



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE LA INMUNIDAD QUE
SE PRESENTA EN LA LINFADENITIS CASEOSA EN
OVINOS Y CAPRINOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ITZEL MIRANDA NÚÑEZ

**ASESORA: M.V.Z. SUSANA ELVIRA GARCÍA VÁZQUEZ
COASESOR: Dr. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ
RODRÍGUEZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE		Pag.
1.	RESUMEN	3
2.	INTRODUCCIÓN	4
2.1.	Inmunología	4
2.2.	Mecanismos de defensa	4
2.3	Principales características del sistema inmune	5
2.4	Órganos y células implicados en la Inmunidad	5
2.4.1	Órganos linfoides primarios	5
2.4.2	Órganos linfoides secundarios	5
2.5	Células que forman el Sistema Inmune	6
2.6	Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)	7
2.7	Antígenos	9
2.8	El género <i>Corynebacterium</i>	9
2.9	Características descriptivas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	10
2.10	Linfadenitis Caseosa (LC)	11
2.11	Patogenia de LC	11
3.	OBJETIVOS	16
4.	METODOLOGÍA	17
5.	FACTORES DE VIRULENCIA	18
5.1	Fosfolipasa D	18
5.2	Ácidos micólicos y peptidoglicano	20
5.3	Operon fag ABC	21
5.4	Péptidos inmunodominantes	22
5.5	AroQ y AroB: biosíntesis de aminoácidos	22
5.6	Genes de respuesta al choque térmico	24
6.	MECANISMOS INESPECÍFICOS DE DEFENSA	27
6.1	Proteínas sanguíneas, IFN- γ , activación del complemento, TNF- α , interleucinas	30
6.2	Monocitos y macrófagos	35
7.	MECANISMOS DE RESISTENCIA ESPECÍFICA	36
7.1	Inmunidad Humoral (Ig's)	37
7.2	Respuesta inmune mediada por células	38
7.2.1	Linfocitos y subpoblaciones	39
8.	VACUNACIÓN	42
8.1	Bacterinas	43
8.2	Toxoides	44
8.3	Vacunas combinadas	45
8.4	Vacunas vivas.	45
8.5	Vacunas ADN	46
9.	DETECCIÓN DE INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR	48
9.1	Detección de antígeno-anticuerpo	49
9.1.1	Aplicación de la prueba de ELISA	53
9.1.2	Resonancia de Plasmones Superficiales	59
9.2	Detección de inmunidad celular	61
10.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	65

10.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	65
10.2	Técnica de macroarreglos ADN	66
11.	INMUNIDAD DE MUESTRAS HETERÓLOGAS	67
12.	DISCUSIÓN	68
13.	CONCLUSIONES	71
14.	BIBLIOGRAFÍA	72
15	GLOSARIO	86

1. RESUMEN

Los ovinos y los caprinos son especies domésticas que están predispuestas a padecer enfermedades que propician pérdidas económicas en su producción, sin embargo poseen defensas inespecíficas y específicas que en la mayoría de las ocasiones les permiten protegerse del ataque de agentes infecciosos presentes en el medio ambiente. Una enfermedad importante y de presentación común es la Linfadenitis Caseosa (LC), padecimiento crónico de cabras y ovejas que se caracteriza por provocar lesiones purulentas y caseosas, principalmente en linfonodos y ocasionalmente en órganos internos como pulmón, hígado, bazo, riñón y corazón. *Corynebacterium pseudotuberculosis* es el agente etiológico de esta enfermedad, una vez que se establece en un rebaño es difícil erradicarla debido a que la terapia con antibióticos no es efectiva, además que el diagnóstico clínico de la enfermedad es limitado. Es una enfermedad de amplia distribución mundial y su frecuencia depende principalmente de la densidad animal y del sistema de explotación. En este trabajo se hace una recopilación de diversas publicaciones sobre la Linfadenitis Caseosa (LC) con especial interés en los aspectos de inmunidad. Muchos estudios experimentales se han desarrollado para conseguir una vacuna confiable para el control de la enfermedad en ovinos y caprinos. Se han empleado diferentes preparaciones de antígenos observándose que *C. pseudotuberculosis* desarrolla una respuesta inmunitaria muy compleja de carácter humoral y celular que no recae sobre un único antígeno, sino que es producto de la compleja configuración de la pared bacteriana. Esta revisión describe las características importantes de *C. pseudotuberculosis* y examina la patogénesis de la infección, también refiere la respuesta inmune de la infección y los métodos desarrollados para el control de la LC, con particular énfasis en el uso de la vacunación y pruebas serológicas. Se han desarrollado muchas pruebas serodiagnósticas para superar el problema de la identificación clínica de LC, pero la mayoría se reportan con carencia de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, algunas pruebas de ELISA se reportan como efectivas para el control y erradicación de la enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Inmunología Veterinaria

Es la ciencia que estudia los mecanismos por los cuales los animales pueden diferenciar su propia estructura de la ajena, reaccionar contra lo extraño y memorizarlo para el futuro. La inmunología como disciplina científica comienza a estudiarse en el siglo XVIII como una parte de la microbiología; en esta época aparece la primera vacuna contra la viruela. La inmunología a través del sistema inmune, interrelaciona numerosos órganos de los seres vivos, de modo que se implica en la regulación de numerosas funciones fisiológicas del organismo que debemos conocer para entender su importancia en el animal (Sánchez, 2001; Manteca *et al.*, 2004).

2.2 Mecanismos de defensa

La protección del cuerpo proviene de un sistema complejo de mecanismos que se superponen e interrelacionan de modo que en conjunto sean capaces de destruir o controlar a casi cualquier invasor. En forma general tales mecanismos se dividen en: **mecanismos inespecíficos y mecanismos específicos.**

A. Mecanismos inespecíficos de defensa (**Inmunidad Natural o Innata**):

- Sistemas anatómicos (barreras mecánicas): piel, tracto gastrointestinal, aparato respiratorio, tracto urogenital, glándula mamaria, etc.
- Sistemas bioquímicos y celulares: enzimas y sustancias; células fagocíticas.
- Sistemas biológicos: microbiota.
- Otros: constitución genética, edad, hormonas, nutrición y el estrés.

Aunque estos mecanismos proporcionan cierto grado de protección en contra del agente etiológico, algunos microorganismos en muchas ocasiones son capaces de evadirlos (Morilla, 1989; Pérez 1990; Gershwin, 1995; Tizard, 2009).

B. Mecanismos específicos (**Inmunidad Adquirida o Adaptativa**):

Están dados por el sistema inmune. Los mecanismos específicos dependen de la exposición previa del organismo a un antígeno y del posterior reconocimiento y respuesta contra éste. El paso inicial es la presentación de un antígeno a los linfocitos T. La inmunidad adquirida puede ser natural activa, natural pasiva, artificial activa y artificial pasiva.

- Natural Activa. Ej: presencia de enfermedad.
- Natural Pasiva. Ej: anticuerpos a través de calostro.
- Artificial Activa. Ej: vacunación.
- Artificial Pasiva. Ej: aplicación de sueros hiperinmunes (Morilla, 1989; Pérez *et al.*, 1990).

2.3 Principales características del sistema inmune

- ✓ **Capacidad para diferenciar lo propio de lo ajeno.** El sistema inmune tiene una capacidad extraordinaria de reaccionar frente a cualquier molécula distinta de la propia estructura por pequeña que esta sea. Sin embargo, no reacciona frente a sus propios componentes, o excepcionalmente ocurre bajo ciertas circunstancias.
- ✓ **Especificidad.** Tanto los anticuerpos como los linfocitos sólo reconocen a un único epítotope o determinante antigénico. El sistema inmune puede reconocer miles de millones de antígenos diferentes, pero para cada determinante se inducirá un linfocito específico. Existen tantos linfocitos estimulados, como determinantes formen el antígeno.
- ✓ **Memoria.** Cuando un antígeno se presenta por vez primera al sistema inmune, se produce una respuesta primaria, quedando un linfocito de memoria por cada uno de los epítotoes del antígeno. Cuando ese antígeno vuelva a estar en contacto con el sistema inmune (respuesta secundaria), el linfocito de memoria se estimulará para producir cuantos clones de linfocitos específicos sean necesarios (frente a ese determinado epítotope) de una manera más rápida y efectiva que en la respuesta primaria. Estas características son la base de la inmunización, seroterapia, inmunoterapia y del diagnóstico serológico (Morilla, 1989; Sánchez, 2001).

2.4 Órganos y células implicados en la Inmunidad

2.4.1 Órganos linfoides primarios. En pequeños rumiantes regulan la producción y diferenciación de linfocitos. Los linfocitos maduros caen en dos poblaciones principales, que se denominan linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos T se diferencian en el timo, mientras que los linfocitos B se diferencian en tejidos como las placas de Peyer. Todos estos órganos se generan en una etapa temprana de la vida fetal (Tizard, 2009).

2.4.2 Órganos linfoides secundarios. A diferencia de lo primarios, surgen en una etapa tardía de la vida fetal y persisten durante toda la vida adulta. Se encargan de la estimulación antigénica, y por ello se desarrollan poco en los animales libres de microorganismos. Entre los ejemplos de los órganos linfoides secundarios están el bazo, los linfonodos y las acumulaciones linfáticas de las vías digestivas, respiratorias y urogenitales. Dichos órganos son ricos en macrófagos, y células dendríticas, las cuales atrapan y transforman los antígenos, así como los linfocitos T y B, que son los mediadores de las respuestas inmunitarias (Tizard 2009; Sánchez, 2001).

2.5 Células que forman el Sistema Inmune

Son muy variadas tanto en su estructura como en su función y todas proceden de una **Célula Madre Pluripotencial** de la médula ósea, de la que se diferencian dos líneas distintas: la **línea linfoide** y la **línea mieloide**. De la primera línea se derivan diferentes tipos de linfocitos, responsables de llevar a cabo las principales funciones que caracterizan al sistema inmune y que le permite reaccionar frente a moléculas extrañas de forma específica, así como recordarlas en una invasión futura. De esta línea se derivan los linfocitos B, responsables de la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig's), denominándose **Inmunidad Humoral**. La inmunidad humoral para los pequeños rumiantes es representada por diversas clases de inmunoglobulinas; en el caprino se han identificado: IgG, IgA e IgM, encontrando dos subclases de IgG: IgG₁ e IgG₂ (Gray *et al.*, 1969); mientras que en el ovino se conocen: IgG, IgA, IgM e IgE y presentan las siguientes subclases: IgG₁, IgG_{1a}, IgG₂, e IgG₃, IgA₁ e IgA₂ y solo una subclase de IgE. En cuanto a la **Inmunidad Celular**, se reconocen a las células CD4⁺ (cooperadoras) y CD8⁺ (supresoras). Para las células CD4⁺ existen las subclases Th1 y Th2 (helper o cooperadores). Otra subclase reconocida en las ovejas son los linfocitos T $\gamma\delta$. De la segunda línea, se derivan las células denominadas accesorias o presentadoras de antígenos, que aunque no responden por mecanismos de especificidad, forman parte de la inmunidad natural o innata y desempeñan un papel esencial en la iniciación de la inmunidad adquirida. Las células accesorias incluso pueden actuar como células efectoras en algunos mecanismos inmunitarios. Este grupo de células está formado por monocitos-macrófagos y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y células dendríticas, siendo las funciones principales de estas células: la fagocitosis, presentación de antígenos y producción de citocinas. Ver figura 1 (Sánchez, 2001; Tizard, 2009).

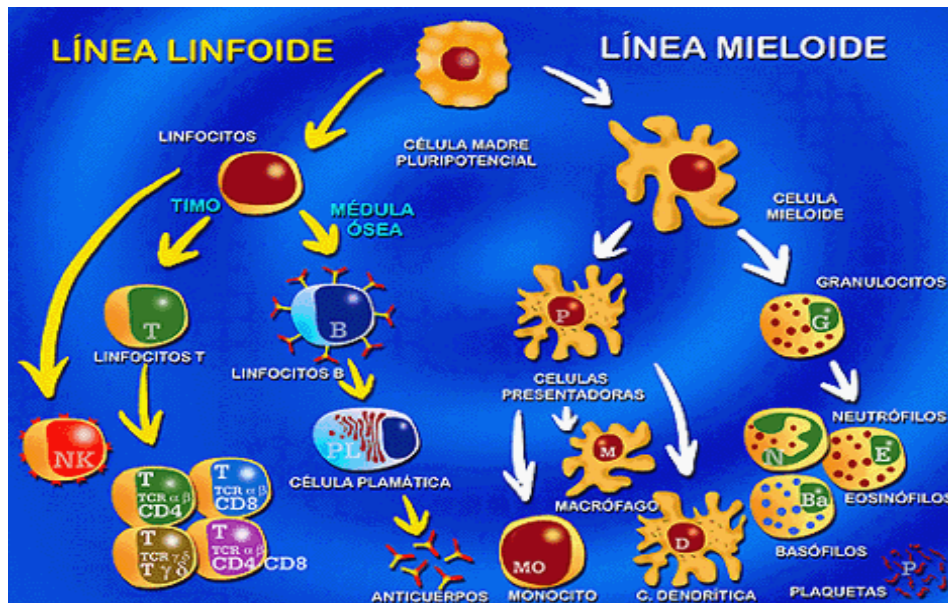


Figura 1. Breve descripción del origen de las células del sistema inmune. (Sánchez, V. J.M., 2001).

2.6 Complejo Principal de Histocompatibilidad

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (de las siglas en inglés, Major Histocompatibility Complex-MHC-) es un inmenso conglomerado multigenético que ocupa alrededor de 2,000 a 4, 000 kilobases del ADN, éste codifica un amplio número de productos genéticos y se considera como parte integral de la respuesta del sistema inmunitario. El MHC incluye a los genes altamente polimórficos que codifican las moléculas péptidoaglutinantes reconocidas por los linfocitos T. El MHC codifica proteínas que desempeñan un papel esencial en la respuesta celular pudiendo distinguir las proteínas propias de las no propias. Las proteínas no propias pueden originarse de tejidos trasplantados o de infecciones patogénicas. Las numerosas proteínas codificadas por el MHC están presentes en casi todos los tipos de células del cuerpo y por lo general se localizan sobre la superficie celular. Estos productos genéticos actúan en concierto con los productos genéticos de los linfocitos B y *loci* genéticos de los linfocitos T, con el objetivo de proveer un reconocimiento selectivo y una eficiente eliminación de las células infectadas. Así mismo, el *locus* del MHC codifica citocinas, moléculas implicadas en el procesamiento del antígeno y proteínas del complemento (Montaño, 2005).

Cada MHC contiene tres clases de genes. Los genes de clase I codifican moléculas que se encuentran en la superficie de la mayor parte de las células nucleadas (y en eritrocitos en algunas especies), pueden dividirse en los que tienen gran polimorfismo (genes de clase Ia) y aquellos con escaso polimorfismo (clase Ib). Los genes de clase II codifican moléculas del MHC que se encuentran principalmente en las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas y células B). Debido a que las moléculas del MHC tanto de clase I como de clase II son receptores que se unen a fragmentos de antígenos y los presentan a linfocitos, estos regulan eficazmente la respuesta inmunitaria. Los genes de clase III codifican proteínas diferentes a una amplia variedad de funciones, muchas de las cuales no están directamente ligadas a la presentación de antígenos. Algunos de estos genes de clase III codifican proteínas del sistema del complemento (Tizard, 2009; Montaño, 2005).

Las moléculas de histocompatibilidad se detectan con mayor facilidad en los leucocitos sanguíneos, y reciben el nombre de la especie animal seguido de LA (Antígeno de Leucocitos). El MHC del ovino se denomina OLA y se localizó en el cromosoma 20 por hibridación in situ. Se han identificado cuando menos 16 alelos clase I controlados por tres loci (OLA-A, OLA-B, -que probablemente sean genes de clase I- y OLA-C). Seis han sido asignados a OLA-A, cinco a OLA-B y tres a OLA-C. La resisitencia a Scrapie y a la Linfadenitis Caseosa parece relacionarse con la posesión de algunos de estos alelos (Mahdy, 1989). Los ovinos también presentan genes de Clase II denominados DRA, DNA, DOB, así como loci pares de DRB, DQA y DQB. Por tanto, la subregión DQ consta de dos loci, el DQ1 y el DQ2, cada uno de los cuales contiene un gen polimórfico A y B. Se transcriben los genes de cada locus, pero solo el DQ1 expresa productos detectables. Los ovinos también cuentan con un locus DY que contiene un gen A y otro B.

Un tercer gen detectado serológicamente es OLA-X, el cual se desconoce si pertenece al locus de clase I o de clase II. El complejo principal de histocompatibilidad en el caprino se denomina GLA y consta de 13 alelos de Clase I en dos loci vinculados, y 3 alelos de Clase II en un único locus. Tres genes distintos agrupados parecían estar involucrados en la expresión de GLA; un SD1, SD2 y LD. En reportes recientes hay datos sugestivos de 27 antígenos específicos de clase I. Ver tabla 1 (Smith y Sherman, 1994; Tizard, 2009).

Especie Sistema	Borrego (OLA)	Cabra (GLA)
Molécula clase I	A,B?	SD1, SD2?
Molécula clase II	-	-
Molécula clase III	-	-
Genes de respuesta inmunitaria (genes Ir)	-	-
Caracterización bioquímica de antígenos	-	-
Restricción MHC para la función de células T	-	-
Otros loci ligados al MHC	-	-
Asociación con enfermedad	-	-

Tabla 1. Características principales del complejo principal de histocompatibilidad en animales domésticos. (Adaptado de Gorodezky, C. 1997).

2.7 Antígenos.

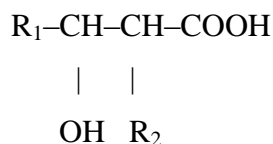
Un **antígeno** es una sustancia extraña capaz de inducir una respuesta inmune; se consideran antígenos a las bacterias, virus, parásitos, hongos, polen, componentes de alimentos, y en ocasiones, células alogénicas o tumorales. El cuerpo debe ser capaz de reconocerlos como extraños para desencadenar una reacción inmunitaria. Las bacterias son microorganismos de diferente morfología, formados por un citoplasma, una membrana celular, pared celular, cápsula, flagelos y fimbrias; dependiendo del género y la especie bacteriana. Cada componente bacteriano puede funcionar como antígeno. Mientras algunas bacterias invaden los espacios intercelulares de los tejidos utilizando enzimas proteolíticas, otras son intracelulares. Los ejemplos más notables de bacterias de este tipo son *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, entre otras. Si bien son fagocitadas rápidamente por los macrófagos, estas bacterias son resistentes a la destrucción intracelular. Por esta razón, dichas bacterias pueden multiplicarse en el interior de los macrófagos, y distribuirse por todo el organismo en el interior de esas células. Al final los macrófagos mueren, a consecuencia de la expansión física de la masa de las bacterias que se desarrollan en su interior, lo cual da lugar a la ruptura celular (Abbas *et al.*, 2007; Gershwin *et al.*, 1995; Tizard, 2009).

2.8 El género *Corynebacterium*.

El género *Corynebacterium* abarca un gran número de especies e incluye importantes patógenos animales, patógenos vegetales y bacterias no patógenas. *Corynebacterium diphtheriae*, causante de la difteria humana, es la especie prototipo del género. Las corinebacterias son Gram positivas [G (+)] y muestran un alto grado de pleomorfismo; las especies patógenas son aerobias y anaerobias facultativas, no esporulan y son inmóviles, en ocasiones presentan gránulos en su citoplasma, los cuales se tiñen de manera irregular (gránulos metacromáticos). En los frotis tienden a la formación de agrupaciones características en forma de “empalizada” o “letras chinas”. De las más de 30 especies incluidas en el género, dos son regularmente asociados con enfermedades de importancia veterinaria, la bacteria intracelular facultativa *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente causal de la Linfadenitis Caseosa en pequeños rumiantes; en equinos causa Linfangitis Ulcerativa y en bovinos abscesos. Otra especie es *Corynebacterium renale*, agente causal de enfermedad en el tracto urogenital de rumiantes (Gillespie *et al.*, 1988; Quinn *et al.*, 2002a; Hirsh *et al.*, 2004; Songer, 2005).

Basándose en el contenido lipídico de la pared celular, el género *Corynebacterium* frecuentemente se agrupa con los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, y *Rhodococcus* para formar el grupo denominado **C M N R**, debido a que los cuatro géneros tienen paredes celulares ricas en complejos lipídicos similares pertenecen a la familia **Actinomycetaceae**. La principal característica de esos lípidos es la presencia de un ácido denominado ácido micólico. Las mureínas (peptidoglicanos o mucopéptidos) de sus paredes celulares contienen combinaciones de enlaces específicos. Las paredes celulares de este grupo tienen

un péptido común denominado ácido meso-alfa diaminopimélico (DAP), ácido glutámico y alanina, (también el género *Corynebacterium* contiene un polisacárido con arabinosa, galactosa y en ocasiones manosa) en asociación con arabinogalactán. Además de tener mureínas básicamente similares, los organismos del grupo C M N R incorporan entre sus paredes ácido corinemicólico y corinemicolénico en el caso de corinebacterias; ácido tetrahidronocárdico en nocardias o ácido micólico en micobacterias. Los ácidos micólicos son ácidos grasos beta hidroxílicos de cadena larga con sustituciones en el carbono alfa (Cummins, 1962; Cummins, 1965). La fórmula general para el ácido micólico es:



Con largas cadenas de carbono en sus radicales R, difiriendo entre si los cuatro géneros del grupo C M N R. El ácido micólico de *Mycobacterium spp* tiene el mayor número de carbonos de este grupo con (C₇₉-C₈₅). *Corynebacterium spp* tiene las cadenas de carbono más cortas de los cuatro géneros, conteniendo (C₂₈-C₄₀). *Rhodococcus* y *Nocardia* tienen un ácido micólico con cadenas de carbono de (C₄₀-C₅₀) y (C₄₈-C₅₈) respectivamente (Ionedá, 1990; Holt, *et al.*, 1994; Hirsh *et al.*, 2004).

2.9 Características descriptivas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis es un microorganismo gram positivo de apariencia similar a *Corynebacterium diphtheriae*. Microscópicamente *Corynebacterium pseudotuberculosis* es un bastón muy corto que mide de 1 a 3 µm de largo y de 0.5 a 0.6 µm de ancho, se tiñe irregularmente presentando gránulos metacromáticos y presenta unas fimbrias cortas. Es anaerobia facultativa y crece lentamente en agar sangre, produce colonias planas y opacas de color blanco amarillo en un tiempo aproximado de 24 a 48 h. Las colonias están rodeadas por un halo angosto de β-hemólisis. Los lípidos de la pared celular tienen un peso aproximado de 11.3% del peso seco de la bacteria. Debido al alto contenido lipídico, las colonias tienen un aspecto seroso y se deslizan fácilmente sobre la superficie del agar (Quinn *et al.*, 2002a).

Bioquímicamente *Corynebacterium pseudotuberculosis* es catalasa y ureasa positivo, es capaz de fermentar glucosa, galactosa, maltosa y manosa. Generalmente forman ácidos pero no forman gas con algunos carbohidratos. La capacidad para reducir nitratos a nitritos es variable. Existen dos biotipos que difieren bioquímicamente, serológicamente y epidemiológicamente: el biotipo equino (aislado de equinos y bovinos), reduce nitratos a nitritos (biotipo nitrato positivo); y el biotipo ovino, el cual es aislado de ovinos, caprinos y en pocas ocasiones de bovinos, no llega a reducir los nitratos a nitritos (biotipo nitrato-negativo) (Brown y Olander, 1987; Hirsh *et al.*, 2004; Songer, 2005).

2.10 Linfadenitis Caseosa (LC).

La LC es una enfermedad crónica contagiosa, caracterizada por la formación de abscesos en piel, linfonodos externos e internos y órganos internos. También es conocida con el nombre de Pseudotuberculosis, Enfermedad de Preisz-Nocard y Cheesy Gland. La prevalencia de LC puede ser del 50-70%, causando pérdidas económicas debido a la disminución en el rendimiento de la canal o decomiso, disminución de la producción de lana y piel, disminución de la eficiencia reproductiva, y mortalidad en casos severos. La enfermedad es de amplia distribución mundial y se ha reportado en países como Australia, Nueva Zelanda, Europa, Medio Oriente, Asia, África y América. (Brown y Olander, 1987; Paton *et al.*, 1994; Quinn *et al.*, 2002a; Gyles *et al.*, 2004). En humanos la infección causada por *C. pseudotuberculosis* es rara, y la mayoría de los casos reportados se relacionan con la exposición ocupacional; un caso diagnosticado en 1988 fue ocasionado por la ingestión de carne cruda de cabra y leche de vaca (Peel *et al.*, 1997). La literatura reporta 25 casos más de la enfermedad en humanos (Mills *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2005).

2.11 Patogenia de LC.

La Linfadenitis Caseosa ocasiona la formación de lesiones piogranulomatosas, y tiene dos presentaciones:

La **forma externa** (cutánea o superficial). Se caracteriza por el desarrollo de abscesos en linfonodos superficiales o tejido subcutáneo, con un período de incubación que va de 2 a 6 meses aunque se ha observado que puede ser mayor. Los abscesos normalmente se agrandan y debridan el material purulento de consistencia espesa y coloración blanco verdosa infectante al ambiente, y pueden desarrollarse en un período de tiempo significativo mostrando inflamación y rodeándose por una cápsula fibrosa produciendo la pérdida de pelo en la zona. La herida causada por el absceso puede sanar y meses más tarde repetir el proceso de debridación ocasionado por la incapacidad del animal para eliminar la bacteria. Ver tabla (Williamson y Nairn, 1980; Gillespie *et al.*, 1988; Schreuder *et al.*, 1990; Valli y Parry, 1993; Smith y Sherman, 1994; Radostis *et al.*, 2001; Grant, 2007; Baird y Fontaine, 2008).

El contenido purulento de las lesiones debridadas es una fuente importante de infección cruzada entre los animales del rebaño, ya que el número de microorganismos viables encontrados en el pus puede ser de 1×10^6 hasta 5×10^7 ufc/g (unidades formadoras de colonia por gramo). Por consiguiente, la ruptura de abscesos libera gran cantidad de bacterias sobre la piel y la lana contaminando el ambiente inmediato, de manera que los animales cercanos quedan expuestos a la bacteria, ya sea por contacto físico con el animal afectado (transmisión directa) o de forma indirecta con fomites contaminados (comederos, navajas para la esquila, etc.) y en baños de inmersión. Las bajas temperaturas y las condiciones de humedad prolongan la supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en el ambiente. Ver figura 2 (Nairn y Robertson, 1974; Augustine y Renshaw, 1986; Brown y Olander, 1987; Paton *et al.*, 2002; Gyles *et al.*, 2004; Hirsh *et al.*, *et al.*, 2004).

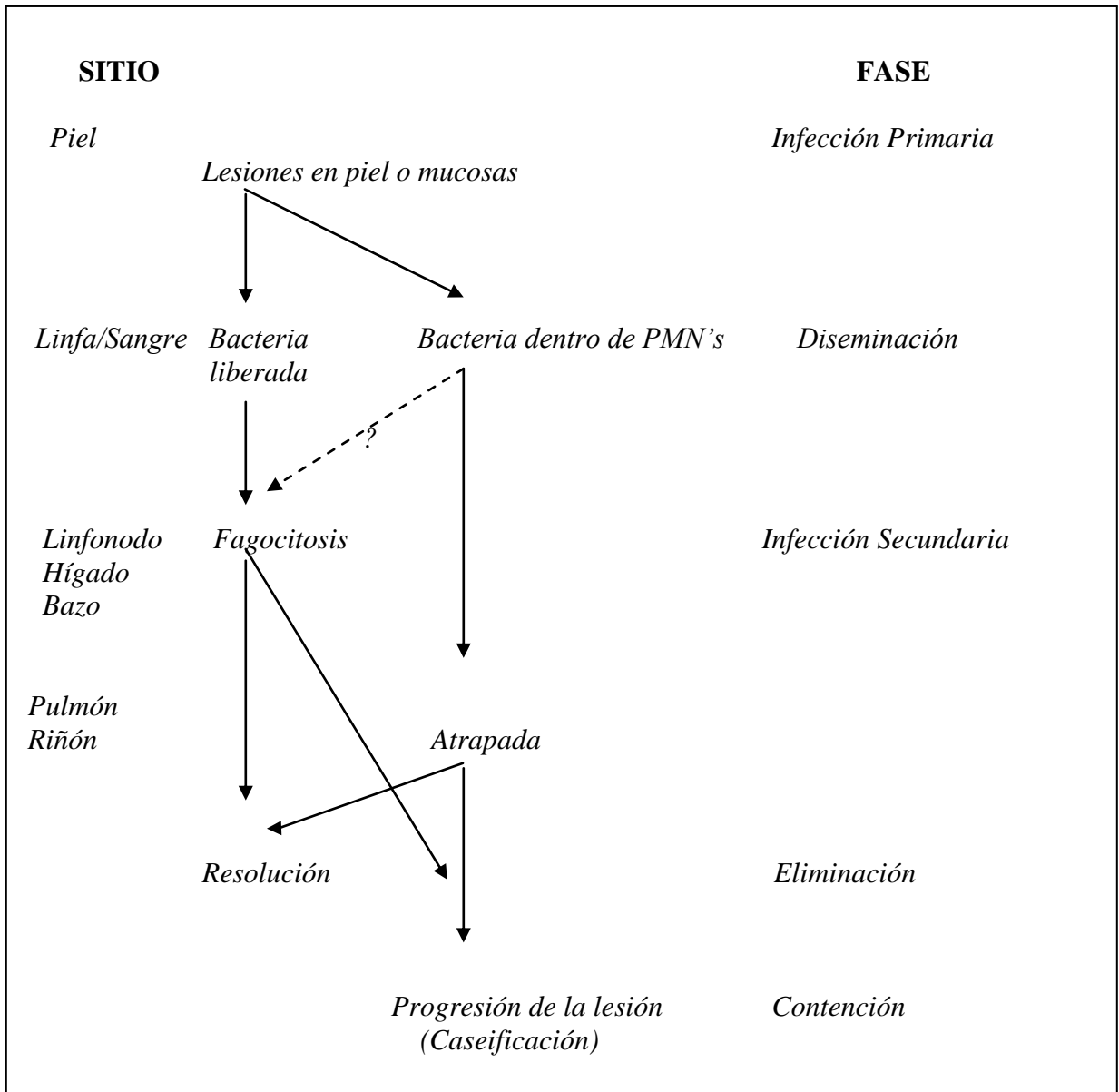


Figura 2. Patogénesis de la Linfadenitis caseosa (Batey, 1986).

La **forma interna** se caracteriza por la formación de abscesos en pulmones, hígado, riñones, bazo, glándula mamaria, escroto y linfonodos internos (principalmente los mediastínicos), aunque otros órganos como corazón, cerebro, médula espinal, testículos, útero y articulaciones pueden afectarse. En raras ocasiones el microorganismo se ha identificado en contenido estomacal y tejido fetal. En la actualidad existe un consenso general entre investigadores con respecto a las fases en que progresa la enfermedad. Después de ingresar la bacteria, continúa diseminándose por vía sanguínea o linfática a otros órganos siguiendo un proceso crónico. Ver tablas 2 y 3 (Williamson y Nairn, 1980; Gillespie *et al.*, 1988; Schreuder *et al.*, 1990; Baird y Fontaine, 2007; Baird y Fontaine, 2008; Grant, 2007).

Ovinos				Caprinos	
Ayers	Mostaza	Real	Williamson	Zarzuelo	León
RF PR	ING	CERV ***	CERV	MAND	MAND ***
CERV	S-ILI	RF-PR ***	S-ILI	RF-PR	RF-PR ***
S-ILI	POPL	MAND ***	ILIA	CERV	CERV ***
ING		ING **	ING	ING	ING **
		S-ILI **		S-ILI	S-ILI **
		ISQ *		POPL	POPL *
		POPL *			

Tabla 2. Linfonodos afectados en la LC, presentados en orden decreciente de frecuencia en ovinos y caprinos. (León-Vizcaíno, *et al.*, 2002).

CERV= cervical superficial ING= inguinales superficiales ISQ= isquiático
 MAND= mandibular POPL= popliteo RF-PR=retrofaríngeo-parotideo
 S-ILI= subiliaco

A (Maddy, K.T.)		B (Real, F.)	
n.l.l. traqueobronquiales	89	I.c. cervical superficial	30.2
n.l.l. mediastínicos	81	I.c.c. retrofaringeo-parotídeo	23.8
Pulmones	76	n.l.l. mandibulares	21.7
L.C. cervical superficial	24	n.l.l. inguinales superficiales	11.4
L.C. subilíaco	15	I.c. subilíaco	9.9
n.l.l. inguinales superficiales	15	n.l. isquiático	2.8
Hígado	14	n.l. poplíteo	0.7
Herida de castración	12	n.l. tuberal	0.3
Riñones	8		
Bazo	5		
Músculo	4	n.l (nódulo linfático)	
L.C. poplíteo	4	n.l.l. (nódulos linfáticos)	
n.l.l. varios	2		
Encéfalo	<2		
Huesos	Ocasional		
Ojos	Ocasional		
	Ocasional		

Tabla 3. Frecuencias de localización de nódulos pseudotuberculosos, (representados en porcentajes) en dos tipos de indagaciones: inspección de canales en el matadero (columna A) y exploración clínica externa (columna B) (León-Vizcaíno, et al., 2002).

Aunque la LC ocurre tanto en ovinos como en caprinos existen diferencias en la distribución de linfonodos superficiales afectados, apariencia morfológica de las lesiones, y la frecuencia y severidad de la forma visceral. En **caprinos**, las heridas son causadas durante peleas que ocasionan traumatismos, punciones en la mucosa oral sufridas durante el ramoneo y lesiones sobre la piel, así como la ingestión e inhalación de la bacteria. Los abscesos internos causan los mayores problemas de salud, mientras que los abscesos externos son los más comunes, localizándose en linfonodos de la cabeza, región cervical y esternón. Para los **ovinos**, los factores de riesgo más importantes en la transmisión de la enfermedad son, la trasquila y la presencia de abscesos pulmonares supurantes que al secretarse por vías respiratorias contagian a otros animales (los abscesos pulmonares ocasionan que la respiración se vuelva más rápida y dificultosa). Los linfonodos más afectados en ésta especie son: el preescapular, precrural, poplíteo y mediastínicos. Tan pronto como la enfermedad avanza comienza a desarrollarse la emaciación progresiva, por lo que se asocia al “Síndrome de la Oveja Flaca” (Benham *et al.*, 1962; Richard *et al.*, 1979; Renshaw *et al.*, 1979; Gillespie *et al.*, 1988; Aldridge, 1995; Radostis *et al.*, 2001).

Diversos estudios sugieren que las lesiones pulmonares se desarrollan como parte de la infección sistémica iniciada en otra parte del cuerpo, esta última hipótesis es más aceptada en estudios que comprueban que después de la inoculación intravenosa la mayor proporción de lesiones internas se encuentra en pulmones o en linfonodos torácicos. En la enfermedad natural se ha observado que el patrón de distribución de las lesiones pulmonares coincide con la teoría de la diseminación hematogena o linfática más que con la transmisión por vía respiratoria. La inoculación subcutánea también mostró resultados en la formación de focos múltiples en pulmones y linfonodos mediastínicos. (Nairn y Robertson, 1974; Stoops *et al.*, 1984; Brodgen *et al.*, 1984; Ellis *et al.*, 1987; Paton *et al.*, 1988; Pepin *et al.*, 1994; Baird y Fontaine, 2007; Baird y Fontaine, 2008).

C. pseudotuberculosis posee una cubierta lipídica de superficie que es externa a la pared celular. Estos lípidos son tóxicos y se asocian con la virulencia del microorganismo protegiéndolo de la acción enzimática hidrolítica de los lisosomas, por lo tanto permite la persistencia del microorganismo dentro de las células. *C. pseudotuberculosis* también posee una potente exotoxina denominada fosfolipasa D (PLD), considerada como el principal factor de virulencia y es un factor de permeabilidad que promueve la hidrólisis de cadenas éster en esfingomielina en las membranas celulares de mamíferos contribuyendo a la diseminación de la bacteria del sitio de entrada a sitios secundarios dentro del hospedador. Aquí, el microorganismo continúa multiplicándose en las células hasta que éstas mueren liberando mucho más bacterias. Por otra parte, también provoca lesiones dermonecroticas, y en altas dosis es letal para diferentes especies de animales de laboratorio y animales domésticos. En los últimos años existe el reporte de un operon fagABC con 32-47% de identidad a las proteínas involucradas en los sistemas bacterianos de captación de hierro que contribuyen a la virulencia. Este operon está conformado por cuatro genes denominados: *fagA*, *fagB*, *fagC* y *fagD*, adyacentes al gen *pld* (Adamson *et al.*, 1985; Carne y Onon, 1978; Lipsky *et al.*, 1982; Egen *et al.*, 1989; Coyle y Lipsky, 1990; McNamara *et al.*, 1994; Songer, 1997; Hodgson *et al.*, 1999; Williamson, 2001; Billington *et al.*, 2002; Tambourgi *et al.*, 2002; Baird, 2003).

3. OBJETIVOS

1. Recopilar información de la inmunidad que se presenta contra la Linfadenitis Caseosa en ovinos y caprinos, a partir de publicaciones impresas y en medios electrónicos.
2. Presentar los datos relevantes de esta búsqueda de forma sintética que sirva de referencia para interesados en el tema.
3. Discutir en base a los artículos revisados el panorama actual de la Linfadenitis Caseosa.

4. METODOLOGÍA

En la elaboración de esta tesis se seleccionó la bibliografía adecuada a la temática con el apoyo de diversas fuentes como son: libros, revistas científicas, memorias y otros recursos como internet.

Posteriormente se revisó y se analizó dicha bibliografía para así recopilar la información pertinente a través de la elaboración de fichas bibliográficas con las cuales se procedió a organizarlas para la estructuración de esta investigación.

El paso siguiente consistió en la captura de datos, integrando elementos importantes para el enriquecimiento tanto de la tesis como del conocimiento personal y profesional.

5. FACTORES DE VIRULENCIA

5.1 Fosfolipasa D

La denominación fosfolipasa se emplea para describir un grupo variado de enzimas capaces de hidrolizar uno o más cadenas éster en glicofosfolípidos; las letras A-D se usan para distinguir entre fosfolipasas y para denotar la cadena éster del fosfolípido específico que está unido. Como parte de su arsenal invasivo, muchos microbios han desarrollado sus propias enzimas fosfolipasa, que pueden usarse para hidrolizar cadenas fosfato en los fosfolípidos de membranas. El resultado de esto es el daño o destrucción de las membranas de las células hospedadoras, que pueden llevar a su disfunción o disrupción, o ambas. Muchos géneros bacterianos se conocen por secretar enzimas fosfolipasas, y en algunos casos se ha mostrado que desempeñan un papel en la virulencia. La fosfolipasa D se identifica como una potente exotoxina en *C. pseudotuberculosis* y como un factor clave de virulencia en el desarrollo de la Linfadenitis Caseosa (Songer, 1997; Schmiel y Miller, 1999).

La fosfolipasa D en este microorganismo se caracterizó por primera vez en el año de 1940 por Carne, y desde entonces se ha descrito en cada aislamiento de *C. pseudotuberculosis* que se ha estudiado, incluyendo aislamientos de biotipos nitrato (+) y nitrato (-), y en todas las cepas conocidas de microorganismos recuperados de especies mamíferas infectadas. La controversia de que la PLD representa un factor de virulencia importante es apoyada por mucha evidencia experimental (Baird y Fontaine, 2007).

Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* en los que el gen *pld* que codifica la exotoxina se han eliminado del cromosoma o inactivado por mutación no son capaces de causar los abscesos clásicos de la LC en linfonodos en ovinos. Del mismo modo, la presencia de anticuerpos específicos para la PLD limita en gran medida el progreso de la enfermedad clínica (Hodgson *et al.*, 1992; McNamara *et al.*, 1994).

La fosfolipasa D es una proteína catiónica que se encuentra en el citoplasma y en la pared celular de *C. pseudotuberculosis* en pequeñas cantidades (Brown y Olander, 1987). La PLD se define como una fosfolipasa específica para la esfingomielina que cataliza la disociación de esfingomielina en fosfato de ceramida y colina (Bernheimer *et al.*, 1980; Pepin *et al.*, 1994a). El gen *pld* de *C. pseudotuberculosis* se ha clonado y secuenciado y su análisis reveló que el gen codifica una proteína de aproximadamente 31.4 kDa, precedida por una señal de secuencia secretoria de 2.7 kDa (Hodgson *et al.*, 1990).

El relativo gran tamaño de la molécula protéica ayuda a su purificación en el laboratorio y permite recolectar grandes cantidades. Se reportan muchas actividades biológicas para la PLD, las cuales incluyen dermonecrosis, letalidad, lisis sinérgica de eritrocitos en presencia de un factor extracelular de *Rhodococcus equi*, e inhibición de lisina estafilocócica que induce lisis de eritrocitos; las dos últimas actividades se emplean como pruebas de laboratorio para la identificación de *C. pseudotuberculosis* (Baird y Fontaine, 2007).

La PLD también interfiere con la quimiotaxis de neutrófilos ovinos, y es letal para las sus propias células (Yozwiak y Songer, 1993). En términos de importancia para la PLD como factor de virulencia, la actividad que ha sido foco de mayor interés es el aumento de la permeabilidad vascular en la membrana endotelial causada por la hidrólisis de la esfingomielina. El aumento de la permeabilidad vascular lleva a la extravasación de plasma de los vasos sanguíneos y en otros tejidos circundantes. Este efecto puede ayudar en la patogénesis favoreciendo el drenaje linfático de *C. pseudotuberculosis* en tejidos (Jolly, 1965; Carne y Onon, 1978; Batey, 1986).

La fosfolipasa D puede ayudar a la bacteria a diseminarse del sitio inicial de infección a otras partes del organismo por otros mecanismos. Se sabe que activa la vía complementaria del sistema inmune innato, por lo tanto, la disminución del complemento en la región circundante de la invasión bacteriana, protege a las bacterias de la opzonización. También puede ser posible que deteriore la actividad quimiotáctica de los neutrófilos y como consecuencia, disminuya la probabilidad de fagocitar al inicio de la infección (Yozwiak y Songer, 1993). Al respecto, este indicio está en discordancia con otras teorías de patogénesis que proponen que en los estados iniciales de la enfermedad, la bacteria parasita a las células fagocíticas y se multiplica dentro de ellas. En efecto, otros autores indican que la PLD puede jugar un papel en el escape de la bacteria dentro de los macrófagos. Es posible que este papel este relacionado a la acción de la PLD en la capa interna fosfolipídica de la membrana celular de los macrófagos, como ocurre en otras infecciones bacterianas (Titball, 1993).

Se conocen exotoxinas similares a la PLD de *C. pseudotuberculosis* porque son factores de virulencia importantes en otros patógenos bacterianos. Por ejemplo, existe 97 % de homología entre la exotoxina fosfolipasa D de *C. pseudotuberculosis* y la exotoxina activa de *Corynebacterium ulcerans*, causante de difteria en humanos. Otra exotoxina como la PLD también se considera un factor de virulencia importante en *Pseudomonas aeruginosa*. De la misma forma, el gen *pld* muestra homología con el gen *ymt* de *Yersinia pestis*, causante de la peste. La PLD también muestra similitud fascinante en la estructura y actividad biológica de una enzima tóxica producida por la araña *Loxosceles reclusa* (Baird y Fontaine, 2007). Esta toxina induce dermonecrosis, hemólisis, agregación plaquetaria, y en raras ocasiones, falla renal fatal (Lee y Lynch, 2005). De forma parecida, en el año de 1985, se demostró que crisis hemolíticas severas son el resultado de la inoculación de sobrenadantes de cultivo o de preparaciones de exotoxina cruda purificada de *C. pseudotuberculosis* en pequeños rumiantes (Hsu *et al.*, 1985).

Esta exotoxina es un factor de permeabilidad que promueve la hidrólisis de los enlaces éster en la esfingomielina de las membranas celulares de los mamíferos, posiblemente contribuyendo a la diseminación de la bacteria desde el sitio primario de infección a los sitios secundarios dentro del hospedador (Brodgen *et al.*, 1990; Alves *et al.*, 2006). Por otro lado, se observó el daño y destrucción de los macrófagos en caprinos durante la infección con *C. pseudotuberculosis*. Este efecto letal se debe a la acción de la PLD (Tashjian *et al.*, 1983).

Se reportó que el uso de una antitoxina previene la diseminación de *C. pseudotuberculosis* dentro del hospedador; sin embargo, esta no es capaz de prevenir el desarrollo de abscesos, mientras que estudios anteriores mencionan que la vacunación de caprinos con la exotoxina formalinizada (fosfolipasa D inactivada) también previene la diseminación de la bacteria, después del desafío experimental. En la actualidad se ha descubierto que las fosfolipasas D de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* y *A. haemolyticum* tienen un efecto biológico similar al veneno de la araña *Loxosceles intermedia* (Toxina P1). La esfingomielinasa de *C. pseudotuberculosis* puede causar hemólisis y falla renal en corderos, síntomas similares a los observados en humanos con loxoscelismo. De la misma forma se investigó si la hemólisis inducida por la PLD era dependiente de la activación del complemento demostrando que ambas toxinas inducen la hemólisis siendo dependientes del complemento. Mientras que la PLD solo induce la vía clásica de activación, la toxina P1 también indujo la vía alterna. Los investigadores sugirieron que el inicio de la activación de la vía clásica es consecuencia de la pérdida de simetría de la membrana de los eritrocitos causada por la acción de esfingomielinasa de las toxinas PLD y P1 respectivamente. Ver figura 3 (Brown *et al.*, 1986; Williamson, 2001; Tambourgi *et al.*, 2002).

5.2 Ácidos micólicos y Peptidoglicano

La pared celular contiene polisacáridos y lípidos. Los ácidos lipoteicoicos y el peptidoglicano interactúan con los macrófagos provocando la liberación de citocinas proinflamatorias. La concentración elevada de lípidos ayuda a que el microorganismo sobreviva a la fagocitosis y cause leucotoxicidad. La virulencia de una cepa en particular se relaciona con la cantidad de lípidos de su pared celular. *C. pseudotuberculosis* no produce una cápsula protectora pero tiene una cubierta de ácido micólico en la superficie de la pared celular. Esta cubierta tiene propiedades citotóxicas que desarrollan el papel principal en la patogenicidad de la LC. La inoculación subcutánea en ratones con ácido micólico extraído de *C. pseudotuberculosis* produjo inflamación localizada con congestión y un área de necrosis hemorrágica central, además, el ácido micólico induce cambios degenerativos y muerte en leucocitos fagocitarios. Sin embargo, a diferencia del efecto letal de la inoculación de moléculas extraídas de micobacterias, el efecto citotóxico del ácido micólico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* está confinado al sitio de infección (Carne *et al.*, 1956; Hard, 1972; Muckle y Gyles, 1983; Tashjian y Campbell, 1983; Pascual *et al.*, 1995).

Algunos autores sugieren que la cubierta de ácido micólico permite la sobrevivencia de la bacteria en el ambiente por largos períodos, una característica común para otros miembros de la familia de actinomicetos. *C. pseudotuberculosis* es muy resistente a las condiciones ambientales (West *et al.*, 2002). Las bajas temperaturas y fomites aumentan la sobrevivencia del microorganismo en descargas de pus, y las bacterias viables pueden recuperarse de superficies inanimadas por más de 55 días después de la contaminación (Augustine y Renshaw, 1986). Asimismo, se reportó que bajo condiciones de frío y humedad, el microorganismo permanece viable en granjas por 6 meses o más (Batey, 1986). La tierra experimentalmente contaminada con pus aún contiene bacterias viables por más de 8 meses. Además el ambiente puede permanecer infectado por un período significativo después de la contaminación (Brown y Olander, 1987).

En la infección natural, la cubierta lipídica de ácido micólico posiblemente le proporciona a la bacteria un mecanismo de protección contra las enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas. Esto a su vez permite a la bacteria sobrevivir a la fagocitosis y existir en el hospedador como parásito intracelular facultativo. Tal vez esta capacidad sea esencial para la migración bacteriana del sitio inicial de entrada al sitio eventual de la lesión desarrollada.

Además, la naturaleza tóxica del ácido micólico parece contribuir a la formación de abscesos. En infecciones artificiales de ratones, se demostró la existencia de una relación directa entre la cantidad del lípido producido en la pared celular por diferentes aislamientos de la bacteria y su capacidad para producir abscedación crónica. Resultados similares determinaron que existe una correlación positiva entre el contenido lipídico de la pared celular y la capacidad para producir lesiones en los nódulos linfáticos poplíteos de ovinos. Ver figura 3 (Burell, 1978; Muckle y Gyles, 1983; Williamson, 2001).

5.3 Fag A, fagB, FagC y fagD: obtención de hierro

La obtención de hierro es uno de los factores más importantes para la sobrevivencia bacteriana durante la infección en el ambiente del hospedador. En la mayoría de los organismos vivos, el hierro se asocia con moléculas pequeñas, proteínas o macromoléculas complejas. Los organismos eucariotes y procariotes han desenvuelto una multitud de sistemas biológicos complicados para obtener, transportar y almacenar esta molécula. La aparente redundancia en los sistemas de obtención de hierro refleja la ventaja selectiva de estrategias robustas y muy competitivas para obtener dicho elemento. De la misma forma, el metabolismo del hierro también es etiquetado como un mecanismo de defensa para prevenir el crecimiento de patógenos microbianos, por lo que muchas proteínas del hospedador son reguladas durante el proceso inflamatorio (transferrina, ferritina, hepcidina, ferroportina, lactoferrina y lipocalina). El mecanismo de obtención de hierro se ha descrito ampliamente para bacterias gram-negativas y gram-positivas, existiendo muchos artículos publicados sobre la base molecular de la obtención del hierro. Por ejemplo, diversos estudios en *Staphylococcus aureus* reportan algunos genes y rutas involucradas en la obtención del hierro, búsqueda para la presencia de sideróforos y sistemas de obtención de hierro que utilizan transportadores ABC de tres compuestos. Una característica común de la ocurrencia de genes que codifican transportadores de hierro, es su ubicación en las islas de patogenicidad (PAIs), donde hay evidencia de transferencia horizontal. Las PAIs, también se han descrito en microorganismos grampositivos tales como *Corynebacterium diphtheriae* y *S. pneumoniae*; *Corynebacterium diphtheriae* posee un gen denominado *IRPI* homólogo a un gen transportador ABC (*pia*) involucrado en la obtención de hierro en *S. pneumoniae*, ubicado dentro de una PAI. En el año 2005, se identificó una proteína DtxR que está involucrada en la regulación de obtención de hierro (principalmente en géneros de bacterias gram-positivas, como por ejemplo, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus*) y en la modulación de la expresión de sideróforos y otros compuestos en la ruta de adquisición de hierro Ver figura 3 (D'Afonseca *et al.*, 2008).

Sin embargo, para la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* se ha descrito un operón (fagABC) con un 32-47% de identidad a las proteínas involucradas en los sistemas de obtención de hierro, tales como los transportadores ABC que le confirieron a *Corynebacterium pseudotuberculosis* la persistencia en un modelo de infección caprino. En este operón, están presentes cuatro genes *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD*, localizados en la dirección 3' del gen *pld*. Un acercamiento adecuado para estudiar tales genes, fue la fusión del operón al gen *lacZ* para evaluar la expresión. Se observó que el operón se expresaba pobremente en un medio enriquecido con hierro, y en un medio limitado de este compuesto, se incrementó la expresión de la actividad de la β -galactosidasa hasta tres veces, sugiriendo que la expresión de este operón parece contribuir con la virulencia de la bacteria. Ver figura 3 (Billington *et al.*, 2002).

5.4 AroB y aroQ: biosíntesis de aminoácidos

Las dehidroquinasas son enzimas involucradas en la ruta biosintética para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Esta ruta se describió por primera vez en la bacteria *Escherichia coli*. Estas enzimas están formadas por tres subtipos expresados: una forma monofuncional, una bifuncional (encontrada en plantas), y una forma de dehidroquinasa, que es un polipéptido grande. En *Mycobacterium tuberculosis* se ha reportado la presencia de estas enzimas, que son esenciales para la biosíntesis de fenilalanina, tirosina, triptófano y otros compuestos aromáticos en bacterias y otros organismos como los hongos, algas y plantas, pero están ausentes en mamíferos. La ventaja de que no existan estas enzimas en mamíferos, es la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos. Muchos patógenos que se han atenuado por mutaciones en la ruta biosintética de aminoácidos (ej. *Salmonella ssp.* y otras especies). Una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* que carece de virulencia, gracias a la atenuación de los genes *aroB* y *aroQ* por intercambio alélico, es incapaz de causar la LC en modelos murinos surgiendo que podría emplearse como un vector de vacuna, existiendo la posibilidad de crear una vacuna atenuada para el control de la LC (Simmons *et al.*, 1998; D'Afonseca *et al.*, 2008).

5.5 Péptidos inmunodominantes

Al tratar de identificar antígenos presentes en la bacteria completa por diversos métodos de extracción y poder determinar si alguno de estos antígenos era reconocido por anticuerpos de animales infectados naturalmente, se observó que las bacterias completas sometidas a la extracción con éter revelaron más de 35 bandas en un gel argéntico, mientras que los cultivos filtrados concentrados con actividad de exotoxina mostraron más de 15 bandas. Los sueros de ovinos con la enfermedad adquirida se emplearon para examinar inmunoblots de bacterias electroforadas extraídas con éter y filtrados de cultivos, reconociendo veinte o más moléculas corinebacterianas con pesos moleculares de 20 a 112 kDa en las bacterias extraídas con éter que además presentaron títulos positivos a ELISA. Estos sueros también reconocieron más de seis moléculas con un rango de 20 a 68.1 kDa en los inmunoblots de filtrados de cultivos concentrados en sulfato de amonio. Finalmente no existió una relación aparente entre la fase de la enfermedad y la respuesta a antígenos corinebacterianos específicos en estos animales (Ellis *et al.*, 1991a).

En el mismo año, se estudió un inmunógeno compuesto de un filtrado de cultivo inoculándolo tres veces en ovinos con 250 µl en el día 0 y 100 µl en los días 21 y 35. La evaluación de inmunoblots indicó que los anticuerpos de los animales reconocieron un antígeno de 31.6 kDa. Además el suero de los ovinos reaccionó con proteínas de 25.1 y 68 kDa. Los inmunoblots de las bacterias extraídas con éter, que además reaccionaron con el suero del día 0 indicaron que cuatro animales reconocieron alrededor de 25 antígenos celulares bacterianos antes de la inmunización. Después de la vacunación con el filtrado de cultivo existió un aumento en la respuesta de anticuerpos, determinado por la intensidad de la reacción en los inmunoblots a por lo menos ocho antígenos, incluyendo moléculas de 12, 25.1, 31.6, 36.6, 39.8, 63.1, 70, 75 ó 79.4 kDa. El suero de estos ovinos alteró el crecimiento característico de las colonias de *C. pseudotuberculosis in vitro*. Estos resultados indicaron que la inmunización con preparaciones de antígeno soluble empleadas como toxoides inducen respuestas de anticuerpos a numerosos antígenos bacterianos además de la exotoxina, y también sugieren que los efectos antibacterianos mediados por anticuerpos podrían ser un componente importante en la protección de la enfermedad (Ellis *et al.*, 1991b).

En 1994, se identificó una proteína antigénica de 40 kDa de *C. pseudotuberculosis* mediante la aplicación de una estrategia que emplea localmente células secretoras de anticuerpos (ASC). Las sondas ASC (son los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de células secretoras de anticuerpos) obtenidas de linfonodos que drenan el sitio de infección, mostraron una especificidad restringida a un antígeno de 40 kDa. El análisis de inmunoblots con muestras de suero secuenciales tomadas de ovinos durante el curso de la infección primaria experimental con *C. pseudotuberculosis* también reveló que esta proteína era un antígeno inmunodominante. Para el ensayo de vacunación se emplearon 64 ovinos de seis meses de edad asignados a tres grupos; el grupo 1 recibió 100 µg de la preparación del antígeno de 40 kDa en hidróxido de aluminio, el grupo 2 recibió 5 µg de la misma preparación mientras que el grupo 3 recibió solamente un placebo de hidróxido de aluminio. A cada animal se le administró por vía subcutánea su dosis respectiva en dos ocasiones, en un intervalo de cuatro semanas. Tres semanas después de la segunda aplicación los animales se desafiaron con una suspensión de 2×10^6 bacterias y a los tres meses post desafío se realizó la necropsia. Los ovinos vacunados con dos dosis de 100 µg se protegieron de la infección, con un 82% de reducción en la proporción de ovinos infectados y un 98% en la reducción de lesiones pulmonares. Este nivel de protección se comparó favorablemente con los niveles de protección conseguidos en la actualidad con las vacunas comercialmente disponibles. La dosis más baja de la preparación (5 µg) no proporcionó un nivel significativo de protección en los animales infectados pero redujo significativamente la incidencia de lesiones pulmonares. Además, no existió una relación perceptible entre las lesiones pulmonares y los títulos de anticuerpos. Estos datos implican en gran medida a la inmunidad celular como el mecanismo primario de rechazo inmune a la infección. La protección significativa conseguida por la vacunación sugiere que el antígeno de 40 kDa desempeña el papel principal en la protección contra la LC. A la fecha, el único antígeno protector reconocido es la PLD que también es el principal determinante de virulencia (Walker *et al.*, 1994).

Más tarde, al clonar y secuenciar la proteína de 40 kDa encontraron que contenía un marco de lectura abierto (de las siglas en inglés open reading frame-ORF-) de 1,137 pb (pares de bases) codificando a una proteína de 379 aminoácidos. La carencia de homología con la base de datos de nucleótidos y proteínas confirma que la proteína de 40 kDa es una nueva proteína. La proteína recombinante de 40 kDa se sobreexpresó como una proteína de fusión para el 15% de proteínas celulares totales en *Escherichia coli*. El análisis bioquímico de proteínas naturales y recombinantes de 40 kDa reveló la actividad proteolítica asociada por medio de inhibidores específicos, y mostró ser un tipo de serinproteasa. Los investigadores denominaron a esta proteína “proteasa corinebacteariana 40” (CP40) (Wilson *et al.*, 1995).

Al utilizar una técnica sencilla y eficiente para purificar proteínas llamada TTP (de las siglas en inglés Three-Phase Partitioning), en donde se precipita la fracción proteica en la interfase por medio de la acción del sulfato de amonio y butanol (isómeros *n* y *t* butanol). En este estudio una extracción con TTP hecha con sulfato de amonio al 30% y con un pH inicial de 4.0 dió la mejor inmunoreactividad humoral y celular en cabras infectadas con LC. En particular, se descubrieron dos proteínas inmunogénicas secretadas de 16 y 125 kDa, las cuales no se habían identificado por otros métodos de extracción. Finalmente, para evaluar la influencia de pH, saturación de sulfato de amonio e isómeros de butanol sobre la actividad linfoproliferativa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por los antígenos extraídos con TPP, se encontró que el potencial linfoproliferativo de antígenos extraídos por dicha técnica fue enormemente aumentado y optimizado cuando se llevó a cabo en un pH ácido y una saturación de sulfato de amonio por encima del 15%. Por otra parte, en pH neutro la respuesta linfoproliferativa descendió con el incremento de la concentración de sulfato de amonio. En contraste, los resultados de inmunoblot, los cuales no mostraron diferencias entre los isómeros de butanol, la extracción con *n*-butanol dieron un antígeno mucho más inmunoreactivo que con *t*-butanol. Ver figura 3 (Paule *et al.*, 2004).

5.6 Genes de respuesta al choque térmico

Las proteínas de choque térmico (de las siglas en inglés HSPs), son de los grupos de proteínas mayormente conservadas entre los organismos. Inicialmente, las describieron por estar involucradas en el estrés térmico, pero en la actualidad se sabe que las HSPs participan en otros eventos, tales como, la depleción nutricional, la hipotaxia, la disrupción metabólica, infecciones virales, transformación, y otros procesos celulares. Las proteínas denominadas chaperonas, se encuentran en casi todos los organismos y se clasifican en seis familias: *Hsp10*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90* y *Hsp100*. Sin embargo, en procariotes, las HSPs mejor caracterizadas y descritas son: *hsp60* (*groEL*), *hsp70* (*dnaK*) y *hsp10* (*groES*), y en el género *Corynebacterium* dos genes parálogos de *hsp60* (D’Afonseca *et al.*, 2008).

El rol de las HSPs durante el estrés térmico involucra la prevención o inversión de la desnaturalización protéica inducida por el calor, y la agregación que puede ser letal para las bacterias. Por medio de un macroarreglo de ADN con el genoma de la cepa C231 de *C. pseudotuberculosis*, se identificaron ocho clones fuertemente regulados a 43°C, siete contenían secuencias con identidad a proteínas de choque térmico detectadas previamente en otras especies bacterianas. Los clones Q1-F11, Q4-E9, Q5-E10 y Q11-G7 contenían secuencias con identidad a *dnaK*, el clon Q16-G1 tenía una secuencia de identidad a *dnaJ* y Q12-C5 contenía secuencia de identidad con *hspR*, mientras que el clon Q7-C2 contenía una secuencia de identidad con *clpB*. Dos clones (Q3-B2 y Q2-G12) contenían una secuencia que codifica para *pld* y *fagC*, y dos clones más (Q4-A3, Q11-G1) codificaron para una *fas* (ácido graso sintasa). En gran medida *pld*, *fagC* y *fas* mostraron una expresión muy baja a 43°C. Los primeros ocho clones identificados, excepto uno, presentaron una expresión elevada y pertenecieron a la familia de genes de choque térmico. Los genes *dnaK*, *dnaJ* y *hspR* forman parte del operon *dnaK*. En otras especies bacterianas relacionadas, el gen *grpE* también se encontró en este operon, de tal manera que el orden es el siguiente: *dnaK*, *grpE*, *dnaJ* y *hspR*. A través de la secuencia en la región *dnaK-dnaJ* se pudo demostrar que *grpE* también se localizó entre estos genes en *C. pseudotuberculosis*. Los primeros tres genes del operon codificaron para proteínas con función de chaperona, mientras que *hspR* era una proteína reguladora. El cuarto gen de choque térmico identificado como *clpB* también tuvo función de chaperona (McKean *et al.*, 2007).

La FAS identificada en este estudio mostró identidad con la FAS-I, que es una enzima multidominio, la cual codifica todas las actividades requeridas para la biosíntesis de ácidos grasos. La mayoría de las bacterias presentan al menos una de estas enzimas, y es probable que debido a la compleja estructura de la pared celular de *C. pseudotuberculosis* requiera de esta enzima para modular la composición de la membrana en respuesta a la temperatura, permitiendo mantener la fluidez de la membrana y las actividades bioquímicas de la bicapa, por lo que es factible que el cambio observado en la expresión genética de *fas* en *C. pseudotuberculosis* ocurra para mediar este tipo de respuesta. Esta enzima identificada muestra mayor identidad con FasB que con FasA (71% de indentidad contra 54% de identidad). A la fecha, se desconoce si *C. pseudotuberculosis* contiene más de una enzima FAS. Adicionalmente, la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos demuestra que esta decrece en respuesta a una tasa reducida de crecimiento celular, presumiblemente como un mecanismo que garantiza la producción de una cantidad apropiada de ácidos grasos. Dado que la tasa de crecimiento de *C. pseudotuberculosis* se reduce a 43°C (comparada en los 37°C), la expresión reducida de *fas* también podría relacionarse con la tasa de crecimiento (McKean *et al.*, 2007).

Coelho, K. S, Miyoshi, A., y Azevedo, V., caracterizaron y aislaron por primera vez a los genes *hsp10* y *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Se sabe que la mayoría de las HSPs son capaces de originar una respuesta humoral y celular, y por lo tanto, tienen propiedades inmunogénicas. En base a esta información, el mismo grupo de investigadores probó una vacuna ADN con *hsp60* y una proteína recombinante de una vacuna de subunidad en desafíos con ratones obteniendo una producción significativa de IgG (D'Afonseca *et al.* 2008).

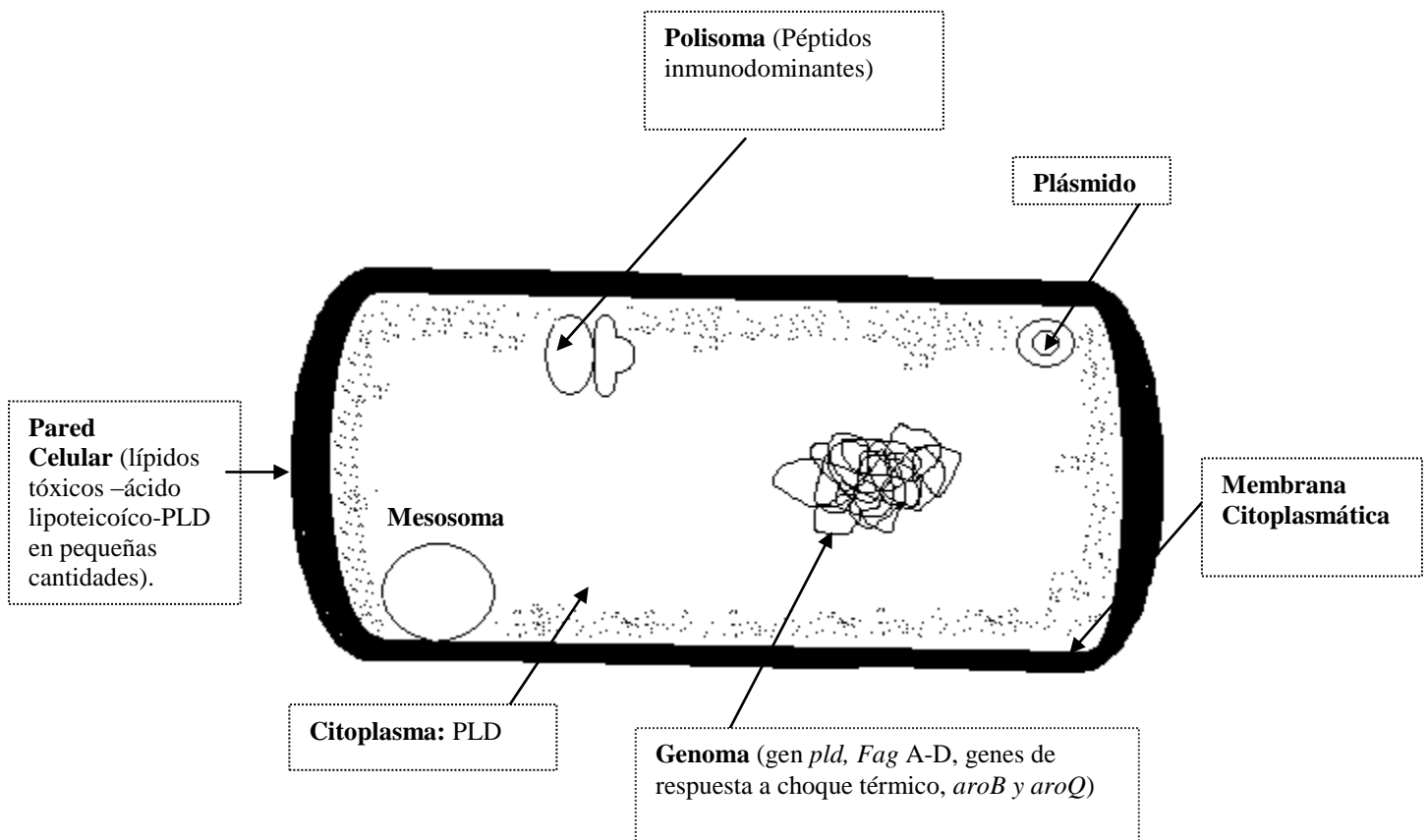


Figura 3. Factores de Virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

6. MECANISMOS INESPECÍFICOS DE DEFENSA

Para el caso de LC no existe raza alguna de cabras u ovejas que se muestre refractaria al padecimiento de esta en cualquiera de sus formas clínicas pero si resulta evidente que algunas razas parecen ser más susceptibles a sufrirla. En parte, existe un factor constitucional de base genética ligado a la raza, la reducción del grosor de la piel, que se acompaña de una particular calidad del tejido conectivo y finura de la dermis (Richard *et al.*, 1979; Quinn *et al.*, 2002b; Urquiza, 2007). Los factores de aparente predisposición racial para LC son causalmente confusos, ya que su intervención predisponente estriba en la utilización zootécnica que de la raza en cuestión se hace. Tal es el caso de la predisposición de las razas lecheras a padecer con mayor prevalencia mastitis pseudotuberculosa que las razas de aptitud cárnica o bien las razas de ovejas productoras de lana están más propensas a LC por heridas causadas durante la trasquila. Mientras que la LC resulta esporádica en el ganado caprino extensivo en las explotaciones intensivas la prevalencia es elevada. Se atribuye esta predisposición a la supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en los locales, suelos, pasillos y utensilios (Schreuder *et al.*, 1986).

El plasma de los animales contiene un grupo de aproximadamente 30 proteínas, colectivamente referidas como sistema del complemento, el cual desarrolla un papel importante en la inmunidad no específica y amplifica las reacciones inmunes específicas. Existen dos vías diferentes para la activación del sistema del complemento denominadas vía clásica y vía alterna. La vía clásica se activa por un complejo inmune como una molécula de IgM o dos moléculas de IgG unidas a una célula blanco, mientras que la vía alterna se activa directamente por superficies celulares de las bacterias, componentes de agentes infecciosos como los lipopolisacáridos, paredes celulares de levaduras, y algunos virus o células infectadas por virus. Este método de activación del complemento es de importancia primordial en las respuestas inmunes no específicas. El papel central del complemento en las reacciones inflamatorias relaciona a la diversidad de reacciones inmunes en que los componentes del complemento y sus fragmentos participan. La formación de complejos de ataque en membranas sobre las células blanco es efectiva para lisar muchas de las bacterias Gram-negativas. La mayoría de las células Gram-positivas son resistentes a los efectos líticos del complemento, probablemente como consecuencia de su gruesa capa de peptidoglucanos que previenen el acceso de C5b-9 a la membrana interna (Quinn, *et al.*, 2002b; Playfair, 1992; Gershwin *et al.*, 1995). Al llevar a cabo un estudio para investigar el papel del receptor del complemento tipo 3 (CR3) en la defensa del hospedador contra las infecciones primaria y secundaria de *C. pseudotuberculosis* en ratones, los animales tratados con 5C6, un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CR3 produjo la multiplicación de la bacteria sin restricción en los órganos e incrementó dramáticamente la mortalidad de los ratones infectados. El examen histológico evidenció inflamación, degeneración y necrosis de órganos, y reveló que el efecto de infección reforzado de 5C6 se asociaba con el fracaso de los ratones para dirigir a los fagocitos mononucleares hacia sitios de multiplicación bacteriana. Estos resultados sugieren que CR3 desempeña un papel importante en la defensa del hospedador contra la infección primaria y secundaria causadas por *C. pseudotuberculosis* (Lan, *et al.*, 1999a, Lan, *et al.*, 1999b).

Diversos estudios realizados en ovinos demostraron que la infección experimental causada por *C. pseudotuberculosis*, especialmente se asocia con un aumento transitorio de la temperatura corporal, inflamación localizada y formación de abscesos en el sitio de la infección inicial antes de localizarse en linfonodos (Pepin *et al.*, 1991a; Pepin *et al.*, 1994).

Los fagocitos son células que están adaptadas específicamente para ingerir y destruir bacterias u otras partículas extrañas. Mientras que los monocitos-macrófagos pueden vivir por semanas. Los neutrófilos, durante su tiempo de vida de solo unos días son capaces de responder rápidamente contra los microorganismos invasores, especialmente bacterias. Los neutrófilos que están en proceso de muerte liberan elastasa y colagenasa y de este modo generan factores quimiotácticos de monocitos. De tal manera que los neutrófilos alcanzan y atacan el material extraño primero, y al morir, atraen a los macrófagos hacia el sitio invadido. Los macrófagos son atraídos por productos bacterianos y por productos de la activación del complemento, como C5b; también son atraídos por moléculas liberadas en tejidos y células dañadas. Los monocitos-macrófagos responden lentamente a la invasión bacteriana, pero éstos están mejor equipados para atrapar y destruir patógenos invasores, sobre todo aquellos microorganismos que pueden multiplicarse intracelularmente. Los monocitos-macrófagos, además de fagocitar y presentar antígenos a células T para iniciar una respuesta inmune, liberan citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, el Factor de Necrosis Tumoral-TNF- e interferones-IFN's-), proteínas que producen fiebre y estimulan al sistema inmune. Cuando los monocitos se desplazan hacia los tejidos inflamados sintetizan cantidades crecientes de enzimas lisosómicas, se promueve la actividad fagocitaria, aumenta la expresión de receptores de anticuerpos, complemento y transferrina, y se incrementa la secreción de proteasa neutra. Estas células se denominan macrófagos inflamatorios. Los macrófagos inflamatorios pueden ser estimulados todavía más, principalmente para que se conviertan en macrófagos activados, lo cual sucederá con la exposición a productos bacterianos y proteínas que se denominan interferones. Estos **macrófagos activados** tienen una mayor capacidad de ingerir y eliminar bacterias. Los macrófagos llevan un gran número de receptores en su superficie. Su expresión se intensifica por la activación del macrófago con el interferon gamma (IFN- γ) (Salyers y Whitt, 1994; Tizard, 2009; Quinn *et al.*, 2002b).

El conocimiento referente a los mecanismos por los que LC se establece, se basan en estudios experimentales. Se ha podido demostrar que la infección experimental en ovinos se asocia con el aumento transitorio de temperatura, inflamación localizada y formación de abscesos en el sitio de infección, y es probable que la bacteria se replique extracelularmente en el sitio de infección antes de localizarse en linfonodos. La infección inicia a través de una herida que posteriormente muestra inflamación local en el sitio de entrada de *C. pseudotuberculosis*. Al inocular ovinos con 2×10^8 corinebacterias viables por vía subcutánea se encontraron las siguientes características en las lesiones primarias. En el día 1 postinfección (PI), se observó en la cápsula, seno subcapsular y área cortical del linfonodo parotídeo una infiltración masiva de polimorfonucleares, en su mayoría neutrófilos. La infiltración fue más intensa en las áreas media y cortical del linfonodo en comparación con los polos y la médula del linfonodo. Este cambio dramático de PMNs hacia linfonodos infectados coincidió con una granulocitosis sanguínea periférica significativa observada en el día 1 PI. Para el día 3 PI, los PMNs aun estaban presentes pero en menor número y se encontraban diseminados en todo el linfonodo. Los microabscesos se

agrandaron y se volvieron confluentes con un inicio de necrosis central. Para este momento se observaba una población de histiocitos (macrófagos) sobre todo en sinusoides de los linfonodos. Para el día 6 PI, las lesiones se agrandaron, y comenzaba a ser evidente la infiltración de células mononucleares en las lesiones que llevaron a la transformación de los microabscesos a los típicos granulomas. La necrosis central se rodeó por un borde de células epiteloideas. Esta transformación se asoció a piogranulomas con una desaparición correlativa de PMNs e hiperplasia linfoide. (Pepin *et al.*, 1991b).

La capacidad de los neutrófilos para permanecer viables por más de 10 h después de exponerlos a la PLD indicó que esta puede no ser un agente leucotóxico para neutrófilos *in vivo*. Después de 10 h se esperaba que los neutrófilos emplearan sus capacidades funcionales primarias en respuesta a la infección. La muerte de los neutrófilos después de este tiempo podría ser menos importante, a excepción de cómo se relaciona para liberar agentes quimiotácticos o enzimas hidrolíticas que dañan el tejido. Los resultados de este experimento proporcionan un mejor entendimiento de los efectos potenciales de la PLD sobre la función de los neutrófilos ovinos y sugieren posibles funciones para estos efectos. La PLD puede influenciar en la viabilidad y función de los neutrófilos y estos efectos pueden relacionarse a los eventos que ocurren *in vivo*. En apariencia, existe un balance dinámico entre la capacidad del hospedador para eliminar a la bacteria y la capacidad de la bacteria para utilizar la respuesta no específica del hospedador y así facilitar su sobrevivencia y diseminación en el tejido (Yozwiak y Songer 1993).

En un estudio con corderos se caracterizaron macrófagos *in situ* presentes en piogranulomas inducidos experimentalmente con *C. pseudotuberculosis*. Se produjeron tres anticuerpos monoclonales (mAb) en ratones BALB/c con macrófagos alveolares de ovinos saludables. Su reactividad no solo se probó en macrófagos encontrados en los piogranulomas, sino también en porciones de varios órganos en condiciones estables. Un mAb, denominado OM1, reconoció monocitos y a la mayoría de las células del sistema fagocítico mononuclear en órganos linfoides y no linfoides. Otros dos mAb, OM2 y OM3, reaccionaron con una subpoblación de macrófagos alveolares y con otros tipos celulares en tejidos, en particular con células endoteliales para el mAb OM2. En las porciones de piogranulomas experimentales que se desarrollaron en linfonodos de drenaje en los sitios donde se inoculó *C. pseudotuberculosis*, el mAb OM1 reaccionó con todos los macrófagos distribuidos en empalizada alrededor del centro necrótico de la lesión a partir del día 6 al 28 PI. Los mAb, OM2 y OM3, fueron capaces de distinguir dos tipos de granulomas: un tipo se caracterizó por una gran cantidad de células epiteloideas teñidas para OM2; y el otro tipo se caracterizó por pocos macrófagos positivos a OM2, mientras que las células positivas a OM3 fueron más numerosas. Estos resultados muestran que los macrófagos son células predominantes en piogranulomas y sugieren dos patrones histológicos diferentes en la evolución de los piogranulomas inducidos por *C. pseudotuberculosis*, de acuerdo al estado inmunológico del hospedador (Pepin *et al.*, 1992).

6.1 Proteínas sanguíneas: (IFN) gama, activación del complemento, proteínas de fase aguda, TNF alfa, interleucinas (IL's)

Las citocinas son como las hormonas del sistema inmune que controlan y determinan la naturaleza de la respuesta inmune. Las interleucinas básicamente efectúan la actividad funcional de los linfocitos involucrados en las respuestas específicas mediadas por anticuerpos y células. Los factores estimuladores de colonias que regulan la maduración de células precursoras de macrófagos, granulocitos, mastocitos y linfocitos se relacionan con la respuesta innata contra varios patógenos (Radford *et al.*, 1991).

Los interferones (IFN) son moléculas producidas por diferentes tipos celulares después de una infección viral. Existen dos tipos de interferones; el tipo I puede ser α ó β e inducen la producción de proteínas antivirales (quininas). El IFN- α es producido por monocitos, mientras que el IFN- β es producido por fibroblastos. Otros efectos del IFN tipo I son la inhibición de la proliferación celular, el aumento de células NK (natural killer), lisis celular, y la modulación del MHC clase I por incremento y decremento de la expresión Clase II. El IFN- γ tipo II, es producido por linfocitos T cooperadores después de la estimulación por un antígeno (no necesariamente un antígeno viral), el IFN- γ es una citocina con diversos efectos, entre los que se incluye la activación de macrófagos. El Factor de Necrosis Tumoral (TNF, de las siglas en inglés Tumor Necrosis Factor) es producido por macrófagos después de ser estimulados por lipopolisacáridos bacterianos. Otras fuentes secretoras incluyen células T activadas, células NK y mastocitos. La unión del TNF a receptores de superficie provoca efectos como la activación de neutrófilos, estimulación de macrófagos, incremento de la adhesión de leucocitos e incremento de la expresión del MHC Clase I. También puede causar la inducción de fiebre, síntesis de proteínas de la fase aguda, y activación del sistema de coagulación (Gershwin *et al.*, 1995).

Uno de los parámetros funcionales clave que determinan el resultado de las respuestas inmunes para los agentes infecciosos es la naturaleza de las citocinas producidas localmente por las células del sistema inmune. La organización y caracterización de las células en el piogranuloma resaltan la importancia de los mediadores liberados por linfocitos T específicos y macrófagos estimulados (Pepin *et al.*, 1997). Una investigación en ovinos midió la expresión de citocinas en linfonodos y los sitios de inoculación en los animales inoculados con dos cepas atenuadas y una cepa de campo, y observaron que las citocinas proinflamatorias IL-1 β y el TNF- α se expresaron en niveles elevados en el sitio de inoculación mientras que la expresión de linfocinas asociadas a células T (IL-2 e IL-4) fue mayor en linfonodos poplíteos que en el sitio de inoculación. Por otro lado, los niveles de expresión genética para el TNF- α , la IL-2, y el IFN- γ fueron más elevados en el día 7 PI (este período de tiempo corresponde a una “fase de amplificación” en la formación de piogranulomas) que en el día 28 PI (“fase de estabilización” en la formación de piogranulomas), mientras que la IL-6 y la IL-1 β fueron más elevadas en el día 28 PI.

Debido a que la expresión de células T y citocinas asociadas fue mayor en el sitio de inoculación y en linfonodos poplíteos se puede plantear un importante proceso inflamatorio en la primera semana de la fase de estabilización (día 28 PI). Esto puede correlacionarse con el proceso de formación de piogranulomas después de la infección experimental con *C. pseudotuberculosis*, tiempo en el que es posible distinguir tres fases: la primera (1-4 días) es el proceso de iniciación, caracterizado por la llegada de neutrófilos al sitio de inoculación y a linfonodos. La segunda fase de amplificación (5-10 días) se caracteriza por el desarrollo inicial de piogranulomas donde destacan los macrófagos y linfocitos. La tercera, denominada fase de estabilización se caracteriza por la maduración y persistencia del piogranuloma (Guilloteau *et al.*, 1990; Pepin *et al.*, 1991a, Pepin *et al.*, 1991b, Pepin *et al.*, 1992, Pepin y Hodgson, 1994, Pepin *et al.*, 1994). Estas fases patogénicas concuerdan en que las citocinas proinflamatorias están involucradas en la primera fase, mientras que las citocinas asociadas a células T se involucran más en el proceso infeccioso tardío en linfonodos de drenaje. Aunque este estudio no permitió determinar el tipo de células que producen estas citocinas, es probable que los macrófagos y linfocitos distribuidos en dos estratos alrededor del área de necrosis central, sean la fuente principal de citocinas (Pepin *et al.*, 1997).

El papel del IFN- γ en la resistencia del hospedador a *C. pseudotuberculosis* también se examinó en ratones knockout* que carecían del receptor para el IFN- γ (IFN- γ R^{-/-}), pudiendo indicar un papel importante de esta citocina para controlar la infección primaria (Simmons *et al.*, 1998).

En la exposición del hospedador a infecciones bacterianas el TNF- α y el IFN- γ desarrollan papeles tanto benéficos como perjudiciales. De acuerdo a otros estudios, estas citocinas juegan un papel protector en la resistencia del hospedador contra el crecimiento de patógenos facultativos intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, (BCG) *Mycobacterium bovis*, *Salmonella typhimurium* y *Rhodococcus equi* (Lan *et al.*, 1998).

El IFN- γ es una molécula importante para activar macrófagos que se involucra en la defensa innata contra micobacterias patogénicas. Muchos mecanismos inmunes, como la presentación de antígenos, las interacciones de células endoteliales con leucocitos, crecimiento celular y apoptosis, intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, así como la fusión del fagosoma con el lisosoma pueden modularse a través de la actividad de esta molécula. Sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados para tales modulaciones (Houben *et al.*, 2006).

Se ha reportado que los linfocitos T y los macrófagos desarrollan un papel importante en la defensa del hospedador contra *C. pseudotuberculosis*. Aunque, el TNF- α y el IFN- γ son citocinas secretadas principalmente por macrófagos y células T respectivamente, se presume que estas citocinas pueden estar involucradas en la defensa del hospedador contra *C. pseudotuberculosis*. Los resultados de un estudio en ratones comprobaron que ambas citocinas son producidas endógenamente después de la infección con la bacteria y que sus títulos alcanzaron el máximo a los 4 días postinfección y posteriormente disminuyeron. TNF- α endógeno se pudo detectar en los bazos de ratones, mientras que por la sangre nunca

se pudo detectar en ninguna fase de la infección, lo que hace suponer que TNF- α se produce localmente en sitios donde prolifera *C. pseudotuberculosis*.

De acuerdo con estudios previos que reportan que el TNF- α es producido localmente en piogranulomas pulmonares inducidos experimentalmente o adquiridos naturalmente, y que el TNF- α tuvo mayor aumento en el sitio de inoculación que en linfonodos poplíteos de ovinos (Lan *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1995; Pepin *et al.*, 1997). Se demostró que el TNF- α e el IFN- γ producidos en la infección aguda juegan un papel importante en la resistencia del hospedador contra *C. pseudotuberculosis*, aunque la administración de anticuerpos monoclonales anti-TNF- α y anti-IFN- γ incrementaron el crecimiento bacteriano en órganos y la mortalidad en ratones. También se encontró que la administración de mAb anti-TNF- α y anti-IFN- γ en el día 0 ó en el día 4 de la infección produjo un decremento en la inducción de resistencia anticorinebacteriana, pero no hubo decremento cuando los mAb se inyectaron después de esto. El rol de ambas citocinas también se pudo demostrar por resultados obtenidos en la examinación histológica, ya que en el día 4 después de la infección, los ratones tratados con mAb anti-TNF- α ó anti-IFN- γ pudieron exhibir microabscesos en órganos foliculares y una inflamación folicular severa, además de la destrucción de linfocitos. Los tratados con anti-TNF- α también mostraron abscesos encapsulados. Tradicionalmente se asume que las células T CD4, y más específicamente la subpoblación Th1, están involucradas en la resistencia adquirida contra bacterias intracelulares, y que incrementan la actividad bactericida de macrófagos al producir IFN- γ , mientras que el papel de las células T CD8 en la resistencia a bacterias intracelulares se relaciona con su capacidad para producir el IFN- γ o lisar células infectadas. Los resultados en este estudio mostraron que la administración de mAb anti-CD4 ó anti-CD8 aumentan significativamente la mortalidad y reducen marcadamente la producción de IFN- γ , sugiriendo que ambas subpoblaciones de células T son responsables de la resistencia a *C. pseudotuberculosis* secretando el IFN- γ endógeno. Otro mecanismo posible por el que las células T CD8 podrían ejercer un efecto anticorinebacteriano es mediante los linfocitos citotóxicos con lo que puede concluirse que tanto el TNF- α como el IFN- γ desempeñan un papel esencial en la defensa contra *C. pseudotuberculosis* y que estas citocinas pueden actuar aditivamente aunque su modo exacto de acción contra la bacteria permanece sin estudiarse (Lan *et al.*, 1998).

Hasta el momento, el papel de estas citocinas durante la infección secundaria no se ha podido establecer, por lo tanto se investigó el papel de el TNF- α y el IFN- γ en la inmunidad protectora durante la infección secundaria causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* observando que el 50% de los ratones infectados dos semanas antes pudieron sobrevivir a la inoculación letal sugiriendo que después de la infección primaria la resistencia adquirida a la bacteria se desarrolla dos semanas después de la infección primaria y puede conservarse por 6 semanas más. Por otro lado, al cultivar células esplénicas dos a ocho semanas después de la infección primaria se produjo una cantidad significativa del TNF- α y del IFN- γ cuando las células se estimularon con la bacteria formalinizada suponiendo que el establecimiento de la resistencia del hospedador inducida por la infección primaria se correlaciona con la producción de estas citocinas. Es probable que las respuestas celulares induzcan la producción de citocinas y que esto ocurriría de una manera rápida e intensiva en la infección secundaria.

De hecho, se pudieron detectar actividades significativas del TNF- α y del IFN- γ en ratones inmunizados poco después del desafío secundario con *C. pseudotuberculosis*. Ambas citocinas aparecieron en ratones a las tres horas, y alcanzaron su máximo a las 24 h. El tratamiento con mAb anti-TNF- α y anti-IFN- γ aumentó la mortalidad y crecimiento bacteriano en los órganos de ratones, por lo que podría pensarse que el TNF- α y el IFN- γ endógenos producidos en ratones durante la infección secundaria son importantes en la resistencia del hospedador a la infección secundaria (Lan *et al.*, 1999a).

La administración del mAb anti-CD4+ incrementó significativamente la mortalidad, así como la proliferación bacteriana, por otro lado, redujo marcadamente la producción del TNF- α y del IFN- γ . Estos resultados sugieren que las células CD4 están involucradas en la resistencia adquirida a la infección secundaria causada por *C. pseudotuberculosis*. Por esta razón se puede asumir un rol crítico para la eliminación de la bacteria. En contraste, al efecto del mAb anti-CD4, el mAb anti-CD8 no aumentó la mortalidad y no mostró un efecto significativo en la eliminación de la bacteria de los órganos o en la producción de citocinas. Finalmente los resultados de este estudio revelaron que el TNF- α y el IFN- γ se producen rápidamente después de la infección secundaria, así como en células esplénicas de ratones infectados una vez que se da la estimulación con *C. pseudotuberculosis* muerta, indicando que las células Th1 son importantes en la respuesta del hospedador contra la infección secundaria (Lan *et al.*, 1999a).

Corynebacterium pseudotuberculosis es una causa común de piogranulomas en pulmones de ovinos y que frecuentemente ocurre en dualidad con el virus de la familia Retroviridae, género lentivirus, que ocasiona la enfermedad conocida como Maedi-Visna (caracterizada por encefalitis y neumonía crónica en ovinos). Más tarde esta coinfección ocasiona neumonía crónica y caquexia (muy similar al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida-SIDA-en humanos). El TNF es producido localmente en piogranulomas pulmonares causados por *C. pseudotuberculosis* tanto en la enfermedad natural como en la experimental. Producido *in situ*, el TNF puede actuar de manera autocrina para amplificar la formación de la lesión, modular el crecimiento bacteriano, y en el caso de una infección causada por dos microorganismos, disminuir la expresión de lentivirus. Además, la liberación sistémica de esta monocina de los sitios donde se produce localmente puede ser central a la patofisiología de la caquexia, que es característica del “síndrome de la oveja flaca” (Ellis *et al.*, 1995).

Un trabajo realizado en dos grupos de caprinos, uno con la enfermedad adquirida (GA) y el otro grupo sano (GS) reveló la producción de IFN- γ en cultivos de sangre de cabras infectadas estimuladas con antígeno secretado o antígeno somático de *C. pseudotuberculosis*, ambos con las siguientes concentraciones: 10, 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$ con el fin de evaluar la respuesta celular. También se adicionó el mitógeno PWM en la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. Los antígenos se emplearon solos o incluyendo al mitógeno. El antígeno secretado indujo mayor producción de IFN- γ que el antígeno somático, en todas las concentraciones empleadas para ambos grupos. Los animales infectados respondieron mucho más a la producción de IFN- γ que los animales sanos cuando se estimularon con el antígeno secretado en las concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$; no se observaron diferencias con la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. El antígeno somático indujo baja producción de IFN- γ en ambos grupos en las concentraciones probadas; las células de animales infectados con 50

µg/ml de antígeno somático no presentaron el IFN-γ. El uso de PWM indujo la producción de IFN-γ en ambos grupos, sin embargo, el uso concomitante de cada uno de los antígenos con el mitógeno mostraron diferencias significativas. Cuando se probó la asociación del antígeno somático a la concentración de 25 µg/ml y PWM no hubo alteración significativa en la producción del IFN-γ inducida solo por PWM. No obstante, cuando el antígeno secretado se empleó con PWM, la producción de IFN-γ incrementó significativamente en los grupos GA y GS. El antígeno somático indujo solamente una baja producción de IFN-γ en ambos grupos, mientras que el antígeno secretado fue un mejor inductor con las células de animales infectados. La diferencia entre los resultados obtenidos cuando los antígenos y el mitógeno PWM se emplearon simultáneamente, revelaron diferentes patrones de sensibilidad inmune con este mitógeno. La producción de antígeno somático indujo escasa producción de IFN-γ en animales infectados y saludables. El antígeno secretado indujo una elevada producción de IFN-γ en los animales infectados pero indujo baja producción de esta citocina en los animales no infectados. Existe una diferencia distintiva en los dos antígenos cuando se compara su interacción con PWM aunque el antígeno somático no incrementó la producción de IFN-γ mientras que el antígeno secretado actuó sinérgicamente con PWM, aumentando significativamente la producción de IFN-γ inducida por PWM únicamente (Meyer *et al*, 2005).

Las proteínas de la fase aguda (APP) son un grupo de proteínas séricas producidas y liberadas por el hígado después de la estimulación por citocinas proinflamatorias como TNF-α, la IL-1β e IL-6. En rumiantes, se sabe que la haptoglobulina (Hp) y el amiloide sérico A (SAA) son las proteínas principales de la fase aguda y que pueden aumentar hasta 1, 000 veces cuando hay estimulación, mientras que la glicoproteína ácida α1 (AGP) una proteína moderada de la fase aguda que puede incrementarse varias veces al compararla con su concentración normal en plasma. Aunque son llamadas “proteínas de fase aguda” su presencia en la circulación puede persistir más allá del período post-infección, y aunque las lesiones patológicas se vuelvan crónicas, el patrón de respuesta puede variar. Las proteínas de fase aguda son esenciales para la respuesta inmune no específica y pueden ser un marcador cuantitativo valioso del nivel de patogénesis en estudios experimentales de enfermedad, y también pueden ser útiles como biomarcadores de la infección natural (Tizard, 2009).

En un modelo experimental de la LC en ovinos infectados, se evaluó la respuesta de SAA y AGP en relación con Hp, obteniendo los siguientes resultados: el promedio de la concentración de Hp en suero aumentó significativamente (1.65 ± 0.21 g/L) a los siete días postinfección; el promedio de la concentración del SAA en suero aumentó significativamente (18.1 ± 5.2 mg/L), y para el día quince postinfección disminuyó a 2.6 ± 1.0 mg/L. Para la AGP, la concentración media en suero mostró un aumento significativo en el día siete postinfección, en contraste con HP y SAA, y fue mostrando un incremento gradual de la concentración a los trece días postinfección (0.38 ± 0.05 g/L). Esta investigación confirmó que ocurrió una respuesta de APP en ovinos infectados experimentalmente con *C. pseudotuberculosis*, y amplía la demostración en un reporte previo de un incremento en la concentración de Hp en suero de animales con la LC (Pepin *et al.*, 1991). Cabe destacar que hubo una reacción de SAA y una producción continua de AGP durante la transición a estados crónicos de la infección (nuevas observaciones) (Eckersall *et al.*, 2007).

Dichas observaciones mantienen la evidencia de que el aumento de AGP podría ser un biomarcador para la condición crónica de la LC en ovinos, ya que la respuesta de AGP apareció en la última fase de la enfermedad, mientras que la respuesta de Hp y SAA descendieron más rápido (Eckersall *et al.*, 2007).

Por otro lado, el papel de los polimorfonucleares (PMN) en la resistencia innata o adquirida ha recibido nueva atención y se ha propuesto que la acumulación de células inflamatorias de la primera fase podría ser un paso crítico que influye en el resultado de la infección por bacterias intracelulares facultativas (Campbell, 1986; Campbell, 1990).

En un estudio se observó la acumulación de PMN durante el desarrollo de piogranulomas inducidos experimentalmente por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en nueve corderos por medio de la técnica conocida como escintigrafía. Los PMN autólogos sanguíneos se marcaron con tecnecio 99m ó indio 111 y se reinocularon por vía intravenosa en los corderos infectados. Se monitorearon las propiedades funcionales de las células marcadas: 1) *In vitro*, midiendo su actividad fagocítica y bactericida contra *C. pseudotuberculosis*, y su quimiotaxis bajo agarosa y, 2) *In vivo*, siguiendo por escintigrafía su capacidad para acumularse en un foco inflamatorio inducido por la inoculación intradérmica de bolitas de látex cubiertas con el lipopolisacárido de *Salmonella abortus equi*. Después de la inoculación de corinebacterias se localizaron focos radioactivos en el sitio de inoculación y en linfonodos que drenan esta parte durante los 4 días PI. El examen histopatológico realizado a las 32 h post inoculación confirmó la acumulación intensa de PMN en estos sitios, excepto en un animal que presentó focos visibles en el cuello a los 14 días PI, no se observó ningún foco radioactivo en las fases tardías de la infección experimental, a pesar de la presencia de múltiples piogranulomas que se confirmaron por el análisis bacteriológico después de la necropsia de los corderos. La evaluación histopatológica de estas lesiones reveló estratos de fibroblastos, linfocitos y macrófagos alrededor del centro necrótico. Los resultados de estos estudios sugieren que la contribución de PMN durante la fase crónica de la inflamación es reducida en comparación con la fase inflamatoria aguda de los procesos infecciosos (Guilloteau *et al.* 1990).

6.2 Monocitos y Macrófagos

La protección contra bacterias intracelulares esta mediada por células. Aunque los macrófagos de animales no inmunizados por lo general no son capaces de destruir estas bacterias, ésta capacidad la adquieren cerca de diez días después del inicio de la infección, cuando los macrófagos se activan. Esta activación esta mediada por el Interferón gamma (IFN- γ) e Interleucina 2 (IL-2) liberados por células sensibilizadas Th1. La respuesta de estos macrófagos tiende a ser inespecífica, de modo que una vez activados son capaces de destruir una amplia variedad de bacterias normalmente resistentes. El desarrollo de estos macrófagos activados coincide a menudo con la aparición de hipersensibilidad retardada (Tipo IV) contra el antígeno administrado por vía intradérmica (Tizard, 2009).

La recopilación de una serie de trabajos sobre la relación de la Inmunidad–Resistencia menciona que durante las primeras 1 a 6 h después de la inoculación intraperitoneal en ratones con *C. pseudotuberculosis*, los macrófagos que habían ingerido muchas bacterias sufrían degeneraciones extensas, mientras que los leucocitos polimorfonucleares (PMN) eran abundantes de cinco horas y media a veinte horas post inoculación. Los macrófagos degenerados y PMN eran menos frecuentes a las 20 h, pero el reestablecimiento se hizo evidente por tres a cuatro días. Los microorganismos intracelulares que parecían viables, se presentaron al final de los diez días del estudio. Los macrófagos de animales inmunes a *C. pseudotuberculosis* tuvieron diferencias únicas en comparación con los macrófagos de los animales no inmunizados. Estas células inmunes contenían un mayor número de lisosomas, con evidencia de que eran capaces de penetrar la capa lipídica de la bacteria y que se establecían adyacentes a la pared celular del microorganismo. Los macrófagos inmunes resistieron la acción necrozante del microorganismo de forma más efectiva y en un tiempo de 48 h o más no se encontraron bacterias. Los estudios bioquímicos realizados en los macrófagos inmunes mostraron cantidades mayores de enzimas hidrolíticas. Este hecho confirmó observaciones en relación al incremento del número y tamaño de los gránulos lisosomales (Ayers, 1977).

7. MECANISMOS DE RESISTENCIA ESPECÍFICA

Los mecanismos de la inmunidad de la LC han sido un constante interés por parte de los investigadores debido a la importancia que tienen para el control de la enfermedad en los ovinos y caprinos. Inicialmente muchos investigadores consideraban que la inmunidad mediada por células era el mecanismo inmunológico principal de la enfermedad (Ayers, 1977; Ruiz *et al.*, 2007).

Corynebacterium pseudotuberculosis es un parásito intracelular facultativo, frente al que se desarrolla una respuesta inmunitaria muy compleja de carácter humoral y celular que no recae sobre un único antígeno sino que es producto de la configuración de la pared bacteriana (Hard, 1969; Radostis *et al.*, 2001; Urquiza, 2007).

La inmunidad para *C. pseudotuberculosis* es compleja e involucra tanto respuesta inmune humoral como celular; sin embargo, se han realizado varios estudios para una respuesta celular, principalmente tipo Th1, más que para una respuesta humoral (Lan *et al.*, 1998; Pepin *et al.*, 1997; Alves y Olander, 1999; Simmons *et al.*, 1998; Eggleton *et al.*, 1991a; Eggleton *et al.*, 1991b).

Así mismo, se han identificado las respuestas inmunes específicas humoral y celular en ovinos infectados con la LC, y se piensa que ambas respuestas desempeñan un papel en la inmunoprolifaxis. Más allá de la descripción morfológica de los abscesos caseosos característicos, poco se conoce acerca de la interacción celular del microorganismo y el hospedador (Ellis *et al.*, 1988).

Al analizar aspectos de respuesta inmune humoral y celular después de una infección experimental en caprinos durante 20 semanas, se encontró que la respuesta inmune humoral específica contra antígenos de *C. pseudotuberculosis* muestra patrones similares en la producción de IgG. Los títulos máximos se dieron entre los días 11 y 21 post infección y disminuyeron de forma regular hasta el fin del experimento considerándose serológicamente positivos en los días 6 al 11 post infección (Paule *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores mencionan que las pruebas de detección de anticuerpos pueden fallar al distinguir animales verdaderamente infectados de los no infectados, o para detectar animales con pequeñas lesiones y bajos títulos de anticuerpos (Ellis *et al.*, 1990).

7.1 Inmunidad humoral (Ig's)

Se ha originado una discusión acerca de la importancia relativa de la inmunidad humoral o celular en la eliminación del microorganismo y la prevención de la enfermedad sin que hasta el momento se defina aún si un tipo es más importante que el otro. La naturaleza de microorganismo intracelular facultativo de *C. pseudotuberculosis* propone el uso de vacunas para estimular la inmunidad celular y proteger adecuadamente contra la LC, pero los resultados conseguidos son muy ambiguos (Husband y Watson, 1977; Hedden y Thomas, 1986; Gillespie *et al.*, 1988; Tizard, 2009).

De esta forma, se busca la elaboración de un biológico que estimule la inmunidad humoral (bacterinas y toxoides) o celular (vacunas). A continuación se menciona a las investigaciones más notables:

Se ha visto que la aplicación de un toxoide o una bacterina estimulan la inmunidad humoral. En el primer caso, la antitoxina obtenida retarda en forma experimental el crecimiento o el transporte de *C. pseudotuberculosis* (o ambas cosas) en los linfonodos del ovino, es decir, inhibe su multiplicación secundaria más no evita la formación del absceso en el sitio inicial de la infección. Igualmente se ha reportado que la protección brindada por la antitoxina sólo es posible si el donador fue inmunizado por períodos muy prolongados (Jolly, 1965; Ayers, 1977; Arbiza, 1986; Hedden y Thomas, 1986).

Otros estudios reportan que las bacterinas con gel de fosfato de aluminio como adyuvante y 0.5% de células aplicadas a razón de 5.0 ml por vía subcutánea (dos aplicaciones), protegen a los ovinos de las infecciones subagudas inducidas de forma experimental, la misma situación se reporta en ratones. Sin embargo, la protección contra la infección crónica es parcial (Cameron *et al.*, 1972; Cameron y Fuls, 1973; Hedden y Thomas, 1986; Brown y Olander, 1987).

Otro aspecto de interés es que la transferencia calostrala de anticuerpos protectores ha sido demostrada a nivel de campo y de laboratorio. Al vacunar cabras preñadas con un toxoide y un adyuvante se protegió a los cabritos contra el desafío hasta las primeras cinco semanas de vida. El nivel de anticuerpos séricos disminuyó hasta los dos meses y medio. Esto explicaría también el hecho de que rara vez se infectan animales menores de tres meses. Es indudable que los anticuerpos maternos, el medio ambiente y otros factores aún no estudiados, protegen a las crías contra la LC. De esta manera, los resultados manifestaron

que cualquier plan profiláctico debería introducirse a la edad de tres meses (Burrell, 1980 a; Lund *et al.*, 1982; Lund y Almlid, 1982 a y b; Hsu *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1986).

En este sentido, también existe controversia pues mientras algunos autores manifestaron que ningún adyuvante o sustancia inmunoestimulante es útil para mejorar la eficacia de los biológicos usados contra *C. pseudotuberculosis*, otros afirmaron que la saponina y el hidróxido de aluminio daban buenos resultados (Cameron y Fuls, 1973; Cameron y Bester, 1984; Hsu, 1984).

En la misma recopilación de Ayers pero en relación a la inmunidad humoral, se menciona que los factores tóxicos y el antígeno protector (en ratones) eran sustancias diferentes. También menciona la muerte marcadamente reducida en los ratones que se habían inmunizado contra la bacteria muerta completa. Aunque el antígeno protector no se identificó, éste mostró ser parte integral de la pared celular. En 1971, se concluyó que un solo antígeno no era responsable de inducir inmunidad protectora, pero una configuración compleja intacta de la pared celular (o más que un antígeno) era necesaria para el desarrollo de una inmunidad efectiva. Además, se demostró que la inmunidad contra *C. pseudotuberculosis* en ratones era humoral cuando se empleaba una vacuna inactivada. Así mismo, se encontró que los macrófagos de ratones inmunes transferidos a ratones no inmunes no protegían a éstos contra el desafío con la bacteria. No obstante, los ratones podrían protegerse de forma pasiva con antisuero hiperinmune de conejo. Finalmente, se dedujo que el efecto protector del suero no se debía a su actividad antitóxica o a su capacidad de promover fagocitosis, pero si a la multiplicación secundaria retardada de la bacteria (Ayers, 1977).

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

7.2 Respuesta inmune mediada por células

En 1965 se postuló la función de la inmunidad celular para *C. pseudotuberculosis* cuando se reveló que la eliminación de la infección se asociaba con el desarrollo de una población de macrófagos maduros y especializados. En 1970 se explicó la probabilidad de adquirir inmunidad contra *C. pseudotuberculosis* a través de la resistencia celular (ACR) actualmente conocida como “inmunidad celular”. Al estudiar la formación de abscesos, se demostró la inmunidad adoptiva de transferencia. Después de transferir células peritoneales de ratones inmunes a ratones receptores, 20% de los ratones donadores desafiados desarrollaron abscesos, pero el 80% de los controles desarrollaron abscesos después de un desafío posterior. Al final se concluyó que los linfocitos y fagocitos mononucleares a la par, eran capaces de inducir inmunidad en los ratones contra *C. pseudotuberculosis* (Ayers, 1977).

Usando la supresión de la formación de abscesos como un sistema de evaluación, Hard probó una “transferencia de inmunidad adoptiva.” Después de que células peritoneales se transfirieron de ratones inmunes a ratones receptores, el 20% de los ratones donadores desafiados desarrollaron abscesos, pero el 80% de los ratones control desarrollaron abscesos después de un desafío ulterior. Además, Hard manifestó que células como los linfocitos y fagocitos mononucleares de manera similar eran capaces de inducir inmunidad en los ratones contra *C. pseudotuberculosis*. Esto parece importante en relación a que los “linfocitos inmunológicamente comprometidos” tienen un papel en ARC (Ayers, 1977).

Una observación interesante es el hecho de que la respuesta inmune celular tiende a estar en relación inversa a la respuesta de anticuerpos. Este fenómeno, conocido como nicho ecológico se manifiesta con una respuesta celular baja y un nivel elevado de títulos serológicos de anticuerpos. En relación con la LC, sabemos que los animales jóvenes normalmente presentan una concentración menor de proteínas séricas totales que los adultos, y los animales afectados con la LC presentan una concentración total mayor por un aumento significativo de la fracción gamma-globulínica, probablemente por una respuesta a la estimulación constante de los antígenos de *C. pseudotuberculosis*. Si sabemos que la respuesta inmune celular contra *C. pseudotuberculosis* es clásica, y que los linfocitos T son activados para capacitar a los macrófagos para destruir a la bacteria, entonces el aumento mencionado en la producción de anticuerpos debe disminuir la eficacia de la respuesta celular. De hecho, se sabe que la infección activa causa una depresión de la respuesta inmune celular del hospedador. Por otra parte, la abscedación nodal también contribuye a la depleción de la respuesta celular al obstruir la salida de linfocitos T sensibilizados del propio linfonodo afectado. El efecto de la exotoxina para inducir una constricción arteriolar y venular posiblemente también contribuya a entorpecer la interacción linfocito T-macrófago (Hard, 1970; Husband y Watson, 1977; Desiderio y Turillo, 1979; Renshaw *et al.*, 1979; Gillespie *et al.*, 1983; Tizard, 2009).

7.2.1 Linfocitos y subpoblaciones

Al describir la distribución de las subpoblaciones de linfocitos en lesiones caseosas se encontró una banda de linfocitos dentro de una cápsula de colágeno en contacto íntimo con el tejido necrótico, los linfocitos intracapsulares se organizaban en tres estratos, el estrato más interno, inmediatamente adyacente al tejido necrótico consistía de una banda estrecha de macrófagos que expresaban receptores moleculares para el MHC de clase II. Las células teñidas para marcadores de linfocitos T CD4, CD8 y γ/δ se distribuían de manera irregular a lo largo del estrato linfoide, tendiendo a ser más numerosos en el estrato siguiente al de los macrófagos. El tejido linfoide intracapsular contenía una alta proporción de linfocitos CD8⁺ (CD4:CD8, 1.5:1) y de linfocitos γ/δ (CD4:CD8: γ/δ , 1:0.7:0.8).

Externo a la zona abundante de células T y adyacente a la cápsula circundante de colágeno estaba una banda densa de células, de las cuales, una proporción se tiñeron atípicamente para CD45R, y tentativamente se identificaron como células B. Los linfocitos CD8⁺ y γ/δ mostraron distribuciones similares y su abundancia relativa comparada con los linfocitos T CD4⁺ fue una característica distintiva de la lesión causada por *C. pseudotuberculosis*. La presencia de vénulas endoteliales y la arquitectura organizada del tejido linfoide sugieren que los linfocitos se acumulan constantemente dentro de las lesiones crónicas y juegan un papel importante en el curso de la enfermedad. Ver figura 4 (Walker *et al.*, 1991).

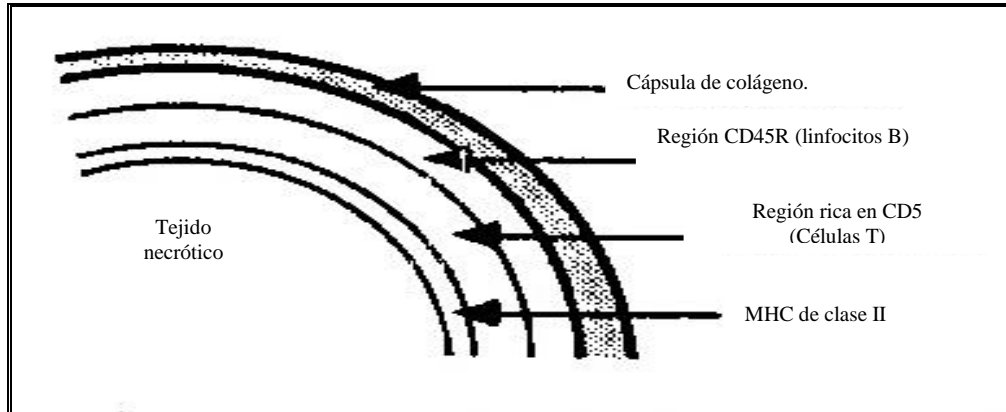


Figura 4. Lesión de LC que muestra la tendencia general de la organización de linfocitos intracapsulares (modificado de Walker *et al.* 1991).

Resultados similares se encontraron al observar la composición celular de 46 piogranulomas inducidos experimentalmente con *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos. Las lesiones localizadas en los sitios de inoculación o drenaje de linfonodos estaban constituidas por macrófagos y diversos estratos de linfocitos distribuidos alrededor de los centros necróticos, y rodeados por una cápsula de tejido fibroso. En las lesiones inmaduras predominaron linfocitos T CD4⁺, mientras que en lesiones maduras, las proporciones de linfocitos T CD8⁺ y células que expresaron cadenas γ/δ para el receptor de los linfocitos T se incrementaron. Numerosas células del piogranuloma expresaron al receptor para Interleucina-2 (IL-2). Además de estas características generales, una gran variabilidad individual en las proporciones de macrófagos y subpoblaciones de células T se observó en lesiones de la misma duración, en particular para células epiteloideas. Esta heterogenicidad sugiere un patrón celular diferente en relación a la persistencia o la eliminación de la bacteria por el hospedador (Pepin *et al.*, 1994).

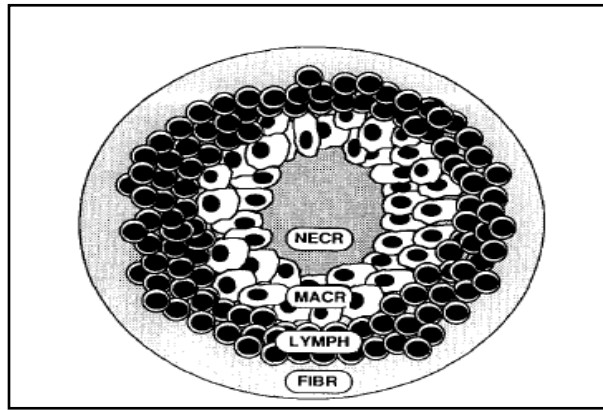


Figura 5. Esquema de un piogranuloma causado por *C. pseudotuberculosis* en ovinos. Se pueden distinguir cuatro regiones principales: área de necrosis central (NECR), un estrato celular compuesto principalmente de macrófagos (MACR), un estrato celular compuesto de linfocitos (LYMPH) y una cápsula fibrosa (FIBR). (Pepin *et al.*, 1993).

Al analizar el papel de las subpoblaciones de linfocitos T en el desarrollo de inmunidad protectora durante una infección secundaria, los ratones inmunizados se inocularon con anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8 o ambos un día antes del desafío. El 50 % de los animales que recibieron anti-CD4 y anti-CD8 murieron de la infección, aunque estos animales se habían inmunizado. Después de la infección secundaria, se observó una explosiva multiplicación de bacterias en los órganos de ratones que habían recibido solamente anti-CD4 o la administración simultánea de ambos anticuerpos monoclonales. Ninguno de los ratones inmunizados no desafiados murió cuando se trataron con anti-CD4. La administración de anti-CD8 no aumentó la mortalidad de los ratones infectados ni suprimió la eliminación de la bacteria de los órganos (Lan *et al*, 1999a).

Otro estudio analizó las lesiones pulmonares asociadas a *C. pseudotuberculosis* en 10 animales con una técnica de inmunoperoxidasa indirecta utilizando mAb's. Los abscesos pulmonares presentaron centros de tejido necrótico rodeados por paredes de fibroblastos y tejido conectivo, infiltrados por grandes macrófagos pleomórficos, linfocitos de varios tamaños y ocasionalmente células plasmáticas y granulocitos. El parénquima pulmonar mostraba infiltración de células inflamatorias similares. y una fibrosis intersticial variable. Los cambios en las vías aéreas incluían hiperplasia linfoide peribronqueolar moderada, hiperplasia epitelial bronquiolar y fibrosis peribronquiolar. Nueve lesiones pulmonares de tres animales revelaron que la mayoría de las células en las paredes de los abscesos reaccionaron intensamente a la tinción de inmunoperoxidasa con el mAb 28.1, evidenciando células gigantes que expresaron moléculas de clase II del MHC. El mAb ILA-25 confirmó que la mayoría de estas células eran macrófagos alveolares. El parénquima pulmonar alrededor de los abscesos presentó las mismas características. La inmunoreactividad en los abscesos pulmonares y el parénquima adyacente con el mAb 25.1 (SBU-T1) mostró que la mayoría de las células tenían morfología de linfocitos T.

Las células positivas a 25.91 [SBU-T1 (CD)] (pan T cells) presentaron la morfología de: a) linfoblastos, b) linfocitos pequeños y medianos, que a menudo se encontraron como pequeños agregados en la pared de los abscesos. Las lesiones teñidas con los anticuerpos monoclonales 44.38 [SBU-T4 (CD4)] y 38.65 [SBU-T8 (CD8)] revelaron que la subpoblación predominante de linfocitos T eran células CD4. El promedio de la relación de T4:T8 fue de 3.4 (rango de 2.7-4.2). Sólo las células dispersas con morfología de linfocitos en las lesiones pulmonares expresaron SBU-T19 o la molécula específica de células B reconocida por E53. La combinación de poblaciones fagocíticas mononucleares y linfoides en los pulmones de ovinos infectados naturalmente pueden indicar una interacción entre el hospedador y la bacteria más que defensiva (Ellis *et al.*, 1988).

mAb	Isotipos	Reactividad
25.91	SBU-T1 (CD)	Todos los linfocitos y timocitos
44.38	SBU-T4 (CD4)	20% de linfocitos T periféricos
38.65	SBU-T8 (CD8)	40% de linfocitos T periféricos
19.19	SBU-T19	5% de linfocitos periféricos
E53	?	Línea celular de linfocitos B (lineage)
ILA-25	?	Macrófagos pulmonares alveolares
28.1	Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II	Linfocitos B, subpoblaciones de monocitos/macrófagos, células dendríticas

Tabla 4. Especificidad de anticuerpos monoclonales usados para lesiones pulmonares inducidas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. (Modificado de Ellis *et al.*, 1988)

8. VACUNACIÓN

La vacunación es una herramienta de prevención que permite al sistema inmune del animal vacunado desarrollar una respuesta específica frente a una posible agresión. En la mayoría de las ocasiones se alcanza una protección inmunológica adecuada, reduciendo la posibilidad de adquirir la infección. La vacunación ha demostrado ser el método más eficaz y económico para controlar determinadas enfermedades de carácter infeccioso. El éxito de una vacuna depende en gran medida de la condición del sistema inmune del animal vacunado y de diversas circunstancias que lo rodean, por ejemplo: del animal, del producto vacunal o material empleado para la vacunación, grado de protección inmunológica adquirida (Manteca *et al.*, 2004).

Las vacunas son sustancias empleadas para obtener respuestas inmunes con la finalidad de prevenir o minimizar una enfermedad producida por un agente infeccioso. Las vacunas pueden estar compuestas de l propio agente infeccioso (vivo o muerto), una porción del agente que induce una respuesta inmune protectora (vacunas de subunidad), o un producto del agente. Los productos que contienen un agente bacteriano muerto se denominan bacterinas, mientras que los productos que tienen actividades tóxicas se denominan toxinas, y las toxinas que han sido inactivadas se denominan toxoides. Para que una vacuna sea efectiva, esta debe obtener una respuesta inmune que interfiera con el “estilo de vida” del agente infeccioso (Quinn et al., 2002).

A continuación, se hace mención de las vacunas estudiadas a la fecha para la prevención de LC.

8.1 Bacterinas

Los primeros ensayos de inmunización en ovinos se llevaron a cabo en Argentina con una bacterina de *C. pseudotuberculosis* que redujo a más del 60% la infección. Más tarde, Cameron *et al.* (1972) realizaron uno de los primeros intentos para demostrar mediante un desafío experimental la respuesta inmune a la inmunización en ovinos, el biológico consistía de bacterias completas muertas con formalina de *C. pseudotuberculosis*. La dosis intravenosa investigada en el desafío varió de 2×10^7 ó 2×10^{10} u.f.c. Sin embargo, fue difícil obtener resultados satisfactorios debido a que las dosis más elevadas ocasionaron la muerte aguda debido al edema pulmonar, mientras que las dosis más bajas no causaron lesiones. Además, la vacunación produjo un aumento en el título de anticuerpos séricos que persistieron por alrededor de 3 a 4 meses. No obstante, se concluyó que la vacunación puede proteger ovinos contra los efectos letales de la infección subaguda pero no de la formación de lesiones asociadas a la enfermedad crónica. Por lo tanto, se debe tener en cuenta que la inmunidad efectiva no podría depender únicamente de anticuerpos circulantes, pero que el papel de la respuesta celular podría desempeñar un papel (Baird y Fontaine, 2007).

En Reino Unido, en un estudio con varias vacunas, la inmunización de ovinos con el aislamiento virulento de *C. pseudotuberculosis* (inactivada con formalina y adicionada con adyuvante de hidróxido de aluminio) obtuvo una protección significativa contra el desafío homólogo. La vacuna previno la diseminación de la infección más allá del sitio de inoculación (Fontaine *et al.*, 2006).

En un experimento de campo con ovinos y caprinos vacunados con una vacuna muerta completa, en donde las poblaciones de adultos mostraron una prevalencia del 15% al 30% a LC previo al inicio del estudio, los corderos y cabritos se vacunaron a los 2.5-3.5 meses de edad con dos dosis administradas al primer y onceavo mes después de la vacunación inicial. Los animales se monitorearon con regularidad durante 36 meses después de la dosis inicial de la vacuna. La concentración de anticuerpos séricos aumentó significativamente en ovinos y caprinos vacunados al término del experimento. Además, la vacunación disminuyó significativamente la incidencia de LC en ovinos y existía un indicio de un efecto similar en caprinos (Menzies *et al.*, 1991).

En un estudio posterior, ovinos y caprinos jóvenes se inmunizaron con una bacterina de *C. pseudotuberculosis* formulada con una suspensión de bacterias y muramildipéptido en aceite mineral ligero con la finalidad de evaluar su eficacia en la prevención de la LC, obteniendo altos títulos aglutinante en ambas especies. Los títulos de anticuerpos aglutinantes aumentaron sutilmente después de la vacunación y permanecieron elevados por mayor tiempo, pero los resultados fueron inconclusos debido a que la vacuna solo protegió ovinos y caprinos en condiciones experimentales pero no de campo, señalando que el éxito moderado del estudio no se debió al diseño de la vacuna sino a los problemas asociados con la naturaleza crónica de la enfermedad y las condiciones experimentales de la prueba a nivel de campo, además de la dificultad de no tener suficientes animales por un largo período de tiempo (Brodgen *et al.*, 1996).

8.2 Toxoides

Petrie y McClean (1934), encontraron que la inmunización de cuyes con la PLD inactivada con formalina indujo un grado de protección contra desafíos homólogos. Sin embargo, en 1965 se mostró que la administración de toxoide seguido de la administración de una toxina redujo la magnitud de la infección experimental en ovinos (Baird y Fontaine, 2007). En Australia, durante los años 70 comenzaron a desarrollarse trabajos para crear una vacuna, lo que en el futuro llevaría a la creación de la primera vacuna comercial (Eggleton *et al.*, 1991a; Eggleton *et al.*, 1991b; Eggleton, 1991c). Para la producción de la vacuna, la fosfolipasa D se obtuvo de un cultivo de *C. pseudotuberculosis* filtrado, concentrado y posteriormente inactivado con formalina (Burrell, 1983; Hodgson *et al.*, 1999). La vacuna combinada con *Clostridium* y *Corynebacterium*, conocida como GlanvacTM se lanzó en 1983, posteriormente estuvo disponible en Australia y otros países pero no se autorizó en la Unión Europea. En un reporte, la vacunación en caprinos con GlanvacTM obtuvo una protección significativa medida por el número de lesiones contra la infección experimental con *C. pseudotuberculosis* (Brown *et al.*, 1986). Los resultados de ensayos realizados en el proceso de la vacuna comercial GlanvacTM indicaron una protección significativa de ovinos contra LC (Burrell, 1983; a, 1991; Eggleton *et al.*, 1991b; Eggleton *et al.*, 1991c). Sin embargo, en 1984 se encontró que el toxoide de la PLD dio mayor protección cuando no estaba combinado con componentes clostridiales (Anderson y Nairn, 1984). En el 2006, se evaluó la capacidad de un derivado de la PLD recombinante altamente purificado para proteger ovinos contra el desafío homólogo con un aislamiento de *C. pseudotuberculosis* derivado del Reino Unido. La protección fue similar a la obtenida con una bacterina. Después de los desafíos experimentales la infección pareció localizarse en el sitio de inoculación en todos los animales, excepto en uno, que presentó infección pulmonar (Fontaine *et al.*, 2006).

8.3 Vacunas Combinadas

Al rectificar el desarrollo de la vacuna contra la LC, se afirmó que a pesar de la capacidad de los antígenos asociados y la PLD de *C. pseudotuberculosis* para brindar un poco de protección, la protección completa requiere de la presencia de ambos antígenos (Burrell, 1978; Burell, 1983). En defensa de esto, se reveló que una vacuna con adyuvante de aluminio en hidrogel compuesto de bacterias completas de *C. pseudotuberculosis* inactivadas con formalina, enriquecida con formalina tratada, y sobrenadante de la PLD protegió por completo contra la infección experimental de LC. Otra vacuna disponible comercialmente (Caseous D-T) contiene toxinas clostridianas y la combinación de bacterina y toxoide de *C. pseudotuberculosis*. Esta vacuna proporcionó algo de protección en ovinos contra la infección experimental reduciendo la incidencia de lesiones típicas internas y externas de la LC (Piontkowski y Shivvers, 1998). El reporte del año 2006, en ovinos vacunados con una bacterina de *C. pseudotuberculosis* enriquecida con la PLD recombinante produjo inmunidad completa contra la infección tres semanas después del desafío homólogo experimental. Previamente se reportó que un mutante no virulento era capaz de persistir en granulomas presentes en linfonodos de drenaje como resultado de la inaccesibilidad a los abscesos de los factores inmunológicos requeridos para anular la infección. Por lo tanto, se sugirió que la vacunación permitía el tránsito del microorganismo previo al establecimiento en linfonodos (Simmons *et al.*, 1998).

8.4 Vacunas Vivas

Los ovinos infectados experimentalmente con *C. pseudotuberculosis* se protegieron contra el desafío, a pesar de ser incapaces de desencadenar la infección original. Esta observación indica el valor de una vacuna atenuada (Pepin *et al.*, 1993). Debido a que la PLD es el factor de virulencia más importante, se propuso que la inactivación genética del gen *pld* podría proporcionar la base para una vacuna veterinaria recombinante. La inoculación de ovinos con más de 10^7 u.f.c. de la cepa "Toxminus" de *C. pseudotuberculosis* (deficiente de la PLD) fracasó para producir abscesos, asociados normalmente con la cepa silvestre de *C. pseudotuberculosis*. Sin embargo, en las dosis más elevadas se formaron abscesos transitorios en el sitio de inoculación. A pesar de esto se concluyó que el grado de atenuación era equivalente al menos 100 veces la reducción de la dosis infectiva. La vacunación potencial con la cepa atenuada se determinó desafiando ovinos con la cepa silvestre de *C. pseudotuberculosis* previamente inmunizados con "Toxminus" observando un grado de protección contra el desafío y unas respuestas humorales y celulares enérgicas, pero los efectos resultaron menores a los producidos por la infección con la cepa silvestre. Por otra parte, los animales inmunizados con la cepa que expresa el gen *pld* inactivado, al momento del desafío obtuvieron una respuesta rápida anamnésica a la PLD, ésta respuesta fue más rápida y de magnitud mayor que la respuesta humoral en los animales sin vacunar, y en los animales que recibieron únicamente la cepa "Toxminus". A pesar de las respuestas humorales significativas, la protección conferida contra el desafío por la cepa "Toxminus" fue intrascendente, sustentándose con un reporte previo de la vacunación subcutánea con "Toxminus" (Hodgson *et al.*, 1992).

Para elaborar un vector de vacuna viva efectivo se intentó expresar un rango de antígenos foráneos en la cepa “Toxminus” bajo el control de diversos parámetros. El desarrollo de sistemas basados en “Toxminus” permitieron que los antígenos se expresaran en forma secretada o intracelular como proteínas nativas o de fusión, ya sea constitutivamente o por inducción controlada. Además, los genes se expresaron con gran éxito en plásmidos después de integrarse al cromosoma de “Toxminus”. Finalmente, el estudio reveló que la inmunización subcutánea de ovinos con “Toxminus” expresó al gen *pld* inactivo induciendo una respuesta humoral significativa (Moore *et al.*, 2000).

Otros reportes que intentaron crear un vector de vacuna viva contra LC resultaron menos exitosos. La interrupción de la secuencia del gen *aroQ* que codifica a la enzima 3-dehidroquinasa (enzima esencial para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos) llevó a la creación de mutantes atenuados de dos cepas de *C. pseudotuberculosis*, una cepa posee la fosfolipasa D, mientras que la otra cepa carece de esta. Ambas cepas se obtuvieron del hígado y el bazo de ratones a los ocho días de la inoculación intraperitoneal. A pesar de lo alentadores de los resultados observados en ratones, los ensayos en ovinos fueron decepcionantes con respecto a la protección ofrecida contra la LC por lo mutantes *aroQ*. Ambos mutantes mostraron baja capacidad para persistir en linfonodos y para producir reacciones locales en el sitio de inoculación. De la misma forma, ambos fallaron para estimular la producción de IFN- γ específica secretada por linfocitos, además de inducir concentraciones bajas de IgG anti-*C. pseudotuberculosis*, pero estas respuestas no protegieron a los ovinos de la infección (Simmons *et al.*, 1997).

Se contruyeron dos mutantes de *C. pseudotuberculosis*. En un mutante se sustituyeron aminoácidos para que la cepa mutante se atenuara, y en otra cepa de inactivo el gen *pld*. La transformación de Toxminus con la estructura del gen *pld* inactivado, logró secretar una fosfolipasa D con toxicidad reducida en niveles menores a lo que produce la cepa de campo. Por vía oral se administraron ambas cepas (Toxminus y Toxminus que portaba el gen *pld* inactivo) y ambas indujeron respuestas inmunes humorales significativas y similares (Hodgson *et al.*, 1992; Hodgson *et al.*, 1994).

8.5 Vacunas ADN (mediadas por ácido nucleico).

Se producen mediante procedimientos de ingeniería genética que insertan genes que codifican antígenos protectores en plásmidos bacterianos. El ADN del plásmido a continuación se purifica a partir del plásmido que tiene expresión bacteriana en el huésped y se administra directamente a los animales. Para ser eficaz, el ADN del plásmido deber ser transportado dentro de las células y transcrito por la maquinaria celular del huésped mamífero en ARN mensajero, que determina la síntesis de la proteína correspondiente. Esta proteína puede inducir respuestas de anticuerpos mediadas por linfocitos T (Roth y Henderson, 2003).

Desde la primera demostración en ratones, diversos estudios manifestaron que las vacunas ADN pueden inducir respuestas de anticuerpos específicos y respuestas mediadas por células para una variedad de antígenos bacterianos, virales y parasitarios (Donnelly *et al.*, 1997). Aunque la vacunación con ácido nucleico genera gran interés en la investigación veterinaria, respecto a la vacunación con ADN, se han publicado pocos reportes en especies domésticas de abasto. Uno de los primeros trabajos explicó que el ganado inmunizado con ADN codificaba una proteína de herpesvirus bovino, además de formar suficientes títulos de anticuerpos neutralizantes para reducir la diseminación (Cox *et al.*, 1993). Sin embargo, otros estudios refieren que las dosis múltiples de ADN que codifican antígenos de parásitos y virus en ovinos y bovinos indujeron respuestas débiles y de corta duración. De hecho, el nivel de protección proporcionado por las vacunas ADN, la mayoría de las ocasiones es inferior al proporcionado por las vacunas de subunidad o las vacunas convencionales, probablemente como consecuencia de una respuesta inmune débil y de corta duración (Rothel *et al.*, 1997; Schrijver *et al.*, 1997).

Para mejorar la vacunación con ADN contra patógenos intracelulares, se intentaron fusionar genes que codifican antígenos con genes que codifican moléculas efectoras específicas. Por ejemplo, una molécula efectora, es el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), el cual ayuda dirigiendo los antígenos secretados de la vacuna a los nódulos linfáticos y a células presentadoras de antígenos (Boyle *et al.*, 1998; Drew *et al.*, 2001). La molécula efectora CTLA-4 es represora de la proliferación de linfocitos T, y se expresa sobre la superficie de las células T activadas. En su forma dimérica compete con la molécula CD28 para ligarse a las moléculas CD80 y CD86 sobre las células presentadoras de antígenos (Linsley *et al.*, 1991; Thompson y Allison, 1997). Se creó un derivativo truncado de CTLA-4 (designado CTLA-4-HIg), compuesto de un extremo C-terminal del dominio extracelular fusionado a la región de bisagra de los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana (HIg); este derivativo fue capaz de dimerizar como efecto de la bisagra en los dominios de IgG. Como consecuencia, se encontró que las proteínas quiméricas (secuencias codificadas por el antígeno fusionado a CTLA-4-HIg) eran dirigidas específicamente a células presentadoras de antígenos (Boyle *et al.*, 1998). Más tarde, en otro estudio con ratones vacunados se señaló que la respuesta de anticuerpos al antígeno 45W de *T. ovis* fusionado a la construcción CTLA-4-HIg, fue 30 veces mayor que la conseguida con una vacuna que no era de ADN. Además, la cinética de la respuesta de anticuerpos a la construcción dirigida fue más fácil que la conseguida con una vacuna no dirigida por ADN o por una vacuna con adyuvante. Desafortunadamente la vacunación de ovinos con la vacuna fusionada falló al reforzar la respuesta inmune (Drew *et al.*, 2001).

El único reporte que desarrolló una vacuna ADN contra la LC en ovinos fusionó la secuencia codificadora del dominio extracelular de CTLA-4 bovino con la que codifica los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana y una PLD derivativa inactivada genéticamente (Δ PLD) por Tachedjian, *et al.*, 1995, para generar la estructura CTLA-4Ig- Δ PLD. Al intentar determinar la ruta óptima de inmunización, la vacuna ADN se administró por vía intramuscular, subcutánea o subcutánea con ayuda de una “pistola de genes”. Posteriormente se examinó la respuesta de anticuerpos y la resistencia al desafío experimental con *C. pseudotuberculosis*. Antes del desafío sólo la vacuna intramuscular obtuvo un aumento significativo (aunque mínimo) en suero de las concentraciones anti- Δ PLDIgG. Después del desafío, la concentración de anticuerpos de los animales vacunados con la “pistola de genes” fue superior a la de los animales no vacunados, sin embargo, las concentraciones de IgG en los animales vacunados por vía intramuscular aumentaron dramáticamente después del desafío indicando una fuerte respuesta anamnésica. La inmunidad estéril (protección a la infección absoluta) se observó en 45 % de los animales vacunados por vía intramuscular. Los títulos IgG2 en los animales vacunados por vía intramuscular fueron significativamente elevados denotando que la respuesta Th1 era responsable de la protección observada contra la infección (DeRose *et al.*, 2002).

9. DETECCIÓN DE INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR

Si bien el diagnóstico de la infección por *C. pseudotuberculosis* queda establecido en forma definitiva cuando se logra la demostración del agente causal, la obtención de material patológico para la realización microbiológica del diagnóstico directo resulta factible en la mayoría de los enfermos, pues en esta enfermedad es habitual la formación de nódulos necróticos purulentos subcutáneos característicos de la LC, también tiene lugar la afección de órganos externos (glándula mamaria, aparato genital o ciertas articulaciones). Pero en pocos casos clínicos el diagnóstico directo es inviable, salvo que se proceda a la necropsia del animal, tal como ocurre en la pseudotuberculosis interna (forma respiratoria y caquexia). Y aún existe otra situación patogénica en la que resulta inviable el diagnóstico microbiológico, los animales infectados aparentemente sanos, sin lesiones externas, ya sea en período de incubación o con lesiones internas (Smith y Sherman, 1994; Walker *et al.*, 1994; Yeruham *et al.*, 1997; Ruíz *et al.*, 2008).

No obstante, un comunicado reportó la posibilidad de un diagnóstico clínico de la LC en ovejas que presentaban una condición corporal pobre usando datos obtenidos de la historia clínica, la examinación, el análisis hematológico y bioquímico, la ultrasonografía y el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* en cultivos de orina de los animales afectados. Durante la hospitalización de estos animales se realizó la examinación clínica, y los parámetros clínicos mostraron valores normales (temperatura de 39.3°C, frecuencia respiratoria de 28 rpm, frecuencia cardíaca de 100 ppm). El aspecto de la lana era pobre, y la zona perianal se mostraba sucia. Los linfonodos retromamarios estaban agrandados y presentaban una consistencia dura. Los valores hematológicos mostraron anaemia crónica (Hb: 6.5 g/dL, Hto: 19.5%, 0% de reticulocitos), leucocitosis ($15 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$), con neutrofilia ($8 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$). El frotis sanguíneo reveló neutrófilos hipersegmentados y granulación tóxica.

Existió un incremento de la urea (21.77mmol/L), una concentración de de fibrinógeno (8g/L) y una disminución de la proteína total (58 g/L) y de albúmina (11 g/L). La bioquímica de la orina reveló proteinuria (100mg/dL) y leucocitos (500 leucocitos/ μ L). En el sedimento urinario se observó piuria (neutrófilos) y bacteriuria. En la ultrasonografía abdominal, los riñones aparecieron distorcidos, pudiendo distinguir calcificación (lesión compatible con abscesos). La investigación microbiológica de la orina (agar sangre) reveló la presencia de 100,000 organismos/ml, piuria y bacteriuria asociada con inflamación purulenta crónica, además de que pudo aislarse *C. pseudotuberculosis*. Los investigadores concluyeron que al emplear un cultivo de orina para aislar a *C. pseudotuberculosis* de animales afectados se podrían detectar animales subclínicos (Ferrer *et al.*, 2009).

Es en donde el diagnóstico directo muestra sus limitaciones y donde se debe realizar un diagnóstico basado en comprobar una respuesta inmunitaria específica frente a antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Smith y Sherman, 1994; Walker *et al.*, 1994; Yeruham *et al.*, 1997; Ruíz *et al.*, 2008).

En esta bacteria se conjuga una doble circunstancia, por un lado, actúa como parásito intracelular facultativo, a consecuencia de lo cual adquieren notable intensidad las respuestas inmunitarias humoral y celular. Y por otro lado, la cualidad de liberar enormemente y con precocidad una exotoxina activamente inmunógena (Smith y Sherman, 1994; Walker *et al.*, 1994; Yeruham *et al.*, 1997).

9.1 Detección de antígeno-anticuerpo (inmunodifusión, fijación del complemento, ELISA, Inmunoelectrotransferencia)

El diagnóstico serológico es de importancia en animales infectados subclínicamente, ya que representan una fuente potencial de infección para caprinos sanos. Una gran variedad de pruebas serológicas pueden ser aplicadas para diagnosticar LC, tales como microaglutinación, inmunodifusión, inhibición sinérgica de la hemólisis, inmunoelectrotransferencia, fijación del complemento, hemoaglutinación indirecta y una variedad de procedimientos para ELISA. En los procedimientos de ELISA se usan diferentes componentes bacterianos como antígenos de fase sólida tales como la pared celular, la PLD y además la exotoxina recombinante (Çetinkaya *et al.*, 2002). Maki *et al.*, 1985 utilizó la exotoxina cruda y diferentes formas de lisados celulares. Shuterland *et al.*, 1987 uso toxina cruda y células purificadas de la pared bacteriana (Urquiza, 2007). Con relación a las pruebas diagnósticas que determinan la actividad de la inmunidad humoral, debemos decir que Carne trató de elaborar una prueba cutánea similar a la prueba de Schick usada en humanos para la detección de *C. diphtheriae*; dicho examen consistía en inyectar pequeñas cantidades de toxina diftérica por vía intradérmica y si existían anticuerpos contra la toxina, su efecto era neutralizado inmediatamente y no hay reacción, pero si faltan, hay enrojecimiento visible por varios días. En el caso de la aplicación de éste, por Carne, *C. pseudotuberculosis* en 100 ovejas enfermas provocó reacciones irregulares, independientes de la toxina, por lo cual no fue eficaz (Carne, 1940).

En se mismo año, Cameron y McOmie emplearon una prueba de aglutinación con resultados poco alentadores, sin embargo, más adelante Award empleó una cepa del microorganismo con menor grado de aglutinación con la cual alcanzó mejores resultados (Awad, 1960, Cameron *et al*; 1940).

En 1964, se empleó otra variante de un examen cutáneo, al utilizar una mezcla a partes iguales del suero del animal problema y diferentes diluciones de la toxina, incubando esa mezcla por 1 hora a 37° C, luego se inoculó por vía intradérmica en la piel rasurada de un conejo, usando como control una mezcla de la toxina con el suero de un animal sano. Si el suero neutralizaba la toxina, no se observaba reacción en el conejo y dicho suero sería positivo; si por el contrario, el suero no neutralizaba la toxina, entonces se apreciaría una reacción igual al control en un tiempo aproximado de 48 h. Estos autores, aunque no lo consideraban una prueba diagnóstica acabada, le veían varias ventajas, pero en realidad este método tampoco se extendió, entre otras cosas porque en la respuesta inmunológica del conejo podían influir elementos independientes de la mezcla inoculada, por ejemplo, en el caso de que el conejo tuviera títulos de anticuerpos. A pesar de esto, dicho trabajo sentó las bases para la realización de futuras pruebas diagnósticas al establecer la identidad de la toxina de todos los aislamientos, y por tanto, que el suero de todo animal afectado contendría antitoxina que podría ser medida por métodos serológicos (Doty, *et al.*, 1964).

Utilizando la propiedad de la exotoxina para inhibir la lisis de los eritrocitos por la β -hemolisina de un estafilococo, se desarrolló con éxito una prueba que consistía en incubar el suero problema con cantidades definidas de la PLD, eritrocitos de bovino, y por último la hemolisina del estafilococo. Cuando el suero problema no tenía anticuerpos contra la exotoxina, esta ocupaba todos los sitios activos en la membrana del eritrocito, evitando que la β -hemolisina realizara su efecto hemolítico. En esta prueba la hemólisis estaba en relación con la positividad del suero a probar. Esta prueba recibió el nombre de Inhibición de la β -hemolisina (I.B.H) y fue avalada por una investigación en 200 ovinos y caprinos, con una sensibilidad de 92 % y una especificidad del 96 %. Además ha sido usada por varios autores para compararla con otros métodos de diagnóstico (Zaki, 1968).

Después, se describió la prueba de inhibición de la hemólisis para la detección de anticuerpos contra la exotoxina de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. La base de la prueba es la inhibición de la actividad hemolítica de la exotoxina por el suero inmune de ovinos. Cuando la prueba se aplicó al suero de ovinos que se habían vacunado con fragmentos de *C. pseudotuberculosis* y la exotoxina, el título promedio aumento de <2 a 137, mientras que los ovinos vacunados únicamente con fragmentos de *C. pseudotuberculosis*, el título promedio permaneció en <2. La infección experimental con una cepa toxigenica (*C. pseudotuberculosis* 231B) produjo títulos en un rango de dos a 32. La infección experimental en diez de doce ovinos con la cepa no toxigenica (*C. pseudotuberculosis* 137E), no produjo una respuesta en ninguno de los seis ovinos. Antes de la infección experimental, ninguno de los ovinos mostró inhibición de la hemólisis específica. Al llevar a cabo la inspección postmortem en 90 ovejas, 30 se encontraron con la enfermedad adquirida de manera natural, y la prueba de inhibición de la hemólisis resultó exitosa porque pudo detectar a 24 de estas ovejas. Además se detectó antitoxina en el suero de seis de siete corderos amamantados por hembras que presentaron títulos positivos al momento de realizar la prueba (Burrell, 1980a).

Por otro lado, la prueba de inhibición de la hemólisis sinérgica (I.H.S.) es económica, fácil de realizar, y detecta anticuerpos formados contra la exotoxina de *C. pseudotuberculosis*. La prueba originalmente se inventó para el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* en caballos, ya que confiaba en la capacidad de la fosfolipasa D para producir una zona de hemólisis amplia cuando se aplicaba a eritrocitos tratados previamente con un filtrado estéril que contenía la fosfolipasa C (PLC) de *Rhodococcus equi* (Knight, 1978). Más adelante, esta técnica se empleó en caprinos para detectar la infección experimental de la LC; observando que todos los animales con lesiones al sacrificio resultaron seropositivos a los 23 días post-inoculación, mientras que los animales sin infección resultaron seronegativos durante todo el experimento. La prueba volvió a mostrar que era un indicador confiable de la infección activa, y que además podía ser útil para emplearse en los esquemas de control de la enfermedad en caprinos (Brown, *et al.*, 1985)

En otra publicación, se evaluó la eficacia de un toxoide en caprinos al mismo tiempo que se evaluó la inmunidad humoral con la prueba de I.H.S., detectando que nueve de diez ovinos vacunados desarrollaron títulos de anticuerpos positivos ($\geq 1:8$) contra la exotoxina una semana después de la inoculación; dos semanas después de la inoculación, el caprino que no presentó títulos de anticuerpos seroconvirtió, mientras que en el grupo control, los animales requirieron tres semanas para desarrollar una respuesta de anticuerpos positiva (Brown *et al.*, 1986a).

Posteriormente, en un estudio de campo, la prueba de I.H.S. se aplicó en muestras de suero de 196 caprinos y 76 ovinos para detectar la LC, en el estudio se incluyeron animales con y sin abscesos causados por *C. pseudotuberculosis*. Los resultados obtenidos indicaron que el 98% de los caprinos, y el 96% de los ovinos con abscesos presentaron títulos seropositivos, que además siguieron apareciendo en las muestras de animales con lesiones superficiales o ya cicatrizadas. La prueba también pudo detectar animales infectados subclínicamente, así como animales con lesiones clínicas reconocibles. El 28% de los caprinos, y el 10% de los ovinos resultaron seropositivos. Con estos resultados se concluyó que la prueba carecía de suficiente especificidad, o esos títulos eran reflejo de una infección pasada o actual sin abscesos claramente visibles (Brown *et al.*, 1986b).

Con la necesidad de encontrar un método de purificación que permitiera procesar grandes volúmenes de sobrenadante y producir PLD casi homogénea se propuso el método de “reciclaje de isoelectroenfoque” (RIEF) que tiene ventajas sobre los procesos llevados a cabo en geles u otros medios en los que la separación toma lugar en una solución libre, y pueden concentrar grandes volúmenes de la PLD sin manipulación prolongada antes de la fragmentación. En este reporte se detalló el uso de RIEF para purificar la PLD, mas el análisis de un método simple que cuantificara la actividad de la exotoxina, por lo que se emplearon dos pruebas; el análisis radiométrico y la prueba de I.H.S. En la prueba de I.H.S. se hicieron modificaciones que facilitarían su ejecución y la hicieran más reproducible para detectar la actividad de la PLD. Estas modificaciones consistieron en disolver agar purificado al 1.5% en una solución amortiguadora de cloruro de sodio-fosfato al 0.85% (PBSS, 0.05, pH 6.5) y los eritrocitos de ovinos contenidos en solución Alsever (1:1) se lavaron dos veces con la solución PBSS (Eguen *et al.*, 1989).

Shigidi, 1978 detectó anticuerpos contra la toxina de *C. pseudotuberculosis* en animales infectados naturalmente al efectuar una comparación entre la prueba de hemoaglutinación indirecta (IHA) y la prueba de la antihemolisisna (AHI) utilizando eritrocitos sensibilizados, encontrando que la IHA era más sensible que la AHI, revelando que ambas pruebas son adecuadas para investigaciones seroepidemiológicas de la LC, pero ninguna de las dos era 100 % confiable (Urquiza, 2007).

En otro estudio realizado por Shigidi, 1979 comparó cinco pruebas serológicas en animales afectados experimentalmente, al comparar el resultado de las cinco pruebas encontró un alto porcentaje de falsos negativos, siendo la AHI la que mostró un número menor de falsos negativos que en las otras pruebas. La fijación de complemento (CF) fue la primera prueba en detectar anticuerpos más rápidamente (después de una semana post infección); la CF y la aglutinación en tubo (TA) presentaron restricciones para detectar la infección después de ocho y dieciocho semanas respectivamente. La difusión en gel (GD) presentó un alto porcentaje de falsos positivos, mientras que la IHA resultó ser más sensibles para detectar la antitoxina. Se puede concluir que todas las pruebas son útiles para la detección de anticuerpos pero ninguna ofrece un 100% de confiabilidad en el diagnóstico de infecciones causadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Urquiza, 2007).

En 1980, se analizó la técnica de inmunodifusión doble, que probó ser un método económico y práctico al examinar el suero de dieciseis ovinos y dieciseis caprinos infectados con la LC obteniendo resultados positivos, el método consistía en obtener producción elevada de exotoxina permitiendo el uso de sobrenadante no concentrado y de suero como reactivos en la prueba de inmunodifusión doble para el diagnóstico de la LC. Se formaron líneas de precipitación prominentes entre la antitoxina en diluciones mayores a 1:8 y sobrenadante no diluido con títulos hemolítico y de necrosis dérmica de conejo de 1:32,768. El suero de todos los dieciseis casos confirmados en ovinos con la LC, formaron líneas de precipitación contra la exotoxina con un título hemolítico y un título de necrosis dérmica de conejo de 1:32,768. En caprinos, el suero de los dieciseis casos confirmados con la LC formó líneas de precipitación contra la exotoxina con un título hemolítico o de necrosis dérmica de conejo de 1:32,768. No se formaron líneas de precipitación contra ninguno de los dieciseis sueros de ovinos libres de la enfermedad. Diez de los dieciseis sueros recolectados en cabritos que no mostraron signos clínicos de la LC fueron positivos a la prueba. En general, los resultados se podían obtener a las 24h de que se preparaba la prueba. A pesar de su practicidad, la prueba requería ser perfeccionada (Burrell, 1980b). El empleo de un ensayo de microaglutinación directa adaptando un sistema de microplaca para *Pasteurella haemolytica* y un tubo de la prueba de aglutinación de *C. pseudotuberculosis*, demostró que la sensibilidad era relativamente satisfactoria, mientras que la especificidad tuvo una respuesta pobre, por lo cual sus autores no la recomiendan para su uso en programas de erradicación (Muckle, *et al.*, 1983; Urquiza, 2007).

Con relación a otros tipos de diagnóstico serológico, Burrell utilizó la actividad hemolítica de la exotoxina sobre los eritrocitos de carnero cuando reacciona en un pH por debajo de 6, mientras que presentan actividad de hemoaglutinación al reaccionar en un pH más elevado, basándose en estas observaciones (Burrell, 1979). Por estos métodos era difícil obtener una repetibilidad adecuada, ya que dependía mucho de las condiciones en que se obtuviera el cultivo y la toxina, además en diluciones altas, el suero no era apto para evitar que el pH se acidificara. Por lo que podían obtenerse resultados falsos negativos (Brown y Olander, 1987).

A pesar de estos avances otros autores insisten en métodos tradicionales como es la prueba de neutralización de la fosfolipasa usada por Skalka y col., con la cual examinaron tanto sueros humanos para diagnosticar la infección espontánea causada por *Arcanobacterium haemolyticum* como sueros de ovinos y caprinos para diagnosticar la infección causada por *C. pseudotuberculosis*, confirmando lo planteado por Cuevas y Songer acerca de la similitud entre las características de la fosfolipasa D para ambas bacterias (Cuevas *et al.*, 2002; Skalka *et al.*, 1998).

9.1.1 Aplicación de la prueba de ELISA en el diagnóstico.

Los inmunoensayos (ELISA) en fase sólida son una herramienta de la inmunología clínica basados en los principios de interacción anticuerpo-anticuerpo en placas de plástico (poliestireno o polivinilo principalmente). Se utilizan cromógenos solubles para detectar las enzimas. Es una técnica fácilmente automatizable para un gran número de muestras en un primer análisis. Además no necesita equipo sofisticado, se puede adaptar en condiciones de campo con estabilidad de los reactivos, estandarización del empaquetado, simplicidad y conveniencia de los instrumentos de medida. La realización práctica de una ELISA tiene cinco apartados: fabricación de los reactivos, preparación de las placas (tapizado, bloqueo y almacenado), diluciones y pipeteado de muestras, pipeteo del conjugado y medida de la actividad enzimática (Coll, 1993).

El principio básico del método indirecto de la prueba de ELISA es que un antígeno se adsorba a una superficie, pudiendo ser ésta de diferentes materiales. Una dilución del suero problema es agregada y si contiene anticuerpos específicos, se unirán al antígeno, formándose un complejo antígeno-anticuerpo, al cual se le agrega un sustrato para activar la enzima, produciendo un cambio de coloración. Se agrega una solución para detener la reacción. El color final, es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo. El resultado puede ser leído directamente por observación visual o con la utilización de un espectrofotómetro, para medir la densidad óptica de la reacción (Ternynck y Avrameas, 1989).

Aunque en México se encuentra presente de manera muy diseminada en los rebaños nacionales, la LC es una enfermedad a la que poco estudio se le ha, no existe una técnica inmunológica que permita detectar la infección por *C. pseudotuberculosis* en animales que aún no presentan las alteraciones características de la LC, el interés es utilizar una prueba serológica (ELISA Indirecta) como técnica rutinaria de diagnóstico, ya que es una enfermedad con alta prevalencia e importancia económica en cabras (Ramírez *et al.*, 1992; Espinoza y Tórtora, 1992; Urquiza, 2007).

En el caso de las técnicas inmunoenzimáticas, el primer reporte de la aplicación de la prueba de ELISA la realizó Shen y col., quienes estandarizaron una prueba de ELISA indirecta para detectar anticuerpos contra un antígeno de la pared celular de *C. pseudotuberculosis* obtenido por la tripsinización de la bacteria (Shen *et al.*, 1982).

Más adelante, se utilizaron cinco preparaciones antigénicas, que fueron:

- una suspensión de células integras,
- una suspensión de células completas dispersadas y rotas por sonicación,
- células tratadas por extracción con éter dietílico,
- células tratadas por extracción con éter dietílico y entonces rotas por sonicación, y finalmente,
- el extracto lipídico.

También empleó como antígeno, la exotoxina obtenida a partir del sobrenadante de cultivo. Con estos seis antígenos, se probó una ELISA indirecta para cada una de las preparaciones antigénicas, y la compararon con la I.B.H. Los resultados obtenidos revelaron que las preparaciones celulares antigénicas no son eficaces, sin embargo, la exotoxina cruda presentó muy buenos resultados detectando títulos de anticuerpos 30 a 60 días después de la inoculación experimental. Esto fue superior a lo encontrado con la prueba de I.B.H. que detectó los títulos entre 60 y 90 días post inoculación, los que llevó a considerar la prueba de ELISA como una herramienta útil para el diagnóstico de la LC (Maki *et al.*, 1985).

Dos años después Sutherland y col. compararon nuevamente una ELISA para detectar anticuerpos antitoxina y obtuvieron que el primero detectaba más carneros con linfadenitis caseosa que el segundo y que ambos juntos detectaban el 92% de las lesiones en pulmón, aunque en el trabajo se aborda el alto porcentaje de falsos positivos especulándose acerca de las posibles causas de este problema. Estos autores recomiendan la prueba de ELISA para detectar anticuerpos contra la pared celular como una vía útil para investigaciones a gran escala de rebaños vacunados con toxoides en lugares donde está presente la infección con L.C (Ruiz, 2008; Sutherland *et al.*, 1987).

En Alemania, se reportó una prueba de ELISA basada en un antígeno de fase sólida, la cual presentó un 85% de sensibilidad. Para validar la prueba de ELISA se examinaron 109 caprinos con un estado clínico conocido alcanzando una sensibilidad del 96% y una especificidad del 76%. No se presentaron reacciones serológicas en 191 caprinos provenientes de rebaños libres de la LC (Sting *et al.*, 1998).

Usando la prueba de ELISA, también se evaluaron sueros de 24 caprinos provenientes de rebaños que sufrían la enfermedad, antes y después de la vacunación con una bacterina. Antes de la vacunación, cinco caprinos con signos clínicos observables no presentaron reacciones positivas con la prueba de ELISA. Después de la vacunación, los 24 animales presentaron reacciones positivas (Sting *et al.*, 1998).

En Polonia, se trató de establecer un procedimiento de ELISA basado en un antígeno de fase sólida, además la prueba debía ser adecuada para examinar un gran número de muestras serológicas tratando de identificar animales potencialmente infecciosos. Para determinar el valor límite de la prueba como diagnóstico de rutina, se tomaron al azar 142 muestras de suero en diez rebaños con historia clínica de la LC. Las muestras se probaron en paralelo con la prueba de ELISA y la prueba de inmunotransferencia usando la misma preparación del antígeno. El valor límite de la prueba de ELISA fue de 30 UE (unidades ELISA). Con este valor límite se calculó una sensibilidad del 85% y una especificidad del 96%. La sensibilidad de la prueba de ELISA con respecto a la detección de rebaños infectados, se determinó probando 910 sueros de 74 rebaños, diez de los cuales tenía historia clínica de la LC. En este experimento se encontró que 76 sueros con actividad de más de 30 UE pertenecían a los animales de los 10 rebaños con presencia de la LC. Por el contrario, 64 rebaños libres de la LC, a nivel individual ningún animal presentó actividad de ELISA mayor a 30 UE, pudiendo concluir que la prueba de ELISA es muy adecuada bajo condiciones de campo y su uso podría ser recomendado para programas de eliminación de animales infecciosos (Kaba *et al.*, 2001).

La mayoría de los autores reportan el uso de una prueba de ELISA que emplea como antígeno la toxina de *C. pseudotuberculosis*. Por ejemplo, en Japón, se comparó la prueba de ELISA indirecta con la prueba de inmunodifusión. Para este propósito se analizaron 1186 sueros procedentes de rebaños de ovinos aparentemente sanos de la región de Hokkaido, obteniendo una sensibilidad mayor con la prueba de ELISA que con la prueba de inmunodifusión, aunque encontraron reacciones inespecíficas ocasionales en la prueba de ELISA. Los autores de ese trabajo se inclinaron hacia el uso de la inmunodifusión como un método práctico para detectar la enfermedad en a nivel de campo, aunque reportan el hallazgo de falsos negativos por la prueba de inmunodifusión (cuatro animales de dieciseis investigados), lo cual explica porqué las cantidades de anticuerpos en dichos animales no eran suficientes para detectar la presencia de enfermedad por dicha técnica, por lo que sugirieron realizar más estudios para resolver esta diferencia (Chikamatsu *et al.*, 1989).

En otra investigación, se comparó la prueba de ELISA-antitoxina con la inhibición de la hemólisis encontrando una correlación elevada entre las dos pruebas (0.86, $p < 0.001$). En general, el suero con valores de DO (densidad óptica) bajos también tenían títulos bajos en la prueba de inhibición de la hemólisis. Al mismo tiempo se recomendó el uso de la prueba de ELISA para investigaciones masivas de la infección causada por *C. pseudotuberculosis*, ante todo por la facilidad de dicha técnica para su ejecución y la gran capacidad de trabajo que alcanza (Kuria y Holstad, 1989).

Estas bondades de la técnica también se evidenciaron en otros trabajos. En el primero, los autores presentaron el desarrollo y uso de una prueba de ELISA en un programa de erradicación de la enfermedad en Holanda, donde se probaron miles de muestras de suero. Dichos autores afirmaron la utilidad de la técnica y reportaron un logro para la certificación de rebaños libres de la enfermedad (Ter Laak, *et al.*, 1991).

En el segundo trabajo, se desarrolló una prueba de ELISA indirecta de doble anticuerpo tipo sándwich, para la detección de anticuerpos contra la PLD de *C. pseudotuberculosis*. En este caso se recubrió la placa con inmunoglobulinas antitoxina de *C. pseudotuberculosis* obtenidas de conejo, posteriormente se aplicó una toxina cruda, continuando con el suero problema, el conjugado y el sustrato. La especificidad de la prueba se calculó de manera individual en animales pertenecientes a rebaños libres de la LC (6,612 sueros). Cuando se descubrieron inflamaciones sospechosas de LC en animales seronegativos de rebaños no infectados, no se encontró la evidencia de LC en 10 animales. Algunas veces, los abscesos se presentaron en lugares atípicos para la LC, y se aislaron otras especies bacterianas (*Actinomyces pyogenes*). Por lo tanto, los resultados de esta prueba se consideraron correctos y la especificidad se calculó en un 99.9%. La sensibilidad no se pudo calcular de forma individual. En los rebaños infectados, sólo se reconocieron como infectados a los animales con signos clínicos de la LC. Los signos clínicos no siempre se pudieron observar en los animales infectados debido a que los animales pudieron infectarse recientemente, o el desarrollo de los abscesos solo se manifestó en linfonodos profundos. La mayoría de las veces, los resultados de ELISA fueron positivos en animales aparentemente sanos provenientes de rebaños infectados. Estos animales se consideraron infectados y tuvieron que eliminarse del rebaño. Aunque la sensibilidad de ELISA no se pudo calcular por individuo, sí se pudo calcular por rebaño. Todos los rebaños con uno o más animales afectados (50 lotes de 3,842 animales) tuvieron resultados positivos para al menos un animal. De esta forma, la sensibilidad de la prueba en base al rebaño, se consideró del 100% al momento de la primera examinación. Los resultados dudosos o inconclusos se confirmaron con la prueba de inmunotransferencia, y se recomendó que ésta debiera ser usada como prueba confirmatoria de los casos positivos, y ELISA como prueba diagnóstica en los programas de erradicación de la LC. Finalmente, la prueba de ELISA se usó en un programa perteneciente a los servicios de salud animal holandeses en un esfuerzo por erradicar la LC (Ter Laak *et al.*, 1992).

Estos resultados se confirmaron por Schreuder y col. quienes lograron la erradicación de la LC en dos grandes rebaños ubicados en el sur y el este de Holanda, con la enfermedad endémica. Mediante la introducción de un programa de erradicación iniciado en el año 1988 y empleando como herramienta principal la prueba de ELISA, lograron no reportar casos clínicos ni serológicos desde septiembre de 1989 (Schreuder *et al.*, 1994).

Por otra parte, se reportó una nueva variante de la prueba de ELISA indirecta empleando como antígeno la exotoxina de *C. pseudotuberculosis*. La preparación del antígeno, de acuerdo a los trabajos de Songer *et al.* (1990), difirió de otras pruebas de ELISA PLD, ya que éste se obtuvo de una *Escherichia coli* recombinante, la cual contenía un plásmido que albergaba al gen *pld*. La prueba también empleaba un conjugado anti-IgG de carnero con fosfatasa alcalina consiguiendo buenos resultados (sensibilidad 86.3% y especificidad 82.1%, usando una DO de 0.080).

El trabajo utilizaba un método basado en una curva receptor-operador (ROC), lo cual le permitía definir la eficacia de la prueba a diferentes puntos de corte, y por tanto facilitaba ajustar el incremento de la sensibilidad o la especificidad de la prueba, en dependencia de los objetivos de su uso. Los autores concluyeron que su prueba de ELISA poseía un valor comercial que ayudaría en el control y erradicación de la enfermedad. Aunque los resultados de sensibilidad y especificidad fueron inferiores a los reportados por Ter Laak *et al.* (1992), cuestionaron algunos aspectos de los trabajos de estos investigadores, tales como el uso de un solo control positivo y la complicada naturaleza de la prueba de ELISA con doble anticuerpo, considerando que eran elementos que conspiraban contra su comercialización (Menzies *et al.*, 1994).

En Perú, la prueba de ELISA indirecta también ha sido aplicada para diagnosticar la LC en otras especies de rumiantes (alpacas). La prueba manejaba un antígeno de pared celular y la proteína A con peroxidasa como conjugado. La sensibilidad de ELISA fue del 89%, concluyendo que la prueba era una buena alternativa para el diagnóstico de la infección en alpacas (Braga *et al.*, 1994).

Ruiz y col estandarizaron una prueba de ELISA indirecta utilizando como antígeno la toxina de *C. pseudotuberculosis* (PLD) y usando un conjugado anti-IgG bovina con peroxidasa con lo cual obtuvo una sensibilidad y especificidad de 96.6% y 94.6% respectivamente. Esto fue probado por la comparación con el “estado verdadero” (unión del aislamiento, la anatomopatología y la clínica) en un trabajo bajo condiciones controladas que incluyó la reproducción experimental de la enfermedad (Ruíz *et al.*, 2000).

En el año 2000, se publicó un artículo que comparaba cuatro tipos de ELISA para el diagnóstico de la LC en ovinos y caprinos. ELISA A, es una prueba de doble sandwich indirecta descrita por Ter Laak, *et al.*, 1992. ELISA B, es una modificación de ELISA A. Esta prueba empleó microplacas cubiertas con suero hiperinmune de conejo contra una preparación cruda de la PLD, más un anticuerpo monoclonal dirigido a una IgG1 de bovino marcada con peroxidasa de rábano. Las pruebas de ELISA, denominadas C y D se habían desarrollado previamente en Australia, de acuerdo al método descrito por Sutherland *et al.* (1987), con algunas modificaciones. Ambas son ELISAs indirectas y emplearon microplacas cubiertas con preparaciones de la pared celular o de la PLD, la unión de anticuerpos se detectó usando un suero de burro anti-ovino marcado con peroxidasa de rábano y TBM como cromógeno. Para realizar las pruebas se emplearon 118 sueros de ovino y 114 de caprinos, originarios de rebaños sin registros de LC, así como, 65 sueros de ovinos y 72 de caprinos que habían presentado abscesos clínicos, de los cuales se aisló *C. pseudotuberculosis*. Obteniendo los siguientes resultados: al comparar ELISA A y ELISA B con ELISA C y D, éstas últimas proporcionaron resultados inconclusos sobre todo en el suero de ovinos. ELISA B fue la más sensible en ambas especies, mientras que su especificidad fue similar a ELISA A y D (Ver tabla 5), pero mayor a ELISA C (en el estudio resultó la menos específica).

	ELISA A	ELISA B	ELISA C	ELISA D
<i>Caprinos</i>				
Sensibilidad (%)	72±5	94±3	61±3	56±6
Especificidad (%)	99±1	98±1	86±3	97±1
<i>Ovinos</i>				
Sensibilidad (%)	51±6	79±5	75±5	59±6
Especificidad (%)	97±2	99±1	69±4	92±3

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad con intervalos de confianza del 95% de las ELISAs A-D (Dercksen *et al.* 2000).

El objetivo del estudio era mejorar la sensibilidad de ELISA A, modificándola en ELISA B de cuatro formas: a) el período de incubación con el antígeno se acortó de una noche a solo 1h, con el propósito de ahorrar tiempo, b) el Tween 20 y el suero normal de conejo se reemplazaron por Tween 80 y suero de becerro, c) el conjugado se cambió por anticuerpo monoclonal contra IgG1 de bovino, y d) se usó el cromógeno TBM que es más sensible que el ácido 5-aminosalicílico. Con estas modificaciones se ocasionó el incremento de la sensibilidad de 72 a 94 caprinos y de 51 a 79 ovinos. La especificidad no se alteró con estas modificaciones. Por lo que ELISA B se recomendó para programas de erradicación y control en Holanda.

En Reino Unido, se desarrollaron dos versiones de la prueba de ELISA usando un antígeno sonicado de *C. pseudotuberculosis*. Las dos versiones usaron un sistema de detección en dos pasos; la detección primaria del anticuerpo (anticuerpo monoclonal de ratón anti-ovino) varió entre ambas pruebas, pero la detección secundaria empleó un conjugado de asno con un anticuerpo monoclonal anti -ratón IgG. En una versión de ELISA, la detección primaria era el sobrenadante de la línea celular K67.3G2, este anticuerpo monoclonal detecta cadenas ligeras de ovino, y por lo tanto, todas las clases de anticuerpos. En la ELISA anti-IgG, la detección primaria del anticuerpo uso un anticuerpo monoclonal anti-ovino de IgG. Ambas versiones de ELISA se evaluaron en un panel con sueros de 150 referencias positivas pertenecientes a 22 rebaños, cada ovino presentaba al menos un absceso positivo a *C. pseudotuberculosis*, y 103 sueros con referencias negativas pertenecientes a cuatro rebaños en los que no se habían presentado casos LC. Además, se obtuvieron curvas de receptor-operador características, y se usó el área bajo la curva ROC para comparar la sensibilidad y especificidad de las dos pruebas. Usando la prueba con un 100% de especificidad, la sensibilidad para la detección de anticuerpo total fue de 71%, y la sensibilidad para detectar IgG fue de 83%, lo cual se pudo comparar favorablemente con otras pruebas de ELISA reportadas para la LC en ovinos. La sensibilidad del ensayo de anticuerpo IgG pudo ser más elevada debido a la afinidad mayor de la clase de anticuerpos IgG, comparada con los anticuerpos IgM, también detectados por ELISA de anticuerpos

totales. Los resultados del análisis ROC indicaron que la ELISA-IgG fue más exacta que la ELISA de anticuerpos totales. La eficiencia de la prueba fue mucho mayor cuando las muestras de suero se corrieron en dilución seriales, que cuando se usaron diluciones simples. En conclusión, la prueba de ELISA- IgG se consideró adecuada para aplicarse en estudios de campo para detectar la LC en ovinos (Binns *et al.*, 2007).

9.1.2 Resonancia de Plasmones Superficiales

Los plasmones superficiales son aquellos plasmones que están confinados a las superficies y que forman un polaritón cuando interactúan con la luz. Ocurren en la interfase entre un dieléctrico y un metal. La resonancia de plasmones superficiales es utilizada en bioquímica para el estudio de mecanismos y la cinética de los enlaces entre los ligandos y los receptores, por ejemplo, el enlace entre un sustrato y una enzima. Los plasmones superficiales son usados para controlar los colores de los materiales, esto es posible debido a que la forma de la superficie controla el tipo de plasmones superficiales que se pueden acoplar y propagar a través de ella. Esto a su vez controla la interacción de la luz con la superficie. Estos efectos son fáciles de ver en los vitrales que adornan las catedrales medievales. En este caso, el color está dado por nanopartículas metálicas que interactúan con el campo óptico para dar al vidrio su color radiante. Estos efectos han sido manipulados para ser usados tanto en el rango visible como en las microondas. Muchas investigaciones son mejoradas en el rango de las microondas porque es posible diseñar mecánicamente superficies materiales con patrones del orden de algunos pocos centímetros que son útiles para estas longitudes de ondas. En cambio, para crear plasmones superficiales en el rango óptico, implica producir superficies con detalles menores a los 400nm. Esto es mucho más difícil de construir y sólo ha sido posible de fabricar gracias a la nanotecnología. Los plasmones superficiales son muy sensibles a las propiedades de los materiales en que se propagan. Esto ha llevado a que sean usados en la medida del grosor de monocapas en películas de coloides (Zayats y Smolyanina, 2006).

La excitación de plasmones superficiales por la luz es denotada como una resonancia de plasmones de superficie (**SPR**, de las siglas en inglés surface plasmon resonance). Este fenómeno es la base de muchos instrumentos estándar para medir la adsorción de material sobre una superficie de metal (normalmente oro, plata o cobre) o sobre la superficie de nanopartículas de metal. Compañías como Biacore han comercializado instrumentos que operan bajo estos principios. En la década pasada, la tecnología Biacore™ facilitó la detección de anticuerpos contra muchas bacterias patógenas, como *Escherichia coli* y *Salmonella*. Sin embargo, también se han usado muchas otras plataformas basadas en sensores para el análisis microbiológico (Atwater, 2007; Jorgerius-Gortemaker *et al.*, 2002).

Para el caso de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se inició un estudio para investigar el beneficio de un sistema de biosensor óptico (Biacore 3000™) de resonancia de plasmones superficiales (SPR) para detectar anticuerpos específicos contra la fosfolipasa D en suero de ovinos. Los resultados de la prueba indicaron que el biosensor (SPR) basado en el sistema Biacore™ como herramienta de diagnóstico serológico para la LC puede ser una alternativa

valiosa a los procedimientos de detección con ELISA. Gracias a su rapidez y reproducibilidad, el sistema Biacore 3000TM permite la detección en tiempo real, no emplea marcadores para la detección de biomoléculas, es automatizado por completo, y su rápido análisis lo hacen ideal para probar un gran número de muestras. Todas las muestras empleadas en la prueba BiacoreTM para la detección de la LC se obtuvieron del Laboratorio Central de Investigación Veterinaria (CVRL) ubicado en Dublín, Irlanda. Se emplearon nueve sueros como control, cinco sueros pertenecían a ovinos infectados experimentalmente con la LC y cuatro pertenecían a ovinos sin historia clínica de la LC. También se obtuvieron 92 muestras de sueros como referencia, los cuales se habían probado previamente en el Instituto Central Veterinario (Lelystad, Holanda) por el método de ELISA creado por Dercksen *et al.* (2000). La aplicabilidad de la prueba inicialmente se demostró usando los nueve sueros control. A una dilución de 1/80 la respuesta del control positivo fue de aproximadamente 400 unidades de respuesta (RU), la cual pudo distinguirse fácilmente de la respuesta del suero control negativo (aproximadamente 20RU). La selección de esta dilución se estableció por la necesidad de tener niveles de respuesta discriminatorios adecuados al sistema BiacoreTM, y por la necesidad de diluir para minimizar las reacciones no específicas, mientras se retiene la capacidad de detectar la unión anticuerpos y la condición para mantener los estados de regeneración asegurando la repetibilidad y longevidad a largo plazo de la PLD inmovilizada en el chip sensor (Stapleton *et al.*, 2009).

Para evaluar la sensibilidad y especificidad de BiacoreTM se compararon los resultados de ELISA obtenidos en Lelystad. El 86% de los sueros que probaron positivo en ELISA Lelystad también probaron positivo a la prueba SPR. Mientras que el 76% de los sueros que probaron negativo en ELISA Lelystad también resultaron negativos en la prueba SPR. Los resultados también se compararon con una ELISA PLD (recombinante) indirecta realizada en paralelo con las otras dos pruebas. Se calculó que el 95.5% de las muestras de suero que dieron positivo en ELISA PLD indirecta, también dieron positivo en la prueba SPR (BiacoreTM). En total, el 91.3% de los resultados negativos obtenidos en BiacoreTM proporcionaron el mismo resultado encontrado con el método de ELISA PLD (recombinante) indirecta. De los 92 sueros analizados, solo ocho muestras proporcionaron resultados contradictorios en la prueba BiacoreTM, seis de los cuales resultaron inconclusos (Stapleton *et al.*, 2009).

9.2 Detección de inmunidad celular

Un acercamiento alternativo a la serología en el inmunodiagnóstico de la LC es evaluar la inmunidad mediada por células (Menzies *et al.*, 2004).

Las pruebas para valorar el funcionamiento del sistema inmune mediado por células incluyen a las pruebas cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR), valoración de linfocitos T y B, determinaciones de actividad linfocitaria y pruebas para determinar el funcionamiento de neutrófilos. La mayoría de estos procedimientos están sujetos a variabilidad biológica y dificultades de estandarización además de que muchos constituyen experimentos complicados. No obstante, proporcionan importante información acerca del funcionamiento celular en infecciones intracelulares, inmunología tumoral y rechazo de transplantes (Kingsbury *et al.*, 1991).

La prueba cutánea es un método de diagnóstico empleado para verificar infecciones causadas por microorganismos intracelulares, y también se emplea para medir el estado inmunológico mediado por células especialmente por enfermedades causadas por bacterias como *Mycobacterium spp.* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*, estas bacterias son microorganismos intracelulares facultativos (Hard, 1975), con inmunidad mediada por células. La inmunidad mediada por células induce la formación de una población de células mononucleares especializadas en fagocitar y destruir microorganismos intracelulares (Mackness, 1970).

Cuando se inyectan ciertos antígenos en la piel de animales sensibilizados puede ocurrir una reacción en el sitio de inyección, esta última tarda muchas horas en desarrollarse. Toda vez que esta respuesta de hipersensibilidad tardía no puede transferirse de los animales sensibilizados a los normales por medio del suero, sino sólo por medio de linfocitos, es evidente que se trata de una reacción mediada por células. Las reacciones de hipersensibilidad tardía de este tipo se clasifican como hipersensibilidad de tipo IV, y se deben a la interacción entre el antígeno inyectado, células dendríticas y células T. Un ejemplo importante de reacción de hipersensibilidad tardía es la respuesta a la tuberculina, es decir, la reacción cutánea que produce en un animal tuberculoso una inyección intradérmica de tuberculina, extracto antigénico obtenido del bacilo tuberculoso (Tizard, 2009).

Se llama tuberculina al extracto de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium avium*, que se emplea como antígeno para pruebas cutáneas que se efectúan en animales con la finalidad de identificar a los que padecen tuberculosis. Con ese fin se han empleado varios tipos de tuberculina. El más importante es el derivado proteico purificado (PPD) de la tuberculina. Cuando la tuberculina PPD se inyecta por vía intradérmica a un animal normal no hay reacción inflamatoria local importante. Por lo contrario, si se inyecta a animales sensibilizados por una infección por el bacilo tuberculoso, se producirá una respuesta de hipersensibilidad tardía.

Después de la inyección intradérmica de tuberculina a un animal sensibilizado, se desarrolla una lesión edematosa indurada en el punto de aplicación. La inflamación se inicia entre 12 y 24 h después, alcanza su mayor intensidad a las 24 ó 72 h, y puede persistir por varias semanas antes de disminuir en forma gradual. La reacción a la tuberculina en un animal sensibilizado es una reacción inflamatoria inmunitariamente específica mediada por células T (Tizard, 2009).

En el caso de los métodos de diagnóstico que miden la inmunidad mediada por células para la LC, el primer intento fue hecho por Cesari, quien al inocular 0.2 ml de un cultivo filtrado de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en cobayos previamente infectados por el mismo microorganismo, provocó una reacción de hipersensibilidad local semejante a la reacción de hipersensibilidad tardía de la tuberculina en cobayos con tuberculosis y la designó como Preisznocardina sugiriendo que la prueba alérgica podía ser usada para el diagnóstico de la enfermedad en carneros (Cesari, 1930).

Al año siguiente Cassamagnaghi, basándose en el trabajo de Cesari, elaboró la Preisznocardina filtrando un cultivo del microorganismo y lo inoculó a 25 ovinos de los cuales 14 fueron experimentalmente infectados con una dosis de 0.1 ml por vía intradérmica; la lectura de la prueba se realizó a las 48 y 72 h revelando reacciones locales del tamaño de un huevo de paloma en todos los animales. En otro experimento con ochenta ovinos de un rebaño naturalmente afectado, 18 animales presentaron una reacción de hipersensibilidad tardía en el sitio de inoculación. En ambos casos reportó resultados alentadores (Cassamagnaghi, 1931).

En 1978, se preparó una sensitina a partir de una suspensión bacteriana fenolizada, Su eficacia se probó en cinco caprinos portadores de la LC y en diez animales sanos inoculando 0.1 ml de la sensitina por vía intradérmica. La lectura de la reacción se llevó a cabo a las 24, 48 y 72 h revelando crecimiento progresivo en cinco de los caprinos infectados mientras que los diez caprinos testigos no presentaron reacción (Costa *et al.*, 1978).

La tuberculina es conocida por obtener reacciones cruzadas en ovinos y caprinos con infectados natural y artificialmente con *C. pseudotuberculosis*. Estas reacciones probablemente se deban a que comparten ciertos antígenos de la pared celular (Brown y Olander, 1987). Un antígeno obtenido de *C. pseudotuberculosis* por sonicación se probó 26 ovejas con el síndrome de la oveja flaca. Los resultados conseguidos mostraron que solo el 56% de los animales que tenían abscesos causados por *C. pseudotuberculosis* dieron respuestas positivas de hipersensibilidad retardada a la prueba cutánea (Renshaw *et al.*, 1979).

En 1984, distintos científicos trataron de obtener un antígeno a partir de una masa bacteriana de *C. pseudotuberculosis*, desintegrada por hidrólisis con ácido sulfúrico, y la recuperación de proteína por precipitación con ácido tricloroacético, pero los resultados no fueron alentadores. Más tarde, se confirmó la posibilidad de elaborar un producto que denominaron “linfadenina”, proteína soluble contenida en el sobrenadante del cultivo lavado del microorganismo. Esta se obtuvo por precipitación con ácido tricloroacético y se empleó primero en cobayos y posteriormente en 40 caprinos infectados naturalmente y 22 caprinos sanos. Se obtuvieron resultados calificados como buenos por los autores del trabajo (Langenneger y Langenneger, 1984; Langenneger *et al.*, 1987).

Por otra parte, se trató de obtener un antígeno denominado “pseudotuberculina” siguiendo la técnica de elaboración de Koch, con lo que se logró una especificidad baja en un rebaño de 50 ovejas adultas. Luego de este resultado, se aprovechó el método usado por Cassamagnaghi, pero no mejoró los resultados, concluyendo que la respuesta inmunitaria era deficiente y que la prueba alérgica para el diagnóstico de la LC no era adecuada (Carne, 1932).

En quince caprinos, se evaluó el desarrollo de la inmunidad celular con una prueba cutánea de hipersensibilidad retardada usando como reactivo una suspensión de fragmentos celulares bacterianos de *C. pseudotuberculosis* complementada con azida de sodio, en animales vacunados previamente con un toxoide. Después de la exposición al desafío, todos los caprinos presentaron reacciones dérmicas positivas en cada periodo de la prueba. Las reacciones de la semanas cuatro y ocho después del desafío fueron más extensivas (diámetros grandes y aumento de la celularidad mononuclear, exudación de fibrina y trombosis) que a los diez días después del desafío. Las reacciones fueron más pronunciadas doce semanas después de la exposición del desafío, indicando el desarrollo secuencial de la respuesta inmune. Es importante aclarar que los animales seronegativos no desarrollaron reacciones dérmicas, y estas reacciones tampoco se presentaron antes del desafío. Los autores concluyeron que la prueba cutánea puede ser de utilidad para monitorear la infección o la exposición a *C. pseudotuberculosis*, tanto a nivel experimental como a nivel de campo, en donde la evaluación serológica resulta poco práctica (Brown *et al.*, 1986a).

En otra publicación, se emplearon caprinos vacunados previamente con toxoide y bacterina de *C. pseudotuberculosis*, inoculándolos por vía intradérmica con un antígeno crudo de la misma bacteria para posteriormente desafiar a los 30 días PI estos animales, con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, observando reacciones en la primera, quinta y décima semana. Las reacciones más fuertes o evidentes se observaron en la décima semana, concluyendo que es fundamental la purificación del antígeno para la prueba intradérmica de la LC, y que el uso de un antígeno específico de *C. pseudotuberculosis* para la prueba intradérmica puede favorecer el diagnóstico de la LC ovina y caprina a nivel de campo, además de la utilidad de la prueba intradérmica para verificar la inmunidad mediada por células, y así poder detectar la enfermedad subclínica en rebaños de ovinos y caprinos (Alves y Olander, 1999).

En los últimos años, se llevó a cabo el primer estudio con sangre completa de ovinos. Este estudio se basó en la detección de respuesta de IFN- γ a los antígenos completos de la bacteria. Para determinar la confiabilidad de la prueba, se empleó la prueba de ELISA-IFN- γ de bovino disponible comercialmente. La prueba perfeccionada empleó ovinos infectados experimentalmente. Los resultados del estudio explicaron que el ensayo basado en la detección de respuesta a antígenos celulares completos tiene valor para la detección de ovinos infectados. También señaló que la inmunización en ovinos con la vacuna empleada habitualmente (Glanvac 6: Vetrepharm Canadá, Londres, Ontario) para el control de la LC ovina no interfiere con la prueba. Al emplear un valor de densidad óptica (DO) de 0.1, el ensayo de sangre completa clasificó correctamente a los animales infectados como positivos y ovinos no expuestos como negativos con una confiabilidad aceptable (95.5%) para poder emplearla como prueba diagnóstica en programas experimentales y de control para la LC. Estos cálculos son el equivalente de la sensibilidad de 95.7% y especificidad de 95.5%, pero porque las muestras se tomaron repetidamente de individuos probados (aparte de un grupo grande de ovinos sin infectar). Los investigadores evaluaron la confiabilidad más que la sensibilidad y especificidad (Prescott *et al.*, 2002).

En otro trabajo, pero en caprinos se trató de revelar la inmunidad mediada por células usando una prueba de ELISA IFN- γ de bovino para la detección de *C. pseudotuberculosis* de animales infectados experimentalmente. Esta prueba se comparó con una prueba serológica de ELISA-PLD recombinante. Las pruebas se evaluaron repetidamente por más de un año en tres caprinos infectados y tres caprinos sin infección. ELISA IFN- γ presentó una confiabilidad de 89.2% en caprinos no infectados y de 97.1% en caprinos sin infección. A pesar de que en el estudio se empleó un número pequeño de animales infectados experimentalmente y caprinos sin infección, los resultados sugirieron que la prueba para detectar la respuesta de IFN- γ a los antígenos completos de *C. pseudotuberculosis*, tiene valor para detectar la infección. El ensayo con sangre completa clasificó correctamente animales infectados y animales sin infección con una confiabilidad aceptable para que pueda emplearse como prueba diagnóstica en los programas de control de la LC. Al compararse la prueba de ELISA IFN- γ con ELISA-PLD recombinante, la primera prueba presentó como ventaja una sensibilidad mayor al detectar la infección, pero presentó la desventaja con ELISA PLD recombinante, de no reflejar la magnitud de la infección. (Menzies *et al.*, 2004).

10. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

10.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica desarrollada en 1986, constituye una herramienta muy eficaz en las investigaciones del ADN recombinante y es útil en muchos campos de la ciencia de la vida, como la biología molecular, la genética, la evolución, la medicina forense, etc. La técnica PCR permite la amplificación directa de segmentos de ADN específicos sin necesidad de clonación, pudiéndose utilizar para obtener un gran número de copias de fragmentos que, inicialmente, estaban en cantidades muy pequeñas. En esta técnica, se utiliza una enzima denominada ADN polimerasa; también primers (cebadores, iniciadores u oligonucleótidos) que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia que será amplificada (Vadillo 2002).

El diagnóstico de LC se basa principalmente en signos clínicos característicos y en el aislamiento del agente proveniente de la descarga de abscesos. La identificación de microorganismos cultivados como *C. pseudotuberculosis* normalmente se consigue por pruebas bioquímicas, aunque a menudo es problemático debido a la variabilidad de las características bioquímicas del patógeno. Por lo tanto se desarrolló una prueba PCR específica para *C. pseudotuberculosis* con la finalidad de evaluar si este método podría simplificar la identificación de cepas cultivadas de esta especie. El diagnóstico serológico también es importante en la identificación de la enfermedad aunque los animales con la enfermedad subclínica son esenciales al introducir la LC a un rebaño sano. De 118 animales enfermos que se sacrificaron en Turquía, 4.3% ovinos y 1.3% caprinos presentaron lesiones de LC, los linfonodos principalmente afectados fueron el subiliaco y prescapular. Al emplear una prueba de PCR específica para la identificación de 96 aislamientos (pertenecientes a dichos animales), la amplificación de un fragmento de 815 pares de bases permitió la identificación de 93 aislamientos positivos a *C. pseudotuberculosis*; mientras que de los 3 aislamientos restantes no se obtuvo amplificación, considerándolos pertenecientes a *Corynebacterium spp.* Esto se logró desarrollando un gen (16S rRNA) para identificar a *Corynebacterium pseudotuberculosis* en los aislamientos. Los investigadores concluyeron que la prueba era útil para estimar la prevalencia de la LC en los animales estudiados, presentando algunas limitaciones: (i) era dependiente del cultivo bacteriano, y (ii) no era lo suficientemente específica para distinguir a *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans* (Çetinkaya, *et al.*, 2002).

En otra publicación, los científicos desarrollaron una prueba de PCR múltiple (mPCR) para facilitar la detección de *C. pseudotuberculosis* empleando tres genes blanco de la bacteria: 16S rRNA, *rpoB*, y *pld*. Para poder evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba se empleó ADN genómico purificado. Se recolectó pus proveniente de linfonodos en ovinos y caprinos y se extrajo su ADN, además se prepararon cultivos bacteriológicos de la muestras como prueba de oro para confirmar la presencia de la bacteria. La mPCR permitió la identificación eficiente de 40 aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, identificada previamente mediante pruebas bioquímicas, siendo específica para diferenciar *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans*. Existen reportes que sustentan que ambas bacterias tienen 99.7% de similitud entre sus genes 16S rRNA y 93.6% entre sus genes *rpoB*, y muchas de sus características bioquímicas también son similares. El análisis de especies relacionadas taxonómicamente no generó el perfil de amplificación mPCR, por lo tanto demostró la especificidad de la prueba. En muestras clínicas, el límite de detección se estimó como 10^3 u.f.c de *C. pseudotuberculosis* detectándola directamente en muestras de pus de ovinos y caprinos infectados (n=56) con una elevada sensibilidad diagnóstica (94.6%). El desarrollo de esta prueba demostró ser un método eficiente, exacto, rápido y reproducible para la identificación de *C. pseudotuberculosis* cultivada y su detección directa en muestras de pus, planteando la posibilidad de que la prueba se podría usar para confirmar la LC en el diagnóstico microbiológico y epidemiológico sustituyendo al cultivo bacteriológico (Pacheco *et al.*, 2007).

10.2 Técnica de Macroarreglos de ADN.

Los macroarreglos de ADN contienen manchas macroscópicas de ADN formadas sobre una membrana de nylon en un dispositivo portátil o robótico, son fáciles de fabricar, y en muchas ocasiones se construyen con productos empleados para PCR. Se considera que los “macroarreglos” son adecuados para situaciones en las que no es posible tener una serie ordenada de las secuencias del genoma debido a la carencia de información sobre este. A través de ésta técnica y dado que pocos genes de la bacteria se han secuenciado, se generaron fragmentos de ADN de 0.7-1.4 kb que se ligaron a un plásmido pUC18 obteniendo 4000 clones con un tamaño de inserción promedio de 1.3 kb. El ADN se extrajo de 1536 colecciones de colonias que se ordenaron en duplicado sobre una membrana de nylon con carga positiva para generar el macroarreglo. En particular, esta técnica pudo identificar al gen *pld* como el principal factor de virulencia siendo en gran medida termoregulable, observación que nunca se había hecho. También se descubrieron otros dos genes *fagC* y *fas*. De igual forma se observó que estos genes presentaban una expresión genética baja (McKean *et al.*, 2007).

11. INMUNIDAD DE MUESTRAS HETERÓLOGAS

En un estudio se trabajó con cuyes vacunados con BCG (Bacilo de Calmette y Guering) que adquirieron inmunidad e hipersensibilidad a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, lo anterior mostró una reducción del 85% en la incidencia de los casos clínicos entre cuyes infectados experimentalmente, mientras que el último fue marcado por una reacción de hipersensibilidad retardada tipo IV en todos los animales vacunados (Bakarar *et al.*, 1974). Mas tarde, se evaluó el beneficio de BCG como un material inmunizante contra la infección natural de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos. La vacuna BCG demostró ser más efectiva para la protección contra la LC en ovinos. La sensibilidad a la tuberculina aún estuvo presente después de 4 años. La incidencia de casos clínicamente infectados en ovinos vacunados menores de 1 mes de edad disminuyó en un 99%. Las madres sin vacunar adquirieron sensibilidad a la tuberculina debido a la exposición inmunogénica a las cepas de la vacuna. Los corderos de las madres vacunadas y sin vacunar adquirieron hipersensibilidad a la tuberculina debido a la estimulación por la vacunación *in utero*. La reactividad positiva a la tuberculina duró más de 4 años y disminuyó con el tiempo, aunque se sabe que la disminución de la reactividad no afecta la inmunidad adquirida. Se ganaron más beneficios al emplear BCG en ovinos que cuando se trata de combatir la LC, ya que protege de forma no específica contra todos los microbios intracelulares como bacterias (*Brucella abortus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*), virus, protozoarios, parásitos y hongos (Barakat, 1979).

12. DISCUSIÓN

En base a los artículos revisados es evidente que la falta de conocimiento respecto a los mecanismos de patogénesis e inmunidad de la LC hacen necesario analizar la relación entre el hospedador y la bacteria, e investigar más sobre antígenos que puedan ser capaces de inducir una respuesta inmunoprotectora. La información existente sobre la inmunidad que se presenta en la LC se fundamenta en estudios experimentales de vacunación, los cuales miden principalmente la respuesta humoral más que la respuesta celular, pero ningún estudio hace referencia sobre la inmunidad en animales expuestos a la enfermedad de manera natural (Paton *et al.*, 2003; Baird y Fontaine, 2008).

Es necesario ubicar que la LC es una enfermedad difícil de controlar debido a numerosos factores como son: la naturaleza subclínica de la infección, su largo período de incubación, y la naturaleza recurrente de la misma. Una vez que la enfermedad se establece en el rebaño, la erradicación se vuelve complicada puesto que el tratamiento no es sencillo. Para controlar un patógeno es necesario reducir su incidencia y prevalencia, considerando que es indispensable disponer de los medios efectivos como son la vacunación, el diagnóstico serológico adecuado, y la implementación de un programa de control y erradicación (O'Reilly *et al.*, 2010).

En países como Australia y Estados Unidos la vacunación se emplea como un método de control, estas vacunas de tipo comercial no están disponibles en otros países, aunque es bien sabido que la vacunación no erradica la enfermedad, si puede reducir la prevalencia y la severidad de la enfermedad (Baird, 2003).

Actualmente las vacunas existentes para la LC son combinados que contienen antígenos de otros patógenos; *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Costridium novyi* y *Clostridium chauvoeii* (Paton *et al.*, 2003; Piontkowski y Shivvers, 1998; Stanford *et al.*, 1998; Williamson, 2001). Cabe mencionar que estas vacunas se basan en la PLD inactivada. Paton *et al.* (1995), para comprobar su efectividad analizó un combinado de toxoides contra la LC reportando una disminución en el número y tamaño de los abscesos en pulmones, y la disminución en la diseminación de la enfermedad dentro del rebaño. Sin embargo, en otro estudio se reportó que aunque el 43% de los granjeros aplicaron la vacuna comercial, sólo el 12% la empleó de forma correcta, por lo que se concluyó que los ajustes en los programas de vacunación disminuirían dramáticamente la prevalencia de la LC, situación importante a discutir. Es importante señalar que no todas las vacunas autorizadas para ovinos se pueden emplear para vacunar caprinos. En cuanto a ovinos el programa de vacunación recomendado consiste en dos primeras dosis para corderos y un refuerzo anual en adultos, la revacunación en caprinos se recomienda a intervalos de seis meses (Paton *et al.*, 2003; Wiliamson, 2001).

En el mercado existen dos laboratorios que fabrican vacunas contra la LC, Colorado Serum Company en Estados Unidos y Commonwealth Serum Laboratory, en Australia. Las dos vacunas que fabrica Colorado Serum Company (Case-Bac y Caseous D-T) para la LC solo se puede aplicar a ovinos, y son las únicas disponibles comercialmente en Estados Unidos. Case-Bac, es una combinación bacterina/toxoide de *C. pseudotuberculosis*, mientras que la

vacuna Caseous D-T es una bacterina/toxoide de *C. pseudotuberculosis* combinada con el toxoide tetánico de *Clostridium tetani* y el toxoide de *Clostridium perfringens* tipo D. Por motivos de seguridad, Colorado Serum Company no tiene estas vacunas etiquetadas para uso en caprinos, la razón es que la vacuna contra la LC originalmente se probó en esta especie, notando reacciones a niveles variables en el sitio de inoculación (que no existiera reacción, hasta inflamaciones de aproximadamente 14 pulgadas de diámetro, lo que podría asociarse con cojera post-vacunación con duración de 1 a 30 días). Todas estas reacciones serían inaceptables para la USDA (U.S. Department of Agriculture), por consiguiente, la compañía nunca tramitó un permiso para uso en caprinos. Durante años, la compañía ha recibido comentarios de productores que manejan la vacuna en caprinos, y a ese nivel se reporta que un porcentaje razonable de esta especie desarrolla fiebre y letargia en corto tiempo (días), algunas veces pierden el apetito o disminuye la producción láctea, en hembras gestantes aumentan los factores de riesgo. Estudios señalan que estas reacciones pueden deberse a factores genéticos de la cabra, posibles diferencias en cepas del microorganismo, la presencia de otros microorganismos en los animales u otros alérgenos, por lo que se sugiere proceder con cautela al aplicar la vacuna (Piontkovski, 2001; Berrier, 2002).

En Australia, Commonwealth Serum Laboratory tiene la patente de las vacunas Glanvac 6 y Glanvac 3, fabricadas por laboratorios Pfizer. La vacuna Glanvac 6 está compuesta de antígenos ultrafiltrados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novyi* tipo B y *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei*, con sal de aluminio como adyuvante. La vacuna Glanvac 3 está compuesta de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* tipo D y *Clostridium tetani*. En caprinos, se recomienda el uso de Glanvac 3 ya que no padecen de enfermedades clostridias, a excepción del “Tétanos” y la “Enterotoxemia”. En ovinos, se recomienda el uso de Glanvac 6. Este laboratorio reporta que el uso de vacunas en caprinos puede ocasionar choque anafiláctico poco después de la vacunación, y se cree (hecho no bien justificado), que esta reacción se debe a la sensibilización de proteínas como resultado de una vacunación previa, además el laboratorio recomendó que la revacunación se realice a los seis meses para poder mantener una inmunidad efectiva contra la enterotoxemia (Glenn, 2000).

Para el año 2000, en Brasil se autorizó la vacuna atenuada de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002 que actualmente se produce a nivel industrial. En cuanto a las características de la vacuna es que se encuentra en forma líquida y debe administrarse anualmente por vía subcutánea. Esta misma vacuna se está desarrollando en versión liofilizada, reportando que confiere alrededor del 83% de protección contra la LC en caprinos tanto en desafíos experimentales como de campo (Dorella *et al.*, 2006).

En general la vacunación puede inducir respuestas efectoras y de memoria pero normalmente solo se miden las efectoras. Sin embargo en la mayoría de las vacunas la capacidad de generar memoria es más importante que su capacidad para inducir respuestas efectoras. En la mayoría de los casos, el potencial de respuesta contra un patógeno debe ser rápido y fuerte al principio de una infección para conferir protección. Es importante considerar que la respuesta inmune a una vacuna en una población está influenciada por varios factores que incluyen: el tipo de vacuna empleada (viva atenuada, inactivada,

bacterina, de subunidad ó ADN), la dosis, el número de vacunaciones (intervalo entre cada aplicación), las peculiaridades de un antígeno, la idiosincrasia del animal, y la ruta de inmunización. La ruta de inmunización es un factor importante en cualquier estrategia de vacunación (De Rose *et al.*, 2002).

Como alternativa a la vacunación, el diagnóstico serológico es una medida posible para combatir la enfermedad mediante la segregación y desecho de animales infectados tratando de erradicar la enfermedad del rebaño. Sin embargo, este método solo puede ser de uso práctico en rebaños que no tienen una incidencia elevada de la LC. Por lo tanto parece que la vacunación y el serodiagnóstico, en conjunto, proporcionarían la flexibilidad requerida para el control de la LC. En este sentido el desarrollo continuo para desarrollar las pruebas de detección de la enfermedad junto con el avance de nuevas vacunas, mejorarían las estrategias de control (Baird y Fontaine, 2008).

Las pruebas diagnósticas para identificar a *C. pseudotuberculosis* como el agente causal de la LC se basa en la detección de inmunidad humoral, e incluyen a la inhibición de la antihemolisis, la inhibición de la hemólisis sinérgica, la prueba de inmunodifusión, fijación del complemento, microaglutinación y el diagnóstico por PCR, sin embargo, la utilidad de estas pruebas queda en entre dicho por situaciones como la dificultad para analizar un gran número de muestras, y lo más importante, su baja especificidad y sensibilidad. Sin embargo, el método de ELISA en sus diferentes versiones demuestra mayor sensibilidad y especificidad al diagnosticar animales positivos. Actualmente la prueba SPR también muestra una buena especificidad y sensibilidad al diagnosticar la enfermedad (Zaki, 1968; Burrell, 1980; Brown *et al.*, 1986; Menzies y Muckle, 1989; Ter Laak *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1996; Dercksen *et al.*, 1996; Dercksen *et al.*, 2000; Williamson, 2001; Çetinkaya *et al.*, 2002; Prescott *et al.*, 2002; Paule *et al.*, 2003; Menzies *et al.*, 2004).

Por otro lado, los avances en el campo genómico, han caracterizado algunos genes relacionados con la virulencia de *C. pseudotuberculosis*, por tal razón, estos genes son blanco para el desarrollo de nuevas vacunas y terapias más eficientes, así como para la creación de herramientas de diagnóstico en el control de la enfermedad, ya que el manejo de LC aun presenta medidas de profilaxis rudimentarias. El depósito masivo de secuencias genómicas en bases de datos publicadas facilitan la investigación para homologar y predecir genes. Además, el genoma de muchas especies pertenecientes al género *Corynebacterium* está disponibles, y su información podría usarse en una genómica comparativa para tener una mejor visión del contenido y organización del genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (D'Afonseca *et al.*, 2008).

13. CONCLUSIONES

De acuerdo a la literatura revisada se concluye que la LC es una enfermedad prevalente en pequeños rumiantes que se presenta en la mayoría de los países.

Por ser una enfermedad crónica, la introducción de medidas de control alrededor del mundo ha sido de forma lenta o ausente, ocasionando que la incidencia de la enfermedad sea cada vez mayor, impactando en la economía de los productores.

No obstante en las últimas décadas países como Estados Unidos, Australia, Reino Unido y Brasil han tratado de desarrollar nuevas pruebas serológicas y la creación de nuevas vacunas a favor de establecer medidas de control y erradicación más adecuadas. En México, se podría implementar una línea de investigación en relación a la patogénesis de la bacteria y los mecanismos de inmunidad desarrollados durante el curso de la enfermedad (subclínica y clínica) tratando de mejorar o adaptar los métodos de investigación ya existentes.

Esta revisión trató de enfocar hasta donde la literatura lo permitió, la actuación de los mecanismos inespecíficos y específicos de defensa que se presentan durante la LC pudiendo destacar la carencia de estudios en relación al tema, la poca información existente es demasiado atrasada, con novedades importantes pero a la vez mínimas con respecto al tema.

Al mismo tiempo es necesario destacar que en años recientes se ha incrementado la investigación del genoma en otras bacterias causantes de enfermedades como la Tuberculosis, para el caso de *C. pseudotuberculosis* la información de la secuencia genómica es escasa pero la importancia de investigar más acerca del genoma radica en descubrir genes relacionados con la virulencia de la bacteria y de esta manera poder crear tanto pruebas diagnósticas como vacunas.

14. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, K.A., Lichtman, A. H., y Pillai, S. (2007). Immunity to microbes in: Cellular and Molecular Immunology, 6th edition. Saunders Elsevier. 351-362. USA.
2. Adamson P.J., Wilson W.D., Hirsh et al., D. C., Baggot J.D., Martin L.D. (1985) Susceptibility of equine bacterial isolates to antimicrobial agents. Am. J. Vet Res., 447-450.
3. Aldridge, Rofes (1995). *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Internet: <http://www.masey.ac.nz/wwvet/muusa/ass/micro/pseudohtm>.
4. Alves, D.F., Carvalho, P. L. G., Costa, O. S., Miyoshi, A., and Azevedo, V. C. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet. Res. 37: 201-218.
5. Alves, F. S. F. e Olander, H. J. (1999). Teste de Pele em caprinos vacinados e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pesq. Agropec. Bras. 34, 7: 1313-1318.
6. Anderson, V. M., Nairn, M. E. (1984). Role of maternal immunity in the prevention of caseous lymphadenitis in kids. Les maladies de la chèvre. Les colloques de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 28: 601-604.
7. Arbiza, A., S. I. (1986). Producción de Caprinos. 1a ed. A.G.T, Editor. México. p. 551-554.
8. Ashfaq, M. K and Campbell, S. G. (1979). A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. Vet. Med. Small. Anim. Clin., 74: 1161-1165.
9. Atwater, M. (2007). The promise of plasmonics. Sci. Am., 296: 56-63.
10. Augustine, J. L. and Renshaw, H. W. (1986). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. Am. J. Vet. Res., 47: 713-715.
11. Awad, F. I. (1960). Serologic investigation of pseudotuberculosis in sheep. I. Agglutination Test. Am. J. Vet. Res., 21: 251-253.
12. Ayers, L. J. (1977). Caseous Lymphadenitis in Goats and Sheep: A review of diagnosis, patogenesis, and immunity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171: 1251-1254
13. Baird, G. J. (2003). Current perspectives on caseous lymphadenitis. In Pract, 25: 62-68.
14. Baird, G. J and Fontaine, M. C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in Ovine Caseous Lymphadenitis. J. Comp. Path. 137: 179-210.
15. Baird, G. J and Fontaine, M. C. (2008). Caseous Lymphadenitis. Small Ruminant Research, 76, 42-48.
16. Barakat, A. A. (1979). Immunization against Caseous Lymphadenitis of sheep using attenuated bovine tubercle bacillus of Calmette and Guérin (BCG). Bull. Off. Int. Epiz. 91: 679-692.
17. Batey, R. G. (1986). Pathogenesis of Caseous Lymphadenitis in sheep and goats. Aust. Vet. J. 63: 269-272.
18. Benham, C. L, Seaman, A. and Woodnine, M. (1962). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in disease of animals. Vet. Bull. 32: 645-657.

19. Bernheimer, A. W., Linder, R. B. and Avigad, L. S. (1980). Stepwise degradation of membrana sphingomyelin by corinebacterial phospholipases. *Infect. Immun.* 29: 123-131.
20. Berrier, J. R. (2002). CLA in goats. Internet: http://www.colorado-serum.com/vets/vol_2/vol2_10.htm.
21. Billington, J. S; Esmay, A. P; Songer, G. J; Jost, H. B. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 41-45
22. Binns, S. H., Green, L. E., Bailey, M. (2007). Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.* 123: 169-179.
23. Blood, D. C., Studdert, V. P. and Grandage, J. (1999). *Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary*, 2nd edition. Harcourt Brace, England.
24. Boyle, J. S., Brady, J. L. and Lew, A.M. (1998). Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature.* 392: 408-411.
25. Braga, W. U.; González, A. E.; Hung, A. (1994). Utilización de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en alpacas. *Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*. Acapulco, México. Pag. 29.
26. Brodgen, K. A., Chedid, L., Cutlip, R. C., Lehmkuhl, H.D. and Sacks, J. (1990). Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. *Am. J. Vet. Res.* 51: 200-202.
27. Brodgen, K. A., Cutlip, R. C., Lehkuhl, H. D. (1984). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1532-1534.
28. Brodgen, K. A., Glenn, J. S., East, N and Audibert, F. (1996). A *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin with muramyl dipeptide induced antibody titers, increases the time of onset, and decreases naturally occurring external abscesses in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 19: 161-168.
29. Brown, C. C.; Olander, H. J.; Biberstein, E. L. and Moreno, D. (1985). Serologic response and lesions in goat experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* of caprine and equine origins. *Am. J. Vet. Res.* 46, 11: 2322-2326.
30. Brown, C. C., Olander, H. J., Biberstein E. L. and Morse S.M., (1986a). Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.* 47: 1116–1119.
31. Brown, C. C., Olander, H. J., Zometa, C., Alves, S. F. (1986b). Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1461-1463.
32. Brown, C. C. and Olander, H. J. (1987). Caseous Lymphadenitis of goats and sheep: A review. *Vet. Bull.* 57:1-11.
33. Burrell, D. H. (1978). Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. *Res. Vet. Sci.* 26: 269-276.

34. Burrell, D. H. (1979). Conditions in vitro haemolytic activity by *Corynebacterium ovis* exotoxin. Res. Vet. Sci. 24: 269-276.
35. Burrell, D. H. (1980a). A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. Res. Vet. Sci. 28: 191-194
36. Burrell, D. H. (1980b). A simplified double immunodiffusion technique detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. Res. Vet. Sci. 28: 234-237.
37. Burrell, D. H. (1983). Caseous lymphadenitis vaccine. New South Wales Veterinary Proceedings, 19: 53-57.
38. Cameron, H. S. and McOmie, W. A. (1940). The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. Cornell Veterinary. 30: 41-46.
39. Cameron, M. C. (1982). The immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: III International Conf. on Goat Production and Disease, 10-15.
40. Cameron, M. C. and Bester J. F. (1984). An improved *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine for sheep. Onderstepoort J. Vet. Res. 44, 1: 47-48.
41. Cameron, M. C., and Fuls, P. W. J. (1973). Studies on the enhancement of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Onderstepoort J. Vet. Res. 40, 3: 105-114.
42. Cameron, M. C., Minnar, L. J., Endelbrecht, M. M. and Purdom, R. M. (1972). Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. Onderstepoort J. Vet. Res. 39, 1: 11-24.
43. Campbell, P. A., (1986). Are inflammatory phagocytes responsible for resistance to facultative intracellular bacteria? Immunol. Today 7: 70-72.
44. Campbell, P. A., (1990). The neutrophil, a professional killer of bacteria, may be controlled by T cells. Clin. Exp. Immunol. 79: 141-143.
45. Carne, H. R. (1932). The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. Aust. Vet. J. 4: 42-47.
46. Carne, H. R. (1940). The toxin of *Corynebacterium ovis*. J. Pathol. 4: 42-47.
47. Carne, H. R., Kater, J. G. and Wickham, N. (1978) A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels, Nature 27: 246-248.
48. Carne, H. R., and Onon, E. O. (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on the endothelial cells of blood vessels. Nature, 271: 246-248.
49. Casamagnaghi, A. (1931). Le diagnostic de la lympho-adenite caséenne des mouton par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vet. France. 4, 7: 330-333.
50. Cesari E. (1930). Sur le diagnostic de la Lymphadenie Caséenne por l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vet. France. 3, 6: 291-295.
51. Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T. and Vanechoute, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Vet. Microbiol. 88: 75-83
52. Chaplin, P. J., DeRose, R., Boyle, J. S., McWaters, P., Kelly, J., Tennent, J. M., Lew, A. M., Scheerlinck, J-P. Y. (1999) Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. Infect. Immun. 67: 6434-6438.
53. Chikamatsu, S.; Zhao, H. K.; Kikuchi, N.; Hiramune, T. (1989). Seroepidemiological survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in

- sheep in Japan using Enzyme-linked immunosorbent assay. *Nippon Juigaku Zasshi*. 51, 5: 887-891.
54. Coll, M. J. (1993) *Técnicas de Diagnóstico en Virología*. Ediciones Díaz de Santos. México. 239-278.
 55. Collins, F. M. and Campbell, S. G. (1982). Immunity to intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3: 5-66.
 56. Costa, M. D; Cámara, J. Q; Rocha, J. V; Martínez, T. C. (1973). Linfadenite Caseosa dos caprinos no Estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. *Bolm Inst. Biol. Bahia, Salvador*. 12, 1: 1-7.
 57. Cox, G. M., Zamb, T. J. and Babiuk, L. A. (1993). Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* 67:5664-5667.
 58. Coyle, M. B. and Lipsky, B. A. (1990) Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects, *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 227-246.
 59. Cuevas, W. A.; Songer, J. G. (1993). *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Infect. Immun.* 61: 4310-4316.
 60. Cummins, C. S., (1962). Chemical composition and antigenic structure of cell walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces* and *Arthrobacter*. *J. Gen. Microbiol.* 28: 35-50.
 61. Cummins, C.S., (1965). Chemical and antigenic studies on cell walls of mycobacteria, corynebacteria and nocardias. *Am. Rev. Respir. Dis.* 92: 63-72.
 62. D'Afonseca, V., Moraes, P. M., Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Meyer, R., Portela, R. W., Miyoshi, A and Azevedo, V. (2008). A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genet. Mol. Res.* 7, 1: 252-260.
 63. Davis, E. W. (1990). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in animals. In: *Large Animal Internal Medicine*, B. P. Smith, Ed., C.V. Mosby Company, Toronto p.p. 1120-1126.
 64. Dercksen, D. P.; Brinkhof, J. M.; Dekker-Nooren, T; Maanen, K., Bode, C. F.; Baird, G.; Kamp, E. M.; (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of Caseous Lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 75, 2: 167-175.
 65. DeRose, R., Tennent, J., McWaters, P., Chaplin, P. J., Wood, P. R., Kimpton, W., Cahill, R., Scheerlinck, J. P. (2002). Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunization in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90: 55-63.
 66. Desiderio, V. J., and Turillo, A. L. (1979). Serum proteins of normal goats and goats with caseous lymphadenitis. *Am. J. Vet. Res.* 40, 3: 400-402.
 67. Dorella, A, F., Pacheco, C. L. G., Oliveira, C. S., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37: 201-218.
 68. Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617-648.
 69. Doty, R. B.; Dunne, H. W.; Hokanson, J. F.; Reid, J. J. (1964). A comparison of toxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the development of a diagnosis skin test for Caseous Lymphadenitis of sheep and goat. *Am. J. Vet. Res.* 25, 109: 1679-1684.

70. Drew, D. R., Boyle, J. S., Lew, A. M., Lightowers, M. W., Chaplin, P. J. and Strugnell, R. A. (2001). The comparative efficacy of CTLA-4 and L-selectin targeted DNA vaccine in mice and sheep. *Vaccine*. 19: 4417-4428.
71. Eckersall, P.D., Lawson, F. P., Bence, I., Waterson, M. M., Lang, T. L., Donachie, W., and Fontaine, M. C. (2007). Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. *Vet. Res.* 19; 3: 35.
72. Egen, N. B., Cuevas, W., McNamara, P. J., Sammons, D. W., Humphreys, R. and Songer, J. G., (1989). Purification of a phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1319-1322.
73. Eggleton, D. G., Doidge, C. V., Middleton, H. D and Minty, D. W. (1991a). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of the monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Aust. Vet. J.* 68: 320-321.
74. Eggleton, D. G., Middleton, H. D., Doidge, C. V. and Minty, D. W. (1991b). Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid contents and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Aust. Vet. J.* 68: 322-325.
75. Eggleton, D. G., Middleton, H. D., Doidge, C. V. and Minty, D. W. (1991c). Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J.* 68: 317-319.
76. Ellis, J. A., (1988). Immunophenotype of pulmonary cellular infiltrates in sheep with visceral caseous lymphadenitis. *Vet. Pathol.* 25: 362-368.
77. Ellis, J.A; Campos, M; Snyder; M; Chelak, B. and Haines, D.M. (1995). Local production of Tumor Necrosis Factor- α corynebacterial pulmonary lesions in Sheep. *Vet. Pathol.* 32: 68-71.
78. Ellis, J. A., Hawk, D. A., Holler, L. D., Mills, K. W. and Pratt, D. L. (1990). Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196: 1609-1613.
79. Ellis, J. A., Hawk, D. A., Mills, K. W. and Pratt. L. D, (1991a). Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28: 289-301
80. Ellis, J. A., Hawk, D. A., Mills, K. W., Pratt. L. D, (1991b). Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28: 303-316.
81. Ellis, T. M., Sutherland, S. S., Wilkinson, F. C., Mercy, A. R., Paton, M. W. (1987). The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. *Aust. Vet. J.* 64: 261-263.
82. Espinoza, C. R. y Tórtora, P. J. (1992). Abscesos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en cabras lecheras. *Memorias VIII Reunión Nacional de Caprinocultura. Oaxaca, México.* p.p. 110-114. *Small Rum. Res.* 87: 126-127.
83. Ferrer, L. M., Lacasta, D., Chacón, G., Ramos, J. J., Villa, A., Gómez, P., Latre, M. V. (2009). Clinical diagnosis of visceral caseous lymphadenitis in a Salzwedde ewe.

84. Fontaine, M. C., Baird, G., Connor, K. M., Rudge, K., Sales, J., and Donachic, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *C. pseudotuberculosis*. *Vaccine* 24: 5986-5996.
85. García, V. S. (1980). Aislamiento y caracterización de corinebacterias de muestras de ovinos y caprinos en México. Tesis de Licenciatura. ENEP-Cuautitlan, UNAM.
86. Gershwin, L. J., Krakowca, S. and Olsen, R. G. (1995). Principles of Immunology in Immunology and Immunopathology of Domestic Animals. 2nd edition. Mosby. United States. p.p. 3-34.
87. Gillespie, J. H., Timoney, J. F., Scott, F. W. and Barlough, J. E. (1988). The Genera *Corynebacterium* and *Eubacterium* in Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th edition. Cornell University Press. United States. p.p. 250-252.
88. Gorodezky, C. (1997). El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en animales domésticos. Memorias del 1er Curso Internacional de Inmunología Veterinaria; 51-67; Estado de México: UAEM, Programa Doctorado en Ciencias Veterinarias: Salud Animal.
89. Grant, M. Editor (2007). Specific Infections of the Lymphoid Tissues in Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals; 5th edition, Saunders Elsevier, USA 3: p.p. 292-294.
90. Gray, G. D., Mickelson, M. M. and Crim, J. A. (1969). The demonstration of two globulin subclasses in the goat. *Immunochemistry*. 6: 641-644.
91. Guilloteau, L., Pepin, M., Pardon, P., and Le Pape, A. (1990). Recruitment of 99m-technetium-or 111-indium-labelled polymorphonuclear leukocytes in experimentally induced piogranulomas in lambs. *J. Leuk. Biol.* 48: 343-352.
92. Gyles, J. F., Prescott, J. G., Songer, C. O. (2004) *Corynebacterium* and *Arcanobacterium* in Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 13th edition Blackwell Publishing. USA p. p. 78-80.
93. Hard, G. C. (1969). Immunity to experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the mouse peritoneal cavity. *Res. Vet. Sci.* 10: 547-554.
94. Hard, G. C. (1970). Adoptive transfer of immunity in experimental *Corynebacterium ovis* infection. *J Comp Pathol.* 80: 329-334.
95. Hard, G. C. (1972). Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal macrophages and *Corynebacterium ovis*. *J. Med. Microbiol.* 5: 483-491.
96. Hard, G. C. (1975). Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium pseudotuberculosis* on peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 12, 6: 1439-1449.
97. Hedden, A. J. and Thomas, M. C. (1986). Characterization of lectin-binding lymphocytes in goats with caseous lymphadenitis. *Am. J. Vet. Res.* 47, 6: 1265-1267.
98. Hirsh, C. D., MacLachlan, J. N. and Walter, L. R. (2004). Bacteria and Fungi in Veterinary Microbiology, 2nd edition. Edit. Blackwell Publishing. United Kingdom. p. p. 175-178.
99. Hodgson, A. L., Bird, P. and Nisbet, I. T. (1990). Cloning nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* 172: 1256-1261.

100. Hodgson, A. L., Krywult, J., Corner, L. A., Rothel, J. S. and Radford, A. J. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potencial cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immunol.* 60: 2900-2905.
101. Hodgson, A. L., Tachedjian, M., Corner, L.A., Rothel, J., Radford, A. (1994). Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 62, 12: 5275-5280.
102. Hodgson A. L., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult J., Corner, L. A., Mc Coll M., Cameron, A. (1999). Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine* 17: 802-808.
103. Holt, I. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 9th edition. Lippincott Williams & Wilkins.
104. Houben, N. G. E., Nguyen, L., Pieters, J. (2006). Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 76-85.
105. Houdebine, L. (2007). Transgenic animal models in biomedical research. *Methods. Mol. Biol.* 360: 163-202.
106. Hsu, T. Y. (1984). Caseous Lymphadenitis in small ruminants: clinical, pathological and immunological responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* and to fractions and toxins from the microorganism. *Texas A&M University Reports.* p.p.124.
107. Hsu, T. Y., Renshaw, H. W., Livingston, C. W., Augustine, J. I. and Zink, D. L. (1985). *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxin: fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparation containing exotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1206-1211.
108. Husband, A. J. and Watson, D. L. (1977). Immunological events in the popliteal lymph node of sheep following injection of live or killed *Corynebacterium ovis* into an afferent popliteal lymphatic duct. *Res. Vet. Sci.* 22: 105-112.
109. Ionedá, T. (1990). Mass spectrometric analysis of O-peracetylated derivatives of 1-monomycoglycerol isolated from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Rhodococcus rhodochrous* and *R. lentifragments*. *Chem. Phys. Lipids* 54: 215-220.
110. Johnson, E. H., Santa Rosa, J. and Kass, P. H. (1993). Immunizing effects of live *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats. *Small Rumin. Res.* 12: 349-356.
111. Jolly, R.D. (1965). The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. *J. Comp. Pathol.* 75: 417-431.
112. Jorgerius- Gortemaker, B. G., Goverde, F., van Knapen, A. A., Bergwerff, J. (2002). Surface lasmon resonance (Biacore) detection of serum antibodies against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol. Methods.* 266: 33-44.
113. Kaba, J., Kutschke, L., Gerlach, G. F. (2001). Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Vet. Microbiol.* 78: 155-163.
114. Kingsbury, D., Wagner, G., Segal, G. P. (1991). Inmunología y serología clínicas en: *Manual de Microbiología Médica Vol. I.* Noriega Editores, 2^a edición, México. 102-103.

115. Knight, H. D. (1978). A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses. *Cornell Veterinary*. 68: 220-237.
116. Kuria, J. N. K. and Holstad, G. (1989). Serological investigation of correlation between the hemolysis inhibition test and the ELISA test. *Acta Vet. Scand.* 30, 1: 109-110.
117. Lan, D. T., Taniguchi, S., Makino, S., Shirahata, T. and Nakane, A. (1998). Role of endogenous Tumor necrosis factor alpha and gamma Interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbial Immunol.* 42: 863-870.
118. Lan, D. T., Makino, S., Shirahata, T., Yamada, M. and Nakane, A. (1999a). Tumor Necrosis Factor alpha and gamma Interferon to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 1203-1208.
119. Lan, D.T., Makino, S., Shirata, T., Yamada, M. and Nakane, A. (1999b) Complement receptor type 3 plays an important role in development of protective immunity to primary and secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol Immunol.* 43: 1103-1106.
120. Langenegger, C. H. and Langenneger, J. (1984). Avaliação da sensibilidade alérgica da infecção por *Corynebacterium ovis* em caprinos. *An. 19º Congr. Bras. Med. Vet., Belém, Pará*, p. 120.
121. Langenegger, C. H., Langenneger, J., Costa, S. G. (1987). Alérgeno para diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos *Pesqui Vet Bras* 7, 2: 27-32.
122. Lee, S., and Lynch, K. R. (2005). Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 391: 317-323.
123. León-Vizcaíno, L., Garrido, A. F; González, C. M., Cubero, P. M. (2002). Anatomía Patológica de la Pseudotuberculosis en: *Artículos Técnicos de Sanidad Animal Sa008. OVIS*, 78. p. 1-21
124. Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K. and Ledbetter, J. A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174: 561-569.
125. Lipsky, B. A., Goldberger, A. C., Tompkins, L. S., Plorde, J. J. (1982) Infections caused by non-diphtheria corynebacteria. *Rev. Infect. Dis.* 4: 1220-1235.
126. Liu, D. T., Chan, W. M., Fan, D. S., Lam, D. S. (2005). An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Br. J. Ophthalmol.* 89: 245-246.
127. Lund, A., Torbjorn, A., Larsen, H. J and Steine, T. (1982a). Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. *Acta Vet. Scand.* 23: 473-482.
128. Lund, A. and Almlid, T. (1982b). Colostral transfer in the goat of antibodies against *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the antibodies status of kids during the first 10 months of life. *Acta Vet. Scand.* 23: 483-489.
129. Mackaness, G. B. (1970). The monocyte in cellular immunity. *Semin. Hematol.* 7, 2: 172-184.
130. McKean, C. S., Davies, K. J., Moore, J. R. (2007). Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: The major virulence factor phospholipase D is downregulated at 43°C. *Res. Microbiol.* 158: 279-286.

131. McNamara, P. J., Bradley, G. A. and Songer, J. G. (1994). Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 12: 921-930.
132. Mc Namara, P. J., Cuevas, W. A., Songer, J. G. (1995). Toxic phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequences homology. *Gene* 156: 113-118.
133. Mahdy, E. A. (1989). Chromosomal localization of the ovine major histocompatibility complex (OLA) by in situ hibridation. *Heritance* 111: 860-865.
134. Maier, T. and Oels, H. C. (1972). Role of the macrophage in natural resistance to salmonellosis in mice. *Infect. Immun.* 6: 438-443.
135. Maki, L. R.; Shen, S. H.; Bergstrom, R. C.; Stetenbach, L. (1985). Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep, using an enzyme linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 46, 1: 212-214.
136. Malone, F. E., Fee, S. A., Kamp, E. M., King, D. C.; Baird, G. J., O'Reilly, K. M., Murdock, F. E. A. (2006). A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of sheep. *Ir Vet J* 59: 19-21.
137. Manteca, C., Zorrilla, I., De Mora, F., Fariñas, F., Martin, S., Suárez, S. (2004). Protección inmunológica activa. Vacunas y vacunación en: Guía CEVAC de Inmunología en Ganado Ovino. 1ª ed. Edit. CEVA Salud Animal, España
138. Menzies, P. I., Muckle, C. A., Brodgen, K. A. and Robinson, L. (1991). A field trial to evaluate a whole cell vaccine for the prevention of caseous lymphadenitis in sheep and goat flocks. *Can. J. Vet. Res.* 55: 362-366.
139. Menzies, P. I., Muckle, C. A., Hwang, Y. T, Songer, J. G. (1994). Evaluation of an Enzyme-linked immunosorbent assay using and *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Small Rumin. Res.* 13, 2: 193-198.
140. Meyer, R., Regis, L., Vale, B., Paule, R., Carminati, R., Bahia, L., Moura-Costa, R., Schaer, I., Freire, S. (2005). In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 107: 279-254.
141. Mills, A. E., Mitchell, R. D., Lim, E. K (1997). *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. *Pathology* 29: 231-233.
142. Montaña, Hirose, J. A. (2005). Complejo Principal de Histocompatibilidad en Temas Selectos de Inmunología Veterinaria. Edit. El manual moderno. 1ª edición. Mexico. p.p. 47-51.
143. Moore, R. J. Rothel, L., Krywult, J., Radford, A. J., Lund, K. and Hodgson, A. L. (2000). Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine* 18: 487-497.
144. Moore, R. J., Stewart, D. J., Lund, K., Hodgson, A. L. (2001). Vaccination against ovine footrot using a live bacterial vector to deliver basic protease antigen. *FEMS Microbiol. Lett.* 194: 193-196.
145. Morilla, G. A. (1989). Inmunología General en Inmunología Veterinaria, 1ª edición. Editorial Diana, México. p.p. 23-32.

146. Muckle, C. A. and Gyles, C. L. (1983). Relation of lipid and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. *Am. J. Vet. Res* 44: 1149-1153.
147. Nairn, M. E. and Robertson, J. P. (1974) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. *Aust. Vet. J.* 50: 537-542.
148. O'Reilly, K. M.; Medley, G.F.; Green, L. E. (2010). The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing abscesses. *Prev. Vet. Med.* 95: 115-126.
149. Pacheco, L. G., Pena, R. R., Castro, T. L., Dorella, F. A., Bahia, C., Carminati, R., Frota, M. N. L., Oliveira, S. C., Meyer, R., Alves, F. S. F., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* 56: 480-486.
150. Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, A. J., Gimenez, N. M and Collins, D. M. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S *rRNA* gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 724-728.
151. Paton, M. W., Mercy, A. R., Sutherland, S. S., Ellis, T. M. (1988). The influence of shearing and age on the incidence of caseous lymphadenitis in Australia sheep flocks. *Acta Vet. Scand.* 84 (Suppl.1): 101-103.
152. Paton, M. W., Rose, I. R., Hart, R. A., Sutherland, S. S., Mercy A. R., Ellis, T. M., Dhaliwal, J. A. (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust. Vet. J.* 71: 47-49.
153. Paton, M. W., Sutherland, S. S., Rose, I. R., Hart, R. A., Mercy, A. R., Ellis, T. M. (1995). The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. *Aust. Vet. J.* 72: 266-269.
154. Paton, M. W., Buller, N. B., Rose, I. R., and Ellis, T. M. (2002). Effect of the interval between shearing and dipping on the spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Sheep* 80: 494-496.
155. Paton, M. W., Walker, S. B., Rose, I. R., Watt, G. T. (2003). Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.* 81: 91-95.
156. Paule, B. J. A., Meyer, R., Costa-Moura, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Regis, L. F., Vale, V. L. C., Freire, S. M., Nascimento, R., Schaer, R. and Azevedo, V. (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* 34: 311-316.
157. Peel, M. M., Palmer, G. G., Stacpoole A. M., Kerr, T. G. (1997). Human Lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* 24: 185-191.
158. Pepin, M., Pardon, P., Lantier, F., Marly, J., Levieux, D. and Lamand, M. (1991a). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet. Microbiol.* 26: 381-392.
159. Pepin, M., Fontaine, J.J., Pardon, P., Marly, J. and Parodi, A.L. (1991b). Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Vet. Microbiol.* 29: 123-124.

160. Pepin, M., Cennella, D., Fontaine J. J., Pittet, J. C. and Le Pape, A. (1992). Ovine mononuclear phagocytes in situ: identification by monoclonal antibodies and involvement in experimental piogranulomas. *J Leukoc. Biol.* 51: 188-198.
161. Pepin, M., Bernard, S., Menanteau, P., Olivier, M., Berthon, P., Lantier, F. (1993) Reactivity of workshop monoclonal antibodies with normal and pathological ovine lymph nodes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 39: 249-267.
162. Pepin, M. and Hodgson, A.I. (1994). Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Current Topics in Vet. Res.* 1: 63-82.
163. Pepin, M, Pittet J.C., Olivier, M. and Gohin, I. (1994) Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *J. Leukoc. Biol.* 56: 665 - 670.
164. Pepin, M., Seow, H. F., Corner, L., Rothel, J. S., Hodgson, A. L. M., Wood, P. R. (1997). Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Veterinary Research*, 28, 149-163.
165. Pérez, M. J., Suárez, G. F., Flores, C. R. (1990). Mecanismos de patogenicidad bacteriana en: *Bacteriología General: Principios Químico Biológicos*. 1ª edición. FMVZ, UNAM. México. p.p. 15-20
166. Pijoan, A. P. y Tortora, P. J. L., editores. (1986). *Linfadenitis Caseosa en: Principales enfermedades de los ovinos y caprinos*. 1ª ed., Mexico. p.p. 235-239.
167. Piontkowski, M. D., and Shivvers, D. W. (1998). Evaluation of commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212: 1765-1768.
168. Piontkowski, M. D. (2001). Caseous Lymphadenitis in Sheep. Internet: http://www.colorado-serum.com/vets/vol_1/vol_4.htm.
169. Playfair, J. H. L. (1992). *Complement in: Immunology at a glance*, 5th edition. Blackwell Scientific Publications, Great Britain.
170. Prescott, J. F., Menzies, P. I. and Hwang, Y-T. (2002). An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. *Vet. Microbiol.* 88:287-297.
171. Pugh, D. G. *et al.* (2002). Chapter 5: Diseases of the respiratory system and Chapter 8: Diseases of the integumentary system in: *Sheep and Goat Medicine* 1st edition; Saunders, Philadelphia.
172. Quinn, J. P., Markey, K. B., Carter, E. M., Donnelly, J. W., Leonard, C. F. (2002a) *Corynebacterium* species in *Veterinary microbiology and microbial disease*, 1st edition Blackwell Publishing; United Kingdom. p. 57.
173. Quinn, J. P., Markey, K. B., Carter, E. M., Donnelly, J. W., Leonard, C. F. (2002b). *Infection and Immunity in Veterinary Microbiology and microbial diseases*, 1st edition. Blackwell Publishing. United Kingdom. p. p. 495-515.
174. Radford, A. J., Hodgson, A. L. M., Rothel, J. S. and Wood, P. R. (1991). Cloning and sequencing of the ovine gamma-interferon gene. *Aust. Vet. J.* 68: 82-84.
175. Radostis, O. M, Gay, C. C., Blood, D. C. and Hinchclift, K. W. (2001). *Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9ª edición Vol. I McGraw-Hill. Madrid, España. p.p. 863-866.
176. Ramírez, C. C., Valero, E. G., Pijoan, A. C. (1992) Infección experimental de la Linfadenitis Caseosa en ovinos. *Tec. Pec. Mex.* Vol. 30: 100-108.

177. Renshaw, H. W., Graff, V. P., Gates N. L. (1979). Visceral Caseous Lymphadenitis in thin ewe syndrome: isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Moraxella spp.* from internal abscesses in emaciated ewes. Am. J. Vet. Res. 40: 1110-1114.
178. Richard, Y., Fontaine, M., Oudart, J. and Fontain, M. P. (1979). Contribution a l'étude de l'épidémiologie et de la pathogénie de la maladie des abcès du mouton. Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis., 2: 125-148.
179. Roth, A. J., Henderson, M. L. Trad. Angela L. Jure. (2003). Nuevas tecnologías destinadas a mejorar la seguridad y la eficacia de las vacunas en: Inmunología. Clínicas Veterinarias de Norteamérica. Práctica clínica en animales de producción. 1ª ed. Interamericana, Buenos Aires. p.p 129-141.
180. Rothel, J. S., Boyle, D. B., Both, G. W., Pye, A. D., Waterkeyn, J. G., Wood, P. R. and Lightowlers, M. W. (1997). Sequential nucleic acid and recombinant adenovirus vaccination induces host-protective immune responses against *Taenia ovis* infection in sheep. Parasit Immunol. 19: 221-227.
181. Ruiz, J. L, Barrera, M., Peralta, E. L., Frías, M. T. (2000). Estandarización de un ELISA indirecto para el diagnóstico de Linfadenitis Caseosa Ovina. Rev. Cub. Cienc. Vet. 26, 1: 20-23.
182. Ruiz, L., Jerónimo, R., Barrera, Valle, M., Frías, M. T. (2007) Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. RECVET, Vol. II, No. 8.
183. Ruiz, L., Jerónimo R., Barrera Valle, M., Frías, M. T. (2008) Linfadenitis Caseosa II: Diagnóstico, control y aspectos epizootiológicos. RECVET, Vol. III, No. 4.
184. Salyers, A. A., Whitt, D. D. (1994). Host Defenses against Bacterial Pathogens: Defenses of Tissue and Blood in: Bacterial Pathogenesis. A molecular Approach. 2nd ed. Edit. ASM Press. USA. p.p. 16-28.
185. Sánchez, V. J. M. (2001). Curso de introducción a la inmunología porcina. Internet al servicio de la ciencia y la tecnología.
186. Schmiel, D. H. and Millar, V. L. (1999). Bacterial phospholipase and pathogenesis. Microbes Infect. 1: 1103-1112.
187. Schreuder, B. E. C., Ter Laak, F. A., and Grieson, H. W. (1986). An outbreak of caseous lymphadenitis in dairy goats: first report of the disease in the Netherlands. Vet. Q. 81: 61-67.
188. Schreuder, B. E. C., Ter Laak, F.A., De Gee, A. L. W. (1990) *Corynebacterium pseudotuberculosis* in milk of Caseous Lymphadenitis affected goats. Vet. Rec. 127: 387.
189. Schreuder, B. E. C., Ter Laak, F. A., Derckesen, D. P. (1994). Eradication of caseous lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed ELISA technique. Vet. Rec. 135: 174-176.
190. Schrijver, R. S., Longedijk, J. P., Keil, G. M., Middel, W. G., Maris-Veldhuis, m., Oirschot, J. T. and Rijsewijk, F. (1997). Immunization of cattle with BHVI vector vaccine or a DNA vaccine both encoding for the G protein of BRSV. Vaccine. 15: 561-569.
191. Shen D. T., Jen, L. W., Gorham, J. R. (1982). The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Proceeding 3rd International Conference on Goat production and disease. Tucson, Arizona. p. p. 445-448.

192. Shigidi, A. M. T. (1978). An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Res. Vet. Sci. 24: 57-60.
193. Simmons, C. P., Dunstan, J. S., Tachedjian, M., Krywult, J., Hodgson, M. L. A. and Strugnell, A. R. (1998). Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. Infect. Immun. 66: 474-479.
194. Simmons, C. P. Hodgson, A. L., and Strugnell, R. A. (1997). Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infect. Immun. 65: 3048-3056.
195. Skalka, B., Literaky, I., Chalupa, P., Votavam, M. (1998). Phospholipase D-Neutralization in serodiagnosis of *Arcanobacterium haemolyticum* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. Zent. Bl. Bakteriologie. 228: 463-470.
196. Smith, M. C. and Sherman, D. M. (1994). Subcutaneous swellings in Goat Medicine, 1st edition. Lea & Febiger. United States. 46-47.
197. Songer, J. G., Libby, S., Iandolo, J. J., Cuevas, W. A. (1990). Cloning and expression of phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 58, 1: 131-136.
198. Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends. Microbiol. 5:156-160.
199. Songer, J. G. (2000). Caseous Lymphadenitis in Goats. Internet: <http://www.goatworld.com/article/cl.shtml>.
200. Songer, J. G. (2005). Bacterial and Fungal agents of animal disease in: Veterinary Microbiology, 1st edition. Elsevier Saunders. United Kingdom. p.p. 265-270
201. Stanford, K., Brodgen, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C., Audibert, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. Can. J. Vet. Res. 62: 38-43.
202. Stapleton, S., Bradshaw, B., O'Keneddy, R. (2009). Development of a surface plasmon resonance-based assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. Anal. Chim. Acta. 651: 98-104.
203. Stoops, S. G., Renshaw, H. W., and Thilsted, J. P. (1984). Ovine Caseous Lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. American J. Vet. Res. 45: 557-561.
204. Sutherland S. S., Ellis T. M., Mercy A. R., Paton M., Middleton, H. (1987). Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. Aust. Vet. J. 64, 9: 263-266.
205. Tambourgi D. V., Sousa Da Silva M., Billington, S. J., De Andrade, R. M., Gonçaves, Magnoli, F. C., Songer, J. G., van den Berg, C. W. (2002). Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases, Immunology 107: 93-101.
206. Tachedjian, M., Krywult, J., Moore, R. J. and Hodgson, A. L. (1995). Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. Vaccine, 13: 1785-1792.
207. Tashjian, J. J., and Campbell, S. G., (1983). Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. Am. J. Vet. Res. 44: 690-693.

208. Ter Laak, E. A.; Schreuder B. E. (1991). Serological diagnosis of caseous lymphadenitis in goat and sheep. *Vet. Rec.* 128, 18: 436-438.
209. Ter Laak, E. A., Bosch J.; Bijl C. G.; Schreuder B. E. C. (1992). Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 53, 7: 1125-1132.
210. Ternynck, Th., Avrameas, S. (1989). Técnicas Inmunoenzimáticas. Grupo Editorial Iberoamérica, p.p. 128-138.
211. Titball, R.W. (1993). Bacterial phospholipases. *C. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57: 347-366.
212. Tizard, I.R. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria, 8ª edición. Elsevier. México.
213. Thompson, C. B. and Allison, J. P. (1997). The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Infect. Immun.* 7: 445-450.
214. Urquiza, P. M. P. Establecimiento de una prueba de ELISA para el diagnóstico de Linfadenitis Caseosa en cabras. (tesis de licenciatura) México, FESC-UNAM, 2007.
215. Vadillo, M. S., Piríz, D. S. y Yáñez, M. M. E. (2002). Genética Bacteriana en Manual de Microbiología Veterinaria, 1ª edición. McGraw Hill Interamericana. España. 115.
216. Valli, V. E. O., Parry, B. W. (1993). Caseous lymphadenitis in: Jubb, K.V.F., Kennedy, P. C., Palmer, N. (Eds.), *Pathology of Domestic Animals*, 4th ed. vol.3, Academic Press, San Diego. p. p. 238-240.
217. Villegas, A. E. Evaluación de la sensibilidad a diferentes desinfectantes in vitro en 30 cepas de *C. pseudotuberculosis*. (tesis de licenciatura). México FESC-UNAM, 1999.
218. Walker, J., Jackson H., Brandon, M. R. and Meeusen, E. (1991). Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of Caseous Lymphadenitis. *Clin. Exp. Immunol.* 86: 13-18.
219. Walker, J., Jackson. H.,J., Eggleton, D.,G., Meeusen, E.,N.,T., Wilson, M.,J. and Brandon, M.,R. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect. Immun.* 62: 2565-2567.
220. Williamson, L.H., (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17: 359–371.
221. Williamson, P. y Nairn, E. M. (1980). Lesions caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the scrotum of rams. *Aust. Vet. J.* 56: 496-498.
222. Wilson, M.,J., Brandon, R.,M. and Walker, J. (1995). Molecular and biochemical characterization of a protective 40 kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 63:206-211.
223. Yozwiak, M. L. and Songer, J. G. (1993). Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 54: 392-397.
224. Zayats, A. V., Smolyanina, I. I. (2005). Nano-opticas of surface Plasmon polatitons. *Phys Rep.* 408: 131-314.
225. Zaki, M. M. (1968). The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. *Res. Vet. Sci.* 9: 489-493.

15. GLOSARIO

Biosensor. Es un instrumento para la medición de parámetros biológicos o químicos. Suele combinar un componente de naturaleza biológica y otro fisicoquímico. Se compone de tres partes: el sensor biológico, el transductor y el detector.

CD28. Es el ligando de la familia B7 de proteínas (CD80 y CD86), que se expresa sobre las células B activadas y otras presentadoras de antígenos. Es un homodímero de subunidades de 45kDa que se encuentra en la mayor parte de las células T. Cumple una función primordial en la regulación de las respuestas de las células T.

CD80. Llamada también B7-1 es una glucoproteína que se expresa sobre los macrófagos presentadores de antígenos. Sus ligandos son CD28 y CTLA-4.

CD86. Esta glicoproteína de 60 kDa, conocida también como B7-2, se manifiesta sobre las células B presentadoras de antígenos. Sus ligandos son CD28 y CTLA-4.

Ligando. Término genérico que se aplica a las moléculas que se unen específicamente a un receptor.

Mitógeno: es un agente que induce mitosis y blastogénesis linfocitaria.

Mitógeno PWM: es una lecitina de la planta *Phytolacca americana* que produce blastogénesis linfocitaria de tipo B y T.

Operon. Unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interaccionan las proteínas codificadas por sus genes. Este complejo está formado por genes estructurales que codifican para la síntesis de proteínas (generalmente enzimas), que participan en vías metabólicas cuya expresión generalmente está regulada por otros dos factores de control, llamados: factor promotor y operador.

Plásmidos. Son elementos genéticos que se replican con independencia del cromosoma del hospedador. Casi todos los plásmidos concoidos son ADN bicatenarios. La mayor parte son circulares, pero también se conocen lineales. A diferencia de los virus, los plásmidos no tienen una forma extracelular, existiendo únicamente en el interior de las células.

Ratón knockout. Es un ratón modificado por ingeniería genética para que uno o más genes estén inactivados mediante una técnica llamada gen knockout. Su propósito es comprender el papel de un gen que ha sido secuenciado pero del que se desconoce su función o se conoce de forma incompleta. Inactivando el gen y estudiando las diferencias que presenta el ratón afectado se puede inferir la función probable de ese gen.

Sideróforo. Es un compuesto quelante de hierro secretado por microorganismos. El ion hierro Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por ende no puede ser utilizado por los microorganismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de Fe^{3+} , que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo. Muchos sideróforos son péptidos no ribosomales.

Transportadores ABC. Son proteínas de transmembrana que utilizan ATP para lograr ciertos procesos biológicos, que incluyen la translocación de muchos sustratos a través de las membranas y en procesos no relacionados al transporte como la translocación de ARN y DNA reparado. Estos transportan una variedad amplia de sustratos extracelular e

intracelularmente. Para las bacterias, son esenciales para la viabilidad, la virulencia y la patogenicidad, por ejemplo, los sistemas de adquisición del hierro ABC son efectores importantes de la virulencia.