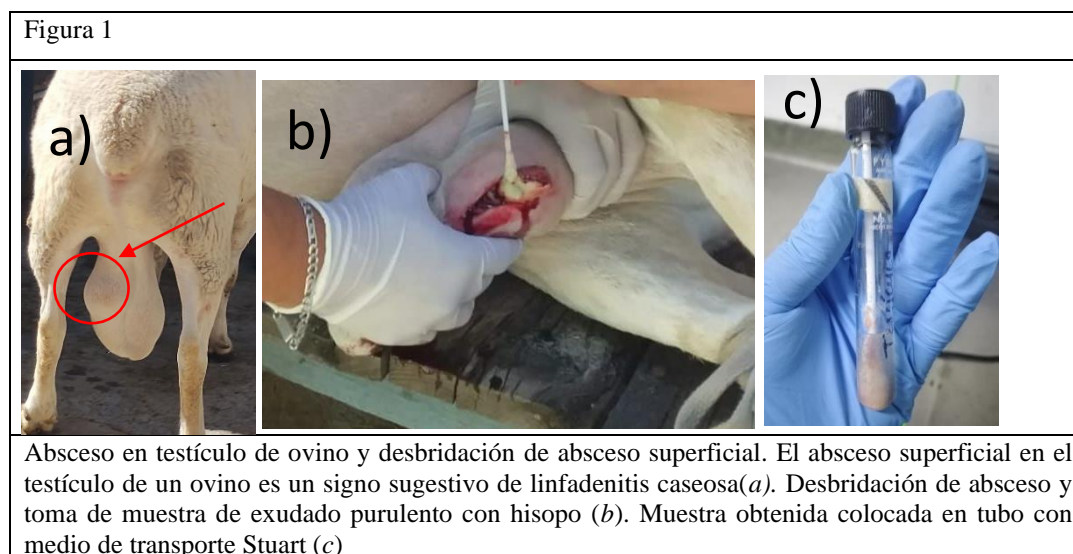
Este trabajo se inició en diciembre de 2019 con la búsqueda de unidades de producción de ovinos y caprinos con casos sugestivos a la linfadenitis caseosa causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. En enero de 2020 se empezaron a recolectar muestras de sangre y contenido purulento obtenido de animales con lesiones que eran compatibles con las generadas por esta bacteria. Los animales se ubicaron en unidades de producción de varios estados del centro de México (Estado de México, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala).

La estrategia de muestreo estuvo basada en la detección clínica de la enfermedad (presencia de abscesos superficiales). En los animales con lesiones se tomaron muestras del exudado contenido en los abscesos y de sangre. De esta misma unidad de producción, se tomaron muestras de animales sin abscesos (clínicamente sanos) en un número similar de los detectados con abscesos.

El diseño de muestreo se describe a continuación en el cuadro 1:

Cuadro 1: Diseño para la toma de muestras en el diagnóstico de linfadenitis caseosa.		
Cuadro clínico de animales	Muestras tomadas	Pruebas realizadas
Positivo (+) Abscesos superficiales	-Exudado purulento	-Aislamiento bacteriano -Confirmación con PCR
	-Suero Sanguíneo	-ELISA
Negativo (-) Sin abscesos superficiales	-Suero Sanguíneo	-ELISA

Las muestras de sangre se recolectaron de la vena yugular de los animales en tubos sellados al vacío sin aditivo (tapa roja), para obtener el suero sanguíneo necesario para realizar las pruebas de ELISA indirecta. Las muestras de exudado purulento se obtuvieron al desbridar los abscesos. Previa desinfección de la piel con yodo al 2%, se procedió a hacer una incisión de entre 2 y 3 cm de donde salió el material purulento, se tomó una muestra con un hisopo evitando tocar los bordes de la incisión para no contaminar la muestra y se colocaron en tubos con medio de transporte Stuart (Fig.1)



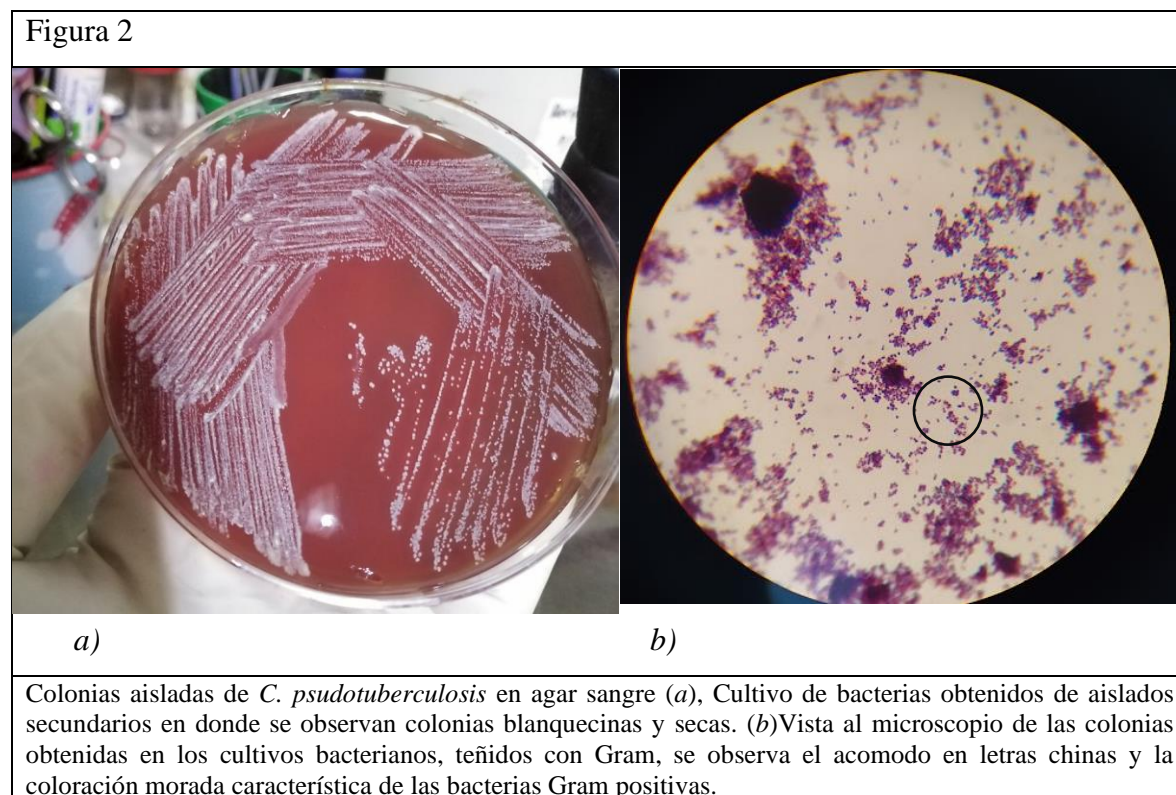
Las muestras fueron transportadas en refrigeración al Laboratorio de Diagnóstico del CENID Salud Animal e Inocuidad del INIFAP. Los sueros fueron separados por centrifugación y almacenados en congelación a -20°C hasta su uso. Los hisopos para análisis bacteriológico fueron procesados al momento de su llegada al laboratorio, aproximadamente entre 10 y 24 horas después de haber sido obtenidos.

En total se colectaron muestras de 29 animales aparentemente sanos de donde se obtuvieron 29 sueros, mientras que de los animales con signos clínicos se obtuvieron igual número de

muestras, de los cuales se obtuvieron 29 muestras de exudado purulento y 29 muestras de suero.

Aislamiento Bacteriano

Para el aislamiento bacteriano, las muestras de exudado se sembraron en agar sangre con técnica americana y se incubaron en una estufa bacteriológica a 37°C de 24 a 48h. Pasado este tiempo se recolectaron las colonias que cumplieran con las características morfológicas que se mencionan para *C. pseudotuberculosis*, que son colonias blanquecinas, secas y de consistencia friable. (Fig.2) (4)



Dichas colonias fueron resembradas en un nuevo agar sangre bajo las mismas condiciones de incubación con el fin de purificar los aislados, a los que posteriormente se les fijó en un

portaobjetos, se les realizó la tinción de Gram (Anexo 1) y finalmente fueron observados al microscopio para una primera identificación.

Debido a que no se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana y aunado a que varias de las muestras de exudado, no se les pudo realizar la prueba de PCR directamente, la prueba de PCR fue utilizada como confirmación de los aislamientos bacterianos y corroborar que correspondían a *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

Como ya se mencionó, la prueba de PCR solo se realizó para la identificación de las bacterias obtenidas en el aislamiento bacteriano.

Se realizó PCR multiplex que amplifica fragmentos de tres genes que permiten la identificación de *C. pseudotuberculosis*, lo cual se describe en el cuadro 2, de acuerdo a la prueba diseñada por Pacheco y colaboradores en el año 2006. (6)

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en el PCR múltiplex para la detección de ADN de <i>C. pseudotuberculosis</i> .			
Secuencia	Gen de detección	Fragmento de amplificación (pb)	Interpretación
Fw 5'-ACCGCACTTTAGTGTGTGTG-3' Rv 5'-TCTCTACGCCGATCTTGTAT-3'	Gen 16S r RNA	816	Identifica el género <i>Corynebacterium spp</i>
Fw 5'-ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA-3' Rv1 5'-ATCAGCGGTGATTGTCTTCC-3' Rv25'-ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG-3'	<i>pld</i>	203	Identifica la especie <i>pseudotuberculosis</i>
Fw 5'-CGTATGAACATCGGCCAGGT-3' Rv 5'-TCCATTTGCCGAAGCGCTG-3'	<i>rpoB</i>	446	Identifica el género <i>Corynebacterium spp</i>
Se amplificaron tres fragmentos de genes presentes en el genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> , de acuerdo con la prueba diseñada por Pacheco y colaboradores. El gen <i>16S</i> se utiliza para la identificación del género <i>Corynebacterium</i> , lo mismo que el gen <i>rpoB</i> ; Mientras que el gen <i>pld</i> identifica la especie <i>pseudotuberculosis</i> .			

Los aislamientos sugestivos de ser *C. pseudotuberculosis* fueron sub-cultivados durante 48h a 37°. Las colonias obtenidas fueron cosechadas y utilizadas para la extracción de ADN.

La extracción del material genético se realizó con el kit comercial “ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep TM “(Zymo research, EUA) de fabricación estadounidense, siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante. (Anexo 1)

Los iniciadores utilizados fueron proporcionados por el Laboratorio de Diagnóstico del CENID SAI, INIFAP, puesto que son los que utilizan de manera regular y que han sido probados en trabajos previos. Estos fueron utilizados de acuerdo a lo que propone Pacheco y colaboradores. (24)

En el cuadro 3 se muestra la mezcla de reacción utilizada para la detección de ADN de *C. pseudotuberculosis*. Esta mezcla es la utilizada en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Salud Animal e Inocuidad del INIFAP

Cuadro 3: Mezcla utilizada para la realización de la prueba de PCR (μL)	
Master mix	6.25
16S F	0.25
16S R	0.25
C700F	0.10
C3130R	0.10
PLD F	0.10
PLD R	0.10
ADN	1.00
H ₂ O	16.85
Total	25.00
Se agregaron 2 mM de cada uno de los iniciadores, y aproximadamente 10 ng de ADN extraído de <i>C. pseudotuberculosis</i>	

Las condiciones del termociclador con las que se hizo la amplificación del ADN fueron las siguientes.

Cuadro 4: Condiciones utilizadas en el termociclador para realizar la prueba de PCR		
Proceso	Condiciones	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 C° / 3 minutos	1
Desnaturalización	95 C° / 1 minutos	40
Alineamiento	56 C° / 40 segundos	40
Extensión	68 C° / 90 segundos	40
Extensión final	68 C° / 7 minutos	1

Los fragmentos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 2% resaltados con un colorante fluorescente de ácidos nucleicos (Gel Star™. Lonza Rockland, Inc.) y con ayuda de luz ultravioleta

Ensayo De Inmunoabsorción Ligado A Enzimas ELISA

Se utilizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar anticuerpos contra antígenos de *C. psudotuberculosis*, en animales con signos de la enfermedad y de forma comparativa en animales sin manifestaciones clínicas.

Las muestras recolectadas se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos, el suero obtenido se congeló a -20°C hasta el momento de su uso.

Para realizar la prueba se sensibilizó una placa de poliestireno con fondo plano (96F without LID SH microwell plate Nunc BATCH 049004) con una mezcla de extractos de antígeno crudos obtenidos por sonicación de acuerdo a lo descrito por Pérez en 2017 (5) de una cepa de campo denominada “Robus” caracterizada en el laboratorio del CENID-Microbiología Animal y que se obtuvo a partir de un carnero proveniente de Tlaxcala, en el centro de México, y de la cepa comercial de referencia 18410 de American Type Culture Collection (ATCC), de Atlanta, Estados Unidos, que proporcionó el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán. Se hizo una dilución de los antígenos 1:80, utilizando buffer de carbonatos. (5.3% Na₂CO₃, pH 9.6). y la concentración de proteína fue de 1.2 µg/µL. Posteriormente la placa fue bloqueada para evitar reacciones inespecíficas con leche semidescremada al 3%.

En la placa sensibilizada y bloqueada se colocaron los sueros problema, diluyéndolos 1:20 en buffer de carbonatos. Así mismo, se utilizaron sueros control positivo y control negativo.

Como antiglobulina se utilizó la Anti-IgG-ovina conjugada con peroxidasa (Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit AntiSheep IgG (H+L) code: 313-035-003) y se incubaron a 37°C por una hora.

Finalmente, se colocó ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)), como revelador y se dejó incubar a temperatura ambiente y en obscuridad por 5 minutos para posteriormente leer la placa a 405 nm en el espectrofotómetro utilizando el programa Gene - 5.

Modelo estadístico

Para el diagnóstico de linfadenitis caseosa se considera al aislamiento bacteriano como la prueba de oro por lo cual la ELISA-I se comparó con esta prueba.

La fórmula utilizada para calcular el índice k es la siguiente:

$$k = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde Po es la proporción observada y se calcula con la fórmula:

$$Po = \frac{(a + d)}{n}$$

Y la Pe, que es la proporción esperada, a su vez se calcula con la fórmula:

$$Pe = \frac{(ct + su)}{n^2}$$

Para realizar los cálculos, se acomodaron los datos en cuadros como el presentado en el cuadro 5, para comparar los datos obtenidos en la prueba de ELISA.

Cuadro 5: Ejemplo de cuadro donde se ordenan los datos para llevar a cabo los cálculos para obtener la índice kappa.				
Prueba A	Prueba B			
		(+)	(-)	
	(+)	a	b	r=a+b
	(-)	c	d	s=c+d
		t=a+c	u=b+d	n=a+b+c+d

Los valores de k obtenidos se compararon con una tabla de valores establecida por Landis y Koch en 1977(2), dicha tabla se presenta en el Cuadro 6,

Cuadro 6: Rangos del índice k , para determinar la concordancia. (6)	
Índice k	Grado de acuerdo
<0.00	Sin acuerdo
0.00-0.20	Insignificante
0.21-0.40	Mediano
0.41-0.60	Moderado
0.61-0.80	Sustancial
0.81-1.00	Casi perfecto

Con los datos disponibles también se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR y ELISA-I. Para dichos cálculos se acomodaron los datos en una tabla de 2x2, como la del Cuadro 7.

Cuadro 7: Tabla de 2x2 para acomodar los datos para el cálculo de la especificidad y la sensibilidad de acuerdo con la tabla de Vizcaino (34)				
Enfermedad				
Prueba		+	-	
	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
		a+c	b+d	
a= Verdaderos positivos; b=discordancias, c=discordancias, d=verdaderos negativos				

La sensibilidad se obtuvo con las siguientes fórmulas:

$$\text{sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$$

Para la especificidad se utilizó la fórmula:

$$\text{especificidad} = \frac{d}{b + d}$$

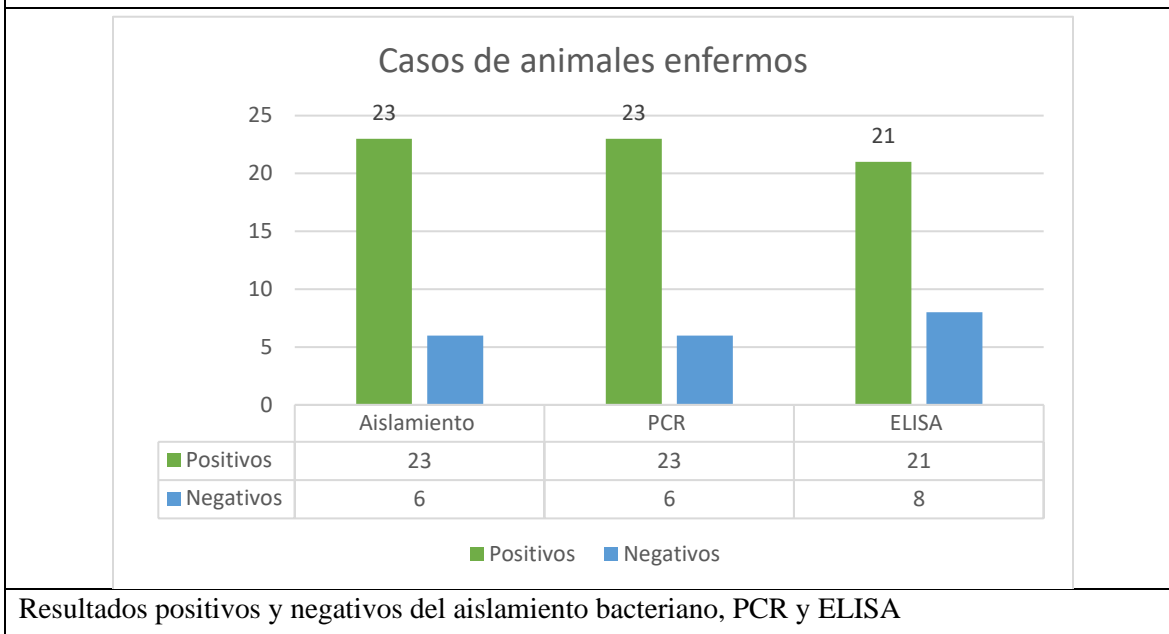
Resultados

De los animales con signos clínicos se obtuvieron 29 muestras de tejido purulento a las que se le hizo el aislamiento bacteriano, la confirmación con PCR. Y la prueba de ELISA. En el cuadro 8 se muestran los resultados

Cuadro 8: Casos de animales enfermos				
	ID	Aislamiento	PCR	ELISA
1	A13113	P	P	N
2	927	P	P	N
3	515	P	P	N
4	2396	P	P	P
5	50	P	P	P
6	52	P	P	N
7	2139	P	P	P
8	K316	P	P	P
9	220031011	N	N	P
10	3481	P	P	P
11	4983	P	P	P
12	4484	P	P	P
13	2584	P	P	P
14	496	P	P	P
15	8644	P	P	P
16	3247	N	N	P
17	3253	P	P	P
18	3378	N	N	P
19	3349	P	P	P
20	3243	N	N	N
21	2898	P	P	P
22	18	P	P	P
23	19	P	P	P
24	14	P	P	P
25	12	P	P	P
26	2	N	N	P
27	9	N	N	N
28	22	P	P	N
29	SINID	N	N	N

(P): Resultado positivo, (N): resultado negativo, (NP): muestra no procesada

Figura 3



De las 29 pruebas de aislamiento bacteriano, 24 tuvieron crecimiento de colonias con características sugerentes de *C. pseudotuberculosis* (blanquecinas, secas, con ligera beta hemólisis), las otras 5 colonias no tuvieron dichas características. Las colonias se cosecharon, se les realizó un frotis y se tiñeron con tinción de Gram. Las 29 muestras fueron Gram (+). Se hizo la identificación bacteriana con la prueba de PCR, donde se comprobó que 24 colonias eran de *C. pseudotuberculosis*, mientras que las restantes resultaron negativas, ya no se identificó el género al cual pertenecían dichas colonias. En el cuadro 9 se muestran estos resultados.

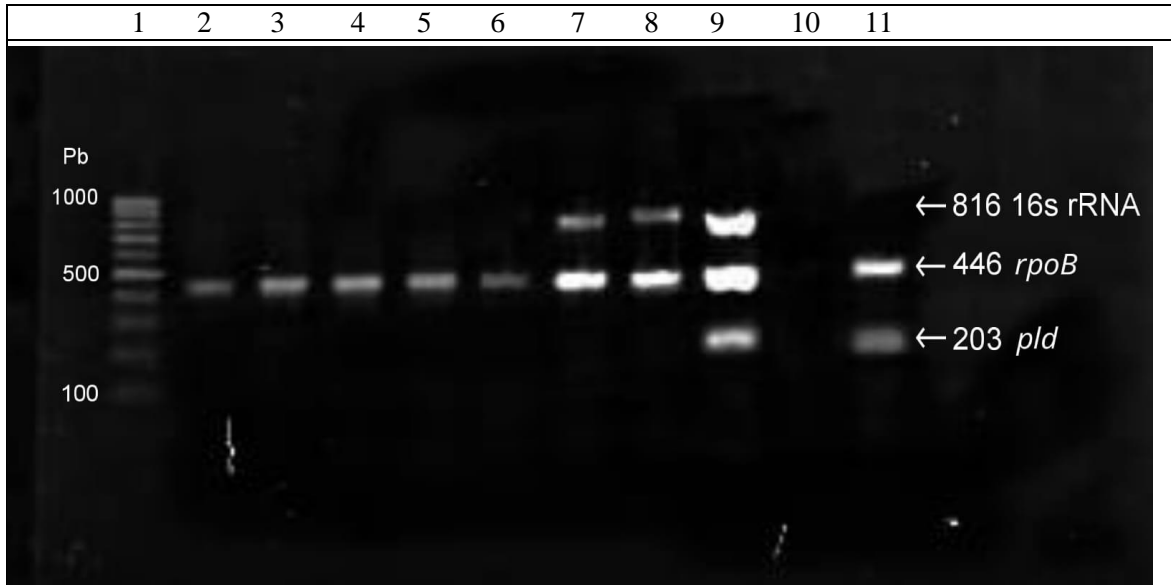
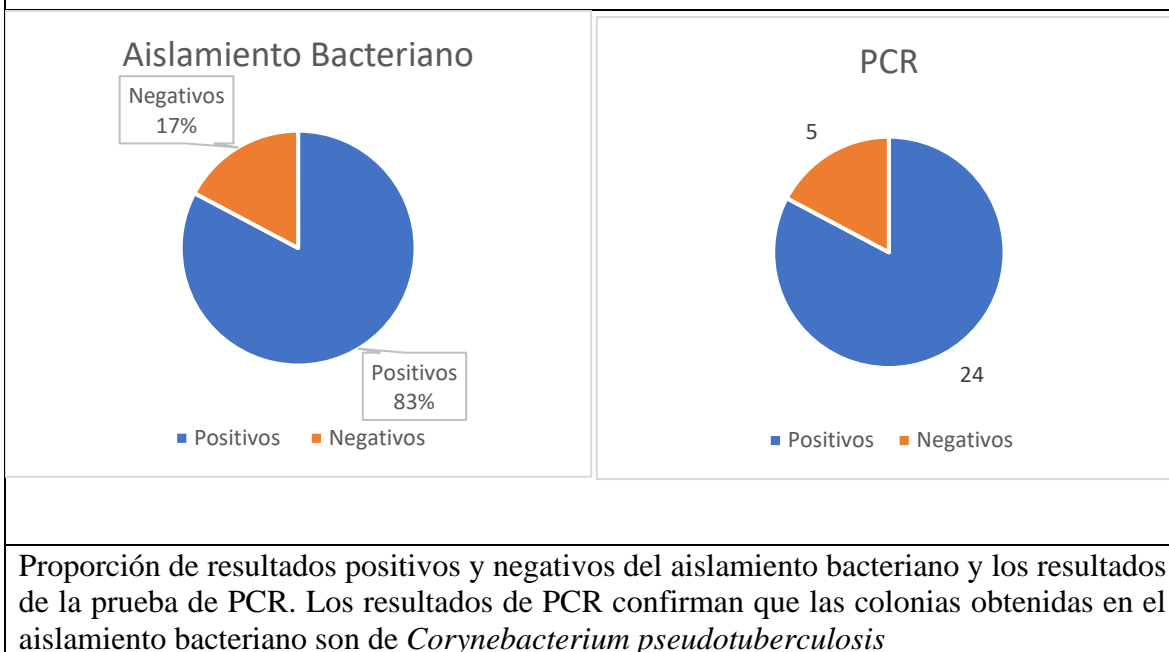


Figura 2. Interpretación de los resultados obtenidos en la PCR multiplex para la detección de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Carril 1: marcadores de tamaño molecular; carriles 2-6. *Corynebacterium* sp; carriles 7 y 8: *C. ulcerans*; Carriles 9 y 11: *C. pseudotuberculosis*; carril 10: Control negativo.

Cuadro 9. Resultados del análisis bacteriológico de muestras obtenidas a partir exudados de animales clínicamente enfermos de linfadenitis caseosa y su identificación por PCR		PCR <i>C. pseudotuberculosis</i>
Aislados sugestivos de <i>C. pseudotuberculosis</i>	24	24
Aislados de otras bacterias	5	5
Total	29	29

La prueba de ELISA se realizó a 29 muestras de animales con signos clínicos en donde se obtuvieron 21 resultados positivos y 8 negativos. Estos datos fueron comparados con los resultados obtenidos en el aislamiento bacteriano de donde se obtuvo el índice de concordancia kappa. (k)

Figura 2



Cuadro 10: comparación de resultados de la prueba de ELISA y el Aislamiento Bacteriano

Aislamiento Bacteriano	ELISA			
		(+)	(-)	
(+)		17	6	23
(-)		4	2	6
Total		21	8	29

El valor del índice K obtenido fue de 0.5910 que según la tabla de Landis & Koch de 1977 (2) hay un grado de acuerdo moderado como puede observarse en el cuadro 6.

Cuadro 11: Casos de animales sanos				
	ID	AISLAMIENTO	PCR	ELISA
1	A13112	NP	NP	N
2	A1311	NP	NP	P
3	A13114	NP	NP	P
4	J270	NP	NP	P
5	6224	NP	NP	P
6	T002	NP	NP	P
7	H757	NP	NP	N
8	H022	NP	NP	N
9	2664	NP	NP	P
10	3454	NP	NP	N
11	3473	NP	NP	P
12	2579	NP	NP	P
13	8330	NP	NP	P
14	3893	NP	NP	P
15	3484	NP	NP	N
16	3447AM	NP	NP	P
17	ILEGIBLEB	NP	NP	P
18	ILEGIBLE	NP	NP	N
19	3324	NP	NP	P
20	3234	NP	NP	P
21	3250AM	NP	NP	P
22	2704	NP	NP	N
23	3245	NP	NP	P
24	A14	NP	NP	P
25	A15	NP	NP	P
26	A17	NP	NP	P
27	A18	NP	NP	P
28	A19	NP	NP	P
29	A20	NP	NP	P
(P): Resultado positivo, (N): resultado negativo, (NP): muestra no procesada				

La comparación entre los resultados de la prueba ELISA y los del diagnóstico basado en cuadro clínico se hizo con los datos presentados en el cuadro 12.

Cuadro 12: comparación de resultados de la prueba de ELISA y el Cuadro Clínico				
Cuadro Clínico	ELISA			
		(+)	(-)	
	(+) Con abscesos	21	8	29
	(-) Sin abscesos	22	7	29
		43	15	58

El índice K obtenido en este caso fue de 0.1225, un valor que indica que hay un grado de acuerdo insignificante como se observa en el cuadro 6.

La sensibilidad de la prueba de ELISA versus aislamiento, fue de 80%, mientras que la especificidad fue de 75%. Cuadro 10.

La sensibilidad de la prueba de ELISA versus cuadro clínico fue de 48%, mientras que la especificidad de 46%. Cuadro 12.

Discusión

El diseño original del trabajo tuvo que ser modificado derivado de los efectos de la pandemia en México originada por el virus SARS-Cov2 en el año 2020. Por lo que solo se realizaron las pruebas de concordancia entre la prueba de ELISA y el Aislamiento Bacteriano (prueba de oro), mientras que, la prueba de PCR únicamente se utilizó para identificación bacteriana; dicha prueba, ha demostrado que ha tenido excelentes resultados al identificar *C. pseudotuberculosis*, a partir de muestras obtenidas en campo, como lo señalan Cetinkaya y colaboradores en 2002 (10), Fontaine en 2007 (13) y Kumar en 2013 (20). Este último, ha reportado un índice k de 0.8898, siendo este casi perfecto según el cuadro de Landis & Koch. (2). En este trabajo se demostró que la prueba de PCR es buena para identificar la bacteria ya que, de las 24 colonias sospechosas al aislamiento bacteriano, todas correspondían a *C. pseudotuberculosis*. Estos resultados nos dan indicios de que esta prueba puede ser una alternativa para el diagnóstico de la LC, tal como lo han señalado los autores antes citados; pero, se necesita realizar de forma directa dicha técnica a partir de muestras obtenidas en

campo, como lo demostró Quiroga en 2020 (30) quien obtuvo los siguientes resultados el índice k de 1 y la sensibilidad de 78%, sin embargo, es imperativo realizar un trabajo complementario a este que pueda demostrar dicha afirmación.

La concordancia de la prueba ELISA, en primera instancia, se realizó entre los animales donde se realizó el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* y los animales con resultados negativos al cultivo. Es evidente que el ELISA es una buena alternativa de diagnóstico en unidades de producción, donde la enfermedad está establecida, porque no requiere de una muestra de material purulento proveniente de los abscesos en la presentación clínica de la enfermedad y tendría la capacidad de detectar animales con la forma visceral o asintomáticos. Esta ventaja, también la tendría por encima de la prueba de PCR, que también requiere del material purulento. Oreiby en 2014 (19) menciona que se han realizado pruebas de PCR a partir de muestras de sangre, sin embargo, los resultados de estas han sido poco satisfactorios.

Cetinkaya (10) menciona que las pruebas serológicas presentan algunos problemas al momento de ser usadas para el control de la linfadenitis caseosa, debido a que estas suelen arrojar una cantidad elevada de falsos positivos o falsos negativos. Esto hay que tomarlo en cuenta al momento de decidir si se usa o no esta prueba para el control de la enfermedad; además, sin descartar, que podría estar identificando animales con la presentación visceral.

En este trabajo, cuando se compararon los resultados del ELISA con los obtenidos con la prueba de oro (el aislamiento bacteriano) se obtuvo un índice k de 0.5910 que en base a lo establecido en la tabla de Landis & Koch (2) hay un grado de acuerdo moderado pero aceptable. Corona (12) obtuvo un índice k de 0.57 con una sensibilidad de 85.71% el índice k es muy similar a obtenido en este trabajo debido a que se utilizó el mismo modelo de la prueba de ELISA. Por otro lado, Baird y Fontaine en 2007 (13) reportan que la sensibilidad de la prueba de ELISA es de 86.3%,

Cuando se compararon los resultados de ELISA con los resultados de diagnóstico con cuadro clínico se observó que el índice k era menor al obtenido en la comparación con aislamiento bacteriano, alcanzando apenas un 0.1225 de grado de concordancia, teniendo un acuerdo insignificante. En la tabla 13 observamos que hay casi 50% de discordancias, también se observa que 22 casos resultaron positivos a la prueba de ELISA y negativos al diagnóstico basado en cuadro clínico, esto quiere decir que 22 animales que eran aparentemente sanos

resultaron positivos a nuestra prueba de ELISA. Como se ha mencionado antes, esto se puede dar cuando existe una presentación visceral de la enfermedad. Riveiro y colaboradores (30) en 2013 hicieron un estudio para analizar el diagnóstico subclínico de la linfadenitis caseosa con la prueba de ELISA, y encontraron que en la región norte de Brasil 71% de animales asintomáticos a los que se les hizo la prueba de ELISA resultaron positivos a la enfermedad.

Fontaine menciona que los resultados de las pruebas serológicas se ven afectados, en lugares donde la vacunación es común como es el caso de los Países Bajos (13), Australia (35) o Brasil (17) debido a los anticuerpos vacunales. En México no es común esta práctica de manera masiva, debido a que no hay vacunas comerciales contra *C. pseudotuberculosis*, sin embargo, algunos productores utilizan autovacunas, como la diseñada en el Centro Nacional de Investigación disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP. (21)

Binns (6) menciona que las pruebas de ELISA que utilizan como base antigénica componentes de la bacteria obtenidos por sonicación han presentado buenos resultados, la mayoría de autores coinciden en que la especificidad para esta técnica es de más del 90%; sin embargo, el autor antes citado, encontró que los métodos que detectan anticuerpos totales tienen sensibilidad del 71%, mientras que los que se basaron solamente en la detección de anticuerpos IgG mostraron una sensibilidad del 83%, esto quiere decir que las pruebas que solo detectan anticuerpos IgG son más eficaces que las que determinan anticuerpos totales. En el mismo trabajo, se obtuvieron mejores resultados cuando se hicieron varias diluciones en vez de una; en el presente estudio, no se hicieron muchas diluciones, situación que podría causar una baja sensibilidad y especificidad, lo que puede reflejarse en el bajo grado de concordancia con la prueba de oro. Oreiby (23) menciona que el uso de anticuerpos totales presenta problemas debido a que se detecta la IgM, y este anticuerpo tiene reacción cruzada con muchas bacterias relacionadas antigénicamente; otro factor que puede influir en la sensibilidad es el estado inmunitario de los animales, por lo que es preferible utilizar la IgG para las pruebas de ELISA, debido a que este anticuerpo es contra la exotoxina PLD, además de que la IgG se presenta en infecciones de larga duración como es el caso de la linfadenitis caseosa.

Es importante mencionar que se recomienda hacer la prueba de ELISA en animales mayores de seis meses, ya que antes de esa edad todavía cuentan con anticuerpos maternos. En este

trabajo no se pudo determinar las edades de la mayoría de los animales, sin embargo, la mayoría de ellos eran mayores de 12 meses de edad.

Chirino (11) menciona que una de las limitantes de las pruebas serológicas es la detección de falsos positivos y falsos negativos, además de que no distinguen a los animales recuperados expuestos de los animales aun enfermos, sin embargo, también se pueden considerar como seropositivos aquellos que no tienen la presentación cutánea, pero que sí podrían tener la forma visceral, tal como lo mencionan Riveiro y colaboradores en su trabajo en 2013, lo que se confirma con nuestro trabajo donde encontramos animales seropositivos sin presentación del cuadro clínico.

Otros autores reportan sensibilidad del 93.5% (17) o 79% (35) y la especificidad de más del 95%, y como ya se mencionó antes, nosotros obtuvimos un 25% de especificidad, por lo que se podría pensar que el diseño de nuestra prueba de ELISA ha sido deficiente; sin embargo, este resultado podría complementarse con el seguimiento de los animales con dicho resultado hasta el sacrificio, donde se determinaría si tenían o no la enfermedad visceral y así poder tener un panorama más amplio sobre la efectividad de las pruebas serológicas.

Conclusión

La prueba de ELISA demostró un comportamiento aceptable, con una sensibilidad que alcanzan aproximadamente el 80%.

La sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA respecto a cuadro clínico resultó ser bajo, sin embargo, no se descarta como prueba diagnóstica, debido a la alta posibilidad de que esté detectando animales con la presentación visceral de la enfermedad, ya que se trabajó en unidades de producción donde la enfermedad estaba establecida.

El grado de acuerdo entre las pruebas de ELISA y el aislamiento bacteriano que se obtuvo fue de 0.5910, lo que indica que es moderado, por lo que la prueba tiene validez diagnóstica.

Por otra parte, la técnica de PCR mostró resultados muy buenos para la identificación de colonias bacterianas sugestivas de ser *C. pseudotuberculosis*.

Referencias

- 1 A L M Hodgson PB, Nisbet IT. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of the Phospholipase D Gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. 1990; 172(3).
- 2 Abaira V. El indice kappa. *SEMERGEN-Medicina de Familia*. 2001; 27(5).
- 3 Almeida A, Dorneles EMS, Diniz C, Abreu V, Sousa C, Alves J. Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC Vet.*. 2017; 13(1).
- 4 Batey RG. Pathogenesis of caseus lymphadenitis in sheep and goat. *Australian Veterinary Journal*. 1986; 63(9).
- 5 Belchior SE, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Jansen O. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Veterinaria Argentina*. 2006; 23(224).
- 6 Binns S, Green LE, Biley M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol*. 2007; 123(1-3).
- 7 Blood DC, Henderson JA, Radostis OM. *Medicina Veterinaria*. 5th ed. México DF : Interamericana; 1982.
- 8 Carrillo M, Hernández JLO&JR. Prevalencia de linfadenitis caseosa en hatos caprinos de la comarca lagunera de Durango. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 2005; 4(1).
- 9 Cebra C, Cebra M. Diseases of the Hematologic, immunologic, and Lymphatic System (Multisystem Diseases). En Pugh DG, Baird AN, Edmonson MA, Passler T. *Sheep, Goat, and Cervid Medicine*. Alabama: Elsevier; 2020. p. 466-502.
- 10 Cetinkaya , Karahan , Atil E, Kalin R, De Baere T, Vaneechoutte M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*. 2002; 88(1).
- 11 Chirino-Zarraga , Scaramelli , Rey. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research*. 2006; 65(1).
- 12 Corona R. Evaluación de dos pruebas de diagnóstico para linfadenitis caseosa en ovinos utilizando tres métodos de obtención de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tesis. 2011.
- 13 Fontaine GJB&MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine Caseous Lymphadenitis. *J Comp. Path.*. 2007; 137(4).

- 14 Froes AP, Rocha JR, Beutinger S, Santana L, Souza A, Aquino MCl. rSodC is a potential antigen to diagnose *Corynebacterium pseudotuberculosis* by enzyme-linked immunoassay. *AMB Expr.* 2020; 10(186).
- 15 Galán JA, Pérez JM. Centenario de Edmond Nocard. *Med Mil.* 2003; 54(4).
- 16 Gallardo AA, Toledo RA, Gonzáles RA, Azevedo V, Robles C, Paolicchi FA. *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis: evaluación de la sensibilidad antibiótica in vitro. *Rev Argent. Microbiol.* 2019; 51(4).
- 17 Guimaraes S, Borges F, Barbosa R, Seyffert N, Ribeiro D, Pereira A. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *IIOAB J.* 2011; 2(11).
- 18 Gutierrez D. Diagnóstico de situación de las principales enfermedades que afectan a los ovinos en diferentes unidades de producción ovina en algunas comunidades del estado de México. Tesis. 2022.
- 19 Hernández F, Oca RMd, Varela JA, Fernández P, Salazar F, Monroy HG. Análisis Filogenético en aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de casos clínicos de linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos. *Rev. Acad. Cienc. Anim.* 2019; 17(1).
- 20 Kumar J, Tripathi BN, Kumar R, Sonawane GG, Dixit SK. Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* 2013; 45(6).
- 21 Munguia MdL, Morales JF. Control y prevención de la linfadenitis caseosa en ovinos. Folleto para productores. 2017;(7).
- 22 Naji M, Abdullah FF, Teik EL, Mahmood Z, Wahid A, Mohd A. Clinico-pathological responses and PCR detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. *Microb Pathog.* 2019; 135(1).
- 23 Oreiby AF. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. *Small Rumin Res.* 2014; 123(1).
- 24 Pacheco L, Pena R, Castro T, Dorella F, Bahia R, Carminati R, et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology.* 2007; 1(56).
- 25 Parise D, Parise MT, Viana MV, Muñoz-Bucio Av, Cortés-Péres YA, Arellano-Reynoso B. First genome sequencing and comparative analyses of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains from Mexico. *Stand Genomic Sci.* 2018; 13(21).

- 26 Paton MW, Rose IR, Hart RA, Sutherland SS, Mercy AR, Ellis TM, et al. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust. Vet. J.* 1994; 71(2).
- 27 Paton MW, Walker SB, Rose IR, Watt GF. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.* 2003; 81(1).
- 28 Pépin M, Paton MW. Caseous lymphadenitis in sheep and goat. En Lefevre P, Blancou J, Chermette R, Uilenberg G, editores. *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. Francia : Lavoisier; 2011. p. 1153-1165.
- 29 Pérez E. Respuesta serológica de ovinos vacunados y revacunados contra linfadenitis caseosa. Tesis. 2017.
- 30 Ribeiro , Alves Dorella , Carvalho Pacheco , Seyffert N, de Paula Castro L, Dias Portela. Subclinical Diagnosis of Caseous Lymphadenitis Based on ELISA en Sheep from Brasil. *Journal of Bacteriology and Parasitology*. 2013; 4(3).
- 31 Selim AM, Atwa SM, Gedawy AAE, Younis EE. Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in sheep of Dakhliya, Egypt. *Anim Biotechnol*. 2021; 1(6).
- 32 SIAP. Panorama Agroalimentario 2019. 1st ed. México : SADER; 2019.
- 33 Varela JA, Oca RMD, Acosta J, Hernández F, Morales-Erasto V, Monroy HG. First report of insolation and molecular characterization of the pathogenic *Corynebacterium pseudotuberculosis* from of sheep and goats in México. *Microb Pathog*. 2018; 117(1).
- 34 Vizcaíno G. Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad, y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina y laboratorio*. 2017; 23(7-8)
- 35 Williamson LH. Caseus Lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2001; 17(2).
- 36 Windsor PA. Control of Lymphadenitis Caseous. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2011; 27(1).
- 37 Zaldivar N, Ortiz L, Puebla H, Almaguer YP&Y. Caracterización clínico-hematológica, bioquímica y anatomopatológica de la seudotuberculosis ovina. *Rev. prod, anim.*, 2002; 14(1).

Anexos I

A.- Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica de laboratorio que permite diferenciar las bacterias según la estructura de su pared celular. Los pasos detallados para realizar la tinción de Gram son los siguientes:

1. Preparar un frotis bacteriano sobre un portaobjetos limpio y seco, extendiendo una gota de cultivo con un asa de inoculación.
2. Fijar el frotis al calor, pasando el portaobjetos por la llama de un mechero varias veces.
3. Cubrir el frotis con cristal violeta, que es el colorante primario, y dejar actuar durante un minuto.
4. Lavar el exceso de colorante con agua corriente y secar con papel absorbente.
5. Cubrir el frotis con Lugol, que es el mordiente, y dejar actuar durante un minuto.
6. Lavar el exceso de Lugol con agua corriente y secar con papel absorbente.
7. Decolorar el frotis con alcohol-acetona, que es el agente decolorante, aplicando unas gotas hasta que el color violeta desaparezca.
8. Lavar el exceso de alcohol-acetona con agua corriente y secar con papel absorbente.
9. Cubrir el frotis con safranina, que es el colorante secundario, y dejar actuar durante un minuto.
10. Lavar el exceso de safranina con agua corriente y secar con papel absorbente.
11. Observar el frotis al microscopio óptico con el objetivo de inmersión.

El resultado de la tinción de Gram depende del tipo de bacteria: las grampositivas se tiñen de violeta y las gramnegativas se tiñen de rosa

Tinción de Gram	
Paso y reactivo	Tiempo
Tinción con Cristal violeta	1 min
Lavado con agua	
Fijación con Lugol	1 min
Decolorar con alcohol	
Tinción con safranina	1 min
Lavar con agua	

B.- Protocolo de extracción de ADN

Instrucciones del fabricante en inglés

ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™

Catalog No. 06005

Protocol

For optimal performance, add beta mercaptoethanol (user supplied) to the Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer to a final dilution of 0.5% (v/v) i.e., 500 µl per 100ml

1. Add 50-100 mg (wet weight) fungal or bacterial cells that have been resuspended in up to 200µl of water or isotonic buffer (e.g. PBS) or up to 200mg of tissue to ZR BashingBead™ Lysis Tube. Add 750 µl Lysis Solution to the tube.
2. Secure in bead fitted with a 2 ml tube holder assembly (e.g. Disruptor Genie™) and process at maximum speed for 5 minutes
 - i. Processing times may be as little as 40 seconds using high-speed cell disrupters (e.g. the portable Xpedition™ Sample Processor page 5. FastPrep®-24, or similar). See manufacturer's literature for operating information.
3. Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Tube in a microcentrifuge at 10,000 x g for 1 minute
4. Transfer up to 400 µl supernat to a Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Orange top) in a Collection tube and centrifuge at 7 000 rpm (~7 000xg) for 1 minute
 - i. Snap off the base of the Zymo-Spin IV™ spin Filter prior the use
5. Add 1,200 µl of Fungal/bacteria DNA Binding Buffer to the filtrate in the Collection tube from Step 4
6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a Zymo-Spin™ IIC Column in a Collection Tube and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute
7. Discard the Flow through from the Collection Tube and repeat Step 6
8. Add 200 µl DNA Pre-Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IIColumn in a new Collection Tube and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute

9. Add 500 μ l Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IIC Column and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute
10. Transfer the Zymo-Spin™ IIC Column to clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 100 μ l (25 μ l minimum) DNA Elution Buffer directly to the column matrix
Centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds to elute the DNA

Ultra pure DNA is now ready for use in your experiments.

Instrucciones del fabricante traducidas al español.

ZR ADN fúngico/bacteriano MiniPrep™

N.º de catálogo 06005

Potocolo

Para un rendimiento óptimo, agregue beta mercaptoetanol (suministrado por el usuario) al Buffer de unión de ADN fúngico/bacteriano hasta una dilución final de 0,5 % (v/v), es decir, 500 μ l por 100 ml

1. Agregue de 50 a 100 mg (peso húmedo) de células fúngicas o bacterianas que se hayan resuspendido en hasta 200 μ l de agua o buffer isotónico (p. ej., PBS) o hasta 200 mg de tejido al tubo de lisis ZR BashingBead™. Agregue 750 μ l de solución de lisis al tubo.
2. Fijar en perla equipada con un soporte para tubos de 2 ml (p. ej., Disruptor Genie™) y procesar a máxima velocidad durante 5 minutos
 - i. Los tiempos de procesamiento pueden ser de tan solo 40 segundos con disruptores celulares de alta velocidad (p. ej., el procesador de muestras portátil Xpedition™ página 5. FastPrep©-24, o similar). Consulte la documentación del fabricante para obtener información sobre el funcionamiento.
3. Centrifugue el ZR BashingBead™ Lysis Tube en una microcentrífuga a 10 000 x g durante 1 minuto.
4. Transfiera hasta 400 μ l de sobrenadante a un filtro giratorio Zymo-Spin™ IV (tapa naranja) en un tubo de recolección y centrifugue a 7 000 rpm (~7 000xg) durante 1 minuto

- i. Quite la base del filtro giratorio Zymo-Spin IV™ antes del uso
5. Agregue 1200 µl de buffer de unión de ADN de hongos/bacterias al filtrado en el tubo de recolección del paso 4
6. Transfiera 800 µl de la mezcla del Paso 5 a una columna Zymo-Spin™ IIC en un tubo Colleton y centrifugue a 10 000 x g durante 1 minuto.
7. Deseche el flujo del tubo de recolección y repita el paso 6
8. Agregue 200 µl de buffer de prelavado de ADN a la columna Zymo-Spin™ II en un tubo de recolección nuevo y centrifugue a 10 000 x g durante 1 minuto.
9. Agregue 500 µl de buffer de lavado de ADN bacteriano/fúngico a la columna Zymo-Spin™ IIC y centrifugue a 10 000 x g durante 1 minuto.
10. Transfiera la columna Zymo-Spin™ IIC para limpiar el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y agregue 100 µl (25 µl como mínimo) de buffer de elución de ADN directamente a la matriz de la columna. Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos para eluir el ADN.

El ADN ultra puro ahora está listo para usar en sus experimentos.