



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Diseño de un candidato a inmunógeno oral para prevenir la Linfadenitis Caseosa en ovinos por medio de un acarreador.”**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:  
ERÉNDIRA DE LA FUENTE MANCERA

TUTOR PRINCIPAL  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO (FES- CUAUTITLÁN)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA (FES- CUAUTITLÁN)  
DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES (FMVZ)

PROFESOR INVITADO: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO (FES. CUAUTITLÁN)

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

JULIO, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**ELABORADO CON APOYO DE:**

Beca CONACYT No. 549319



Apoyo de Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) UNAM



Proyecto PAPIIT IN228516 PIAPI

## **AGRADEZCO**

**A la Dra. Susana Mendoza, al Dr. Abel Ciprian y al Dr. Francisco Suarez:**

Por su confianza, su guía y su respaldo dado durante mi tesis. Con respeto su alumna.

**Al Dr. David Quintanar y sus alumnos:**

Por brindarme su guía y apoyo. Gracias.

**A la M en C Sofía González Gallardo (UIM FESC):**

Por darme el apoyo para realizar las fotos de microscopia de barrido de mi investigación.

**A mis compañeros del laboratorio de virología de posgrado FESC:**

Por los gratos momentos que compartimos e impulsarme en cada momento.

**A mis amistades:**

Por siempre apoyarme, tener paciencia y motivarme.

“Versos, palabras, letras, puntos y comas”

**A mi familia, a los que se han marchado y a los que siguen presentes, y a mis amigos:**

Por estar siempre a mi lado, por no dejarme caer y por ser los pilares en mi vida.

**A mis padres:**

Ya que gracias a ellos he logrado obtener triunfos, por enseñarme a llevar la frente siempre en alto y porque nunca dudaron de mí. Con amor su hija.

# ÍNDICE

1. Resúmen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Linfadenitis Caseosa (LC)	
2.2 Etiología	
2.3 Factores de virulencia	
2.4 Patogenia	
2.5 Inmunidad	
2.6 Diagnóstico	
2.7 Tratamiento	
2.8 Prevención	
2.9 Control	
3. Justificación.....	14
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos.....	15
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos particulares	
6. Etapas del estudio.....	16
7. Material y Métodos.....	17
7.1 Material biológico	
7.2 Métodos	
8. Resultados.....	24
9. Discusión.....	36
10. Conclusiones.....	42
11. Recomendaciones.....	42
12. Referencias.....	43
13. Anexo 1.....	51

## 1. RESUMEN

La linfadenitis caseosa (LC) es responsable de importantes pérdidas económicas en la ovinocultura, las pérdidas incluyen disminución en la producción y calidad de la leche y de la lana, desórdenes reproductivos, decomiso total o parcial de las canales y depreciación de la piel. Para evitar la exposición del rebaño a la infección, los animales que se vayan a introducir deberán ser sometidos a observación, para la identificación de animales afectados. Dentro del rebaño se debe curar las heridas, principalmente por la esquila o malas instalaciones. En varios países la principal forma de control es la vacunación, sin embargo en México no se cuenta con vacuna comercial disponible.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un acarreador para el antígeno (somático y/o la toxina PLD) de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que puede ser utilizado como un candidato a inmunógeno oral en ovinos para estimular al sistema inmune.

La cepa de *C. pseudotuberculosis* se aisló e inoculó en caja de agar sangre, a partir de muestra; remitida al laboratorio de diagnóstico de Microbiología (FESC), proveniente de ovino clínicamente positivo a LC, el aislamiento se caracterizó bioquímicamente. La cepa 129 se sembró en medio agar y caldo de pleuropneumonical like organism (PPLO), para la obtención de biomasa y un extracto de PLD. La cantidad de proteína obtenida fue de 5558.8 mg/ml, 8811.06 mg/ml y 642.76 mg/ml, para el antígeno obtenido de medio PPLO, agar PPLO, y el extracto de PLD respectivamente. Los antígenos fueron evaluados posteriormente por Western Blot identificando una proteína antigénica de 31kDa para el extracto de PLD; y de 150, 125, 100, 75, 56, 50, 37, 31 y 25 kDa para la cepa 129 de *C. pseudotuberculosis*. Se realizó la inclusión en la vermiculita (bacteria, bacteria +PLD y PLD) se comprobó mediante su observación macroscópica y microscopía electrónica, teniendo una interacción de estos en la superficie, espacio interlaminar o túneles de la vermiculita. Se realizó la disolución de las tres matrices, para obtener el porcentaje de dispersión del antígeno, siendo la bacteria más PLD la que obtuvo mayor porcentaje.

En conclusión, la vermiculita por sus características puede ser ocupada como acarreador de los antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para su posible uso como inmunógeno

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Linfadenitis Caseosa (LC)

La linfadenitis caseosa es una enfermedad contagiosa de curso crónico, producida por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que afecta fundamentalmente a ovejas y cabras. Sin embargo, se han reportado aislamientos en otras especies como caballos, bovinos, llamas y alpacas; además la infección se ha reportado en los humanos, siendo una infección zoonótica (principalmente ocupacional). Se caracteriza por la aparición de lesiones caseosas en los linfonodos, en borregos, los más afectados son los linfonodos superficiales (parotídeo, retrofaríngeos laterales, mandibular, cervical superficial, isquiático, poplíteo e inguinal) y ocasionalmente, en otros órganos, también se ha descrito en casos graves de toxemia y anemia con emaciación que incluso conduce a la muerte (Baird y Fontaine, 2007; Braga *et al*, 2007; Dorella *et al*, 2006a; Estrvao *et al*, 2009; Fontaine y Baird, 2008; León *et al*, 2002; Ruiz *et al*, 2007; Trost *et al*, 2010; Lacasta *et al*, 2015; Moussa *et al*, 2016).

La linfadenitis caseosa es una enfermedad con importancia económica, principalmente en los ovinos, las pérdidas incluyen disminución en la producción y calidad de leche, disminución en la producción y calidad de la lana, desórdenes reproductivos, decomiso total o parcial de las canales y depreciación de la piel. También se reporta en pie de cría, lo que afecta negativamente el valor económico de estos animales y son un riesgo en la diseminación de la enfermedad hacia rebaños donde ingresen estos animales como reproductores (Baird y Fontaine, 2007; Seyffert y Guimáraes, 2010; Binns *et al*, 2007; Miranda, 2010; Jordan *et al*, 2011).

La linfadenitis caseosa está presente en los cinco continentes y casi en todas las zonas geográficas definidas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) (Baird y Fontaine, 2007; Fontaine y Baird, 2008; Ruiz *et al*, 2007; Lacasta *et al*, 2015).

## 2.2 Etiología

El género *Corynebacterium* es miembro de la rama filogenética del orden Actinomycetales. Con base en la composición de su pared y los lípidos, mantiene estrecha relación con los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, asociándose en el grupo CMNR (Dorella et al, 2006b; Eberle et al, 2015).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* es una bacteria Gram positiva, con forma bacilar corta y delgada o pleomórfica (0.5 a 0.6  $\mu\text{m}$  x 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ ), se observa aislada o agrupadas en parejas formando ángulos en V o L, en empalizadas o formando letras chinas. Es una bacteria intracelular facultativa y en agar sangre presenta  $\beta$  hemólisis, puede crecer bajo condiciones aerobias o anaerobias. En medios sólidos, las colonias son secas y friables. Después de una incubación por 24 hrs, se observan pequeñas colonias blanco amarillentas, que crecen e incrementan su diámetro de 1 -2 mm después de 48 h. El desarrollo de la bacteria se beneficia al agregar suero o sangre al agar (Baird y Fontaine, 2007; Dorella et al, 2006a; Fernández, 2009).

## 2.3 Factores de virulencia

### 2.3.1 Fosfolipasa D (PLD)

La fosfolipasa D es una potente exotoxina producida por la bacteria, es capaz de hidrolizar la esfingomiélin, siendo responsable de la hemólisis en agar sangre y también de la acción patógena sobre las membranas de los fagocitos. Además de promover la diseminación al incrementar la permeabilidad en la membrana endotelial vascular y permite la invasión de *C. pseudotuberculosis* en el drenaje linfático y de la necrosis durante la infección (Baird y Fontaine, 2007; Ruiz et al, 2007; Dorella et al, 2006b; Egen et al, 1989; Lacasta et al, 2015; Lajoie y Cordes, 2015).

### 2.3.2 Ácidos micólicos de la pared celular

Los ácidos micólicos (ácidos corinemicólicos) son elementos quimiotácticos para los fagocitos, en especial para los neutrófilos, tienen efecto leucotóxico que origina degeneración y lisis de macrófagos y polimorfonucleares. Esto contribuye en la formación de abscesos e inducen una resistencia a las enzimas lisosomales, además le da



resistencia a la bacteria en el ambiente (León *et al*, 2002; Baird y Fontaine, 2007; Binns *et al*, 2007; Estevao *et al*, 2009).

## **2.4 Patogenia**

La transmisión de *C. pseudotuberculosis* ocurre principalmente a través de heridas en piel, también puede ser por lesiones en mucosa. La infección crónica en pequeños rumiantes resulta en la formación de piogranulomas, presentándose en dos diferentes formas: a) la externa, conocida como cutánea o superficial, siendo característica la formación de abscesos en linfonodos superficiales o tejido subcutáneo, y b) la segunda forma es visceral o profunda, caracterizada por lesiones no observables externamente (Baird and Fontaine, 2007; Lacasta *et al*, 2015), afectándose comúnmente los linfonodos internos principalmente los mediastínicos, frecuentemente se propaga a órganos parenquimatosos como: pulmón, hígado, riñón, glándula mamaria o testículos y menos frecuente a corazón, cerebro, médula espinal, útero y articulaciones (Fontaine y Baird, 2008; Ellis *et al*, 1987).

## **2.5 Inmunidad**

*C. pseudotuberculosis* es una bacteria frente a la que se desarrolla una respuesta inmunitaria compleja, de tipo humoral y celular que recae sobre varios antígenos, la configuración antigénica de la pared celular bacteriana y sobre la fosfolipasa D (Ellis *et al*, 1991; Fontaine *et al*, 2006; Ruiz *et al*, 2007; Urquiza, 2007).

La infección en ovinos se asocia al aumento transitorio de temperatura, inflamación localizada y formación de abscesos en el sitio de infección y es probable que la bacteria se multiplique extracelularmente en el sitio de infección antes de localizarse en linfonodos (Pépin *et al*, 1991; Pépin *et al*, 1997).

El receptor del complemento tipo 3 (CR3) desempeña un papel importante en la defensa del hospedador contra la infección primaria y secundaria causadas por *C. pseudotuberculosis* (Lan *et al*, 1998; Miranda, 2010).

El interferón  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ), es producido por linfocitos CD4+, después de la estimulación por un antígeno, activa a los macrófagos. El factor de necrosis tumoral (TNF) es producido por macrófagos después de ser estimulados, provoca la activación de neutrófilos y macrófagos, incremento en la expresión de moléculas de adhesión en los leucocitos e incremento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). También puede causar la fiebre, la síntesis de proteínas de la fase aguda y la activación del sistema de coagulación (Gershwin *et al*, 1995).

Los niveles de expresión génica para la generación del TNF  $\alpha$  e INF  $\gamma$  son más elevados en el día siete post-inoculación este tiempo corresponde a una fase de amplificación en la formación de piogranulomas, destacando macrófagos y linfocitos. También se puede reconocer la fase de iniciación caracterizada con la llegada de neutrófilos al sitio de inoculación y a linfonodos, así como la fase de estabilización se caracteriza por la maduración y persistencia del piogranuloma (Guilloteau and Pépin, 1990; Pépin *et al*, 1991; Pépin *et al*, 1997; Lan *et al*, 1998).

La respuesta de macrófagos tiende a ser inespecífica, de modo que una vez activados son capaces de destruir una amplia variedad de bacterias. La activación de macrófagos es por la estimulación con INF  $\gamma$  e interleucina 2 (IL-2). Se ha observado que aquellos macrófagos no activados, al fagocitar muchas bacterias sufren una degeneración (primeras 6 h), en cambio los macrófagos activados resisten por el incremento de gránulos lisosomales; y las células polimorfonucleares (PMN) sufren degradación (hasta las 20 h) (Ayers, 1977).

La transferencia calostrala de anticuerpos es importante en la inmunidad adquirida naturalmente y se ha observado que los niveles de anticuerpos maternos se mantienen en los corderos hasta los dos meses y medio de edad, explicando el hecho de que rara vez se infectan corderos menores de tres meses de edad (Burrell, 1980; Hsu *et al*, 1985; Brown *et al*, 1986; Miranda, 2010).

Normalmente, los anticuerpos producidos contra *C. pseudotuberculosis* y su exotoxina son de tipo IgG e IgM (Husband y Watson, 1977).

## 2.6 Diagnóstico

El diagnóstico clínico es dado por la signología, los parámetros epidemiológicos y la morfolopatología de los abscesos siendo de carácter presuntivo a LC, por lo que es preciso en todos los casos un diagnóstico confirmativo de laboratorio (bacteriológico y/o inmunológico). Ayers, (1977) establece las fases del diagnóstico de LC en el campo y en el rastro (Imagen 1) (Ayers, 1977; Baird y Fontaine, 2007; Fontaine y Baird, 2008; Ruiz *et al*, 2008).

En la forma cutánea el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* del contenido de los abscesos es realmente fácil. Siendo de mayor dificultad el aislamiento en los animales que tienen la forma visceral, en los que generalmente se hace el hallazgo postmortem (Baird y Fontaine, 2007; Ferrer *et al*, 2009; Fontaine y Baird, 2008; Ruiz *et al*, 2008).

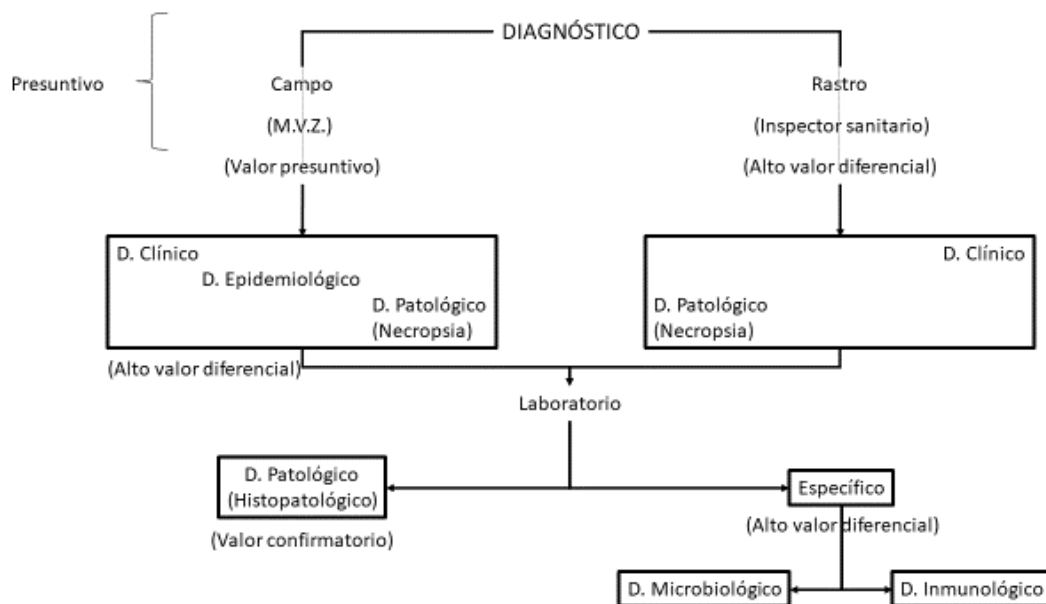


Imagen 1.- Esquema de las fases diagnósticas de la linfadenitis caseosa (Ayers, 1977).

### a) Diagnóstico clínico

La expresión clínica de la LC puede ser muy variada desde la forma superficial (linfadenitis cutánea) y la forma visceral (linfonodos internos y/o focos de necrosis caseosa en órganos parenquimatosos) (cuadro 1). La LC superficial se caracteriza por el aumento en el tamaño de los linfonodos superficiales por el foco purulento y a la

palpación se perciben duros, sin calor local e indoloro. Posteriormente, la consistencia cambia a pastosa hasta fistular y drenar el exudado purulento. En la LC visceral puede transcurrir de forma subclínica ya que no se afecta un órgano vital y de forma clínica mostrando emaciación o caquexia, problemas respiratorios crónicos o signos dependientes de los órganos afectados (Baird y Fontaine, 2007; Ferrer *et al*, 2009; Fontaine y Baird, 2008; Ruiz *et al*, 2008).

Cuadro 1.- Relación de los abscesos con el cuadro clínico en ovinos.

LC superficial	LC visceral
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lesión focalizada en un nódulo.</li> <li>• Reacción necrótica hacia la fluidificación del exudado purulento, al crónico con caseificación laminar concéntrica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necropsia o hallazgo en el rastro por síndrome respiratorio posterior y oveja seca.</li> <li>• Lesión focal de necrosis caseosa con laminación concéntrica y encapsulamiento fibroso.</li> </ul>

(Baird y Fontaine, 2007; Fontaine y Baird, 2008; Ruiz *et al*, 2008; León *et al*, 2002).

Para el diagnóstico morfológico la lesión representada por una laminación concéntrica de la necrosis caseificante “lesión de cebolla”, debe considerarse altamente presuntiva de LC. Absceso con exudado purulento cremoso de tonalidad verdosa amarillenta (León *et al*, 2002).

Algunas de las características epidemiológicas en la evolución temporal de un foco de LC, incluyen:

- a) Lapso desde la primoinfección hasta la aparición de los primeros casos de hasta 4 – 6 meses.
- b) Período de incremento de la prevalencia de tres a cinco años.
- c) Los brotes se dan después de la esquila, intervenciones quirúrgicas colectivas o posterior a la incorporación de nuevos animales.
- d) La edad de los enfermos es principalmente en adultos.

(Baird y Fontaine, 2007; Fontaine y Baird, 2008; Ruiz *et al*, 2008)

La linfadenitis caseosa se asocia a tres síndromes: linfadenitis piógena, respiratorio posterior y caquectizante. Para el síndrome abscedativo subcutáneo se consideran LC

(*Corynebacterium pseudotuberculosis*), piobacilosis (*Arcanobacterium pyogenes*) y enfermedad de los abscesos (*Staphylococcus aureus* subesp. *anaerobicus*). Para el síndrome respiratorio posterior, en especial el síndrome de caquexia, es necesario diferenciar tuberculosis y LC, se debe realizar el diagnóstico anatomopatológico pero no es concluyente (Baird y Fontaine, 2007; Fontaine y Baird, 2008; Muller *et al*, 2011; Ruiz *et al*, 2008).

#### b) Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico definitivo de LC es dado por el aislamiento e identificación del agente causal. En los focos de infección, el exudado presenta gran cantidad de corinebacterias, en lesiones más avanzadas es posible que el agente causal esté prácticamente ausente, dominando la reacción exudativa piógena sobre la proliferativa celular. (Baird y Fontaine, 2007; León *et al*, 2002; Miranda, 2010).

El agar sangre se emplea como el medio de aislamiento más utilizado, donde existirán colonias deslizables, presentando una tenue protuberancia (botonadas) y son opacas, con un borde liso, rodeadas de un halo de beta hemólisis. También se pueden emplear medios selectivos como: *Corynebacterium* selective agar (Merck), Muller tellurite agar (Difco) y agar chocolate – telurito, son medios enriquecidos con suero bovino o equino sangre, suplementados con telurito de potasio, en los que las colonias aparecen de color negro (Baird y Fontaine, 2007; Dorella *et al*, 2006a; Malone *et al*, 2010; Ruiz *et al*, 2008).

El sistema miniaturizado de identificación bacteriana API, API Coryne se muestra eficaz en la identificación y diferenciación de corinebacterias (Dorella *et al*, 2006a).

En la reacción de la prueba de caracterización bacteriana CAMP se observa un sinergismo entre la hemolisina (factor equi) de *Rhodococcus equi* y *C. pseudotuberculosis*. En contraste existe la inhibición de hemólisis (inhibición de CAMP) en donde la PLD de *C. pseudotuberculosis* y la  $\beta$  hemolisina de *Staphylococcus aureus*. (Baird y Fontaine, 2007; Dorella *et al*, 2006b)

### c) Diagnóstico inmunológico

Al ser una bacteria intracelular facultativa, por la liberación de la PLD y por su pared celular produce una respuesta inmunitaria humoral y celular. Siendo de importancia para el diagnóstico en aquellos animales que no presenten signos clínicos por ser portadores de lesiones internas o bien estar en periodo de incubación. Por lo que existen una gran variedad de pruebas inmunológicas, a su vez diferentes muestras como suero, leche o sangre pueden ser utilizadas (Dercksen *et al*, 2000; Dorella *et al*, 2006a; Gurmaraes *et al*, 2009; Miranda, 2010; McKean *et al*, 2005; Oreiby and Hegazy, 2016).

#### i) Prueba cutánea

Método empleado para verificar infecciones causadas por microorganismos intracelulares y estado inmunológico mediado por células (Hard, 1970). Donde se induce la formación de una población de células mononucleares especializadas en fagocitar y destruir microorganismos (Mackness, 1970). El primero en intentarlo fue Cesari (1930), que inoculó y cultivó un filtrado de la corinebacteria en cobayos, proponiendo su uso para el diagnóstico de la enfermedad en carneros. Carne (1978), realizó la prueba con toxina teniendo reacciones irregulares y concluyendo no ser adecuada para el diagnóstico de LC. Alves en 1999 concluye, que es fundamental la purificación del antígeno para la prueba intradérmica de LC y el uso de un antígeno específico puede favorecer el diagnóstico a nivel del campo, y así poder detectar la infección subclínica en rebaños.

#### ii) Prueba de aglutinación

Está basada en las aglutininas que aparecen pronto tras la infección. Cameron (1973) empleó la prueba, con resultados poco alentadores, por el contrario Award (1960), empleando una cepa de corinebacteria con menor grado de aglutinación alcanzó buenos resultados.

#### iii) Fijación del complemento (CF)

Igual que en la aglutinación, los animales infectados seroconvierten a la tercera semana de la infección pero después de dos meses resultan negativos, por lo que no es recomendable para el diagnóstico de LC crónica. Siendo una prueba con la facilidad de detectar anticuerpos rápidamente después de una semana post infección (Miranda, 2010).

iv) Inhibición de la  $\beta$  hemolisina (I.B.H.)

Se incuba el suero problema con PLD, eritrocitos de bovino y la hemolisina del estafilococo. Los anticuerpos específicos de la toxina de la corinebacteria presentes en el suero neutralizan la exotoxina, la hemolisina del estafilococo en ausencia lisa los eritrocitos. Detecta infecciones a partir de la tercera semana post infección pero falla después de cinco meses post infección (Miranda, 2010).

v) Inhibición de la hemólisis para la detección de anticuerpos contra la exotoxina de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Consiste en la inhibición de la actividad hemolítica de la exotoxina; por el suero inmune de ovinos, pudiendo detectar animales afectados subclínicamente y antitoxina en el suero de corderos amamantados por hembras que presenten títulos positivos al momento de realizar la prueba (Burrell, 1980).

vi) Prueba de inhibición de la hemólisis sinérgica (I.H.S.)

Detecta anticuerpos formados contra la exotoxina de *C. pseudotuberculosis*, originalmente inventada para caballos, utilizando la PLD en eritrocitos tratados previamente con un filtrado estéril de la fosfolipasa C producida por *Rhodococcus equi*. Mostrando ser 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*, 1986).

vii) Prueba de hemoaglutinación indirecta (IHA), aglutinación en tubo (TA)

Se basa esta técnica en la propiedad que muestran los eritrocitos de cordero sensibilizados con formol y bis – dia-zobencidina de aglutinar en presencia de anticuerpos de la corinebacteria. Pudiendo diagnosticar infecciones precoces como también las crónicas (Ruiz *et al*, 2002).

viii) Técnica de inmunodifusión doble

Se realiza en gel de agarosa, donde se hacen pozos, uno central (antígeno) y seis alrededor del central (sueros). Como antígeno se utiliza la exotoxina (sobrenadante no concentrado) y el suero problema como reactivos. Dando como positivo aquellos sueros donde se produzca una línea de precipitación. Probando ser un método económico y práctico, pudiendo tener resultados a las 24 h (Urquiza, 2007; Burrell, 1980).

ix) Inmunoensayos (ELISA)

Basados en los principios de interacción antígeno- anticuerpo en placas de plástico. El principio básico del método indirecto de la prueba de ELISA es un antígeno adherido en la placa, dilución del suero, un anti- anticuerpo unido a una enzima y un sustrato, obteniendo una coloración la cual es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo (Baird y Fontaine, 2007).

Se han utilizado como antígenos de fase sólida como: la pared celular, células integras o sonicadas (Kaba *et al*, 2001; Maki *et al*, 1985). También se ha utilizado el antígeno en fase líquida como la toxina (Chikamatsu *et al*, 1989; Menzies *et al*, 1994; Ter Laak *et al*, 1992; Seyffert y Guimarães, 2010).

Las pruebas de ELISA realizadas se han utilizado para caprinos y ovinos, teniendo resultados prometedores y recomendadas como una buena alternativa del diagnóstico de la infección por *C. pseudotuberculosis*. En varias ocasiones, hasta se ha podido emplear para obtener datos de prevalencia y utilizarla para establecer programas de erradicación de la LC en los rebaños (Chirino – Zárraga *et al*, 2009; Dorella *et al*, 2006b; Binns *et al*, 2007; Ruiz *et al*, 2008; Ter Laak *et al*, 1992).

x) Detección de respuesta de interferón gamma (INF –  $\gamma$ )

Ensayo basado en la detección de respuesta a antígenos celulares completos. Teniendo pruebas tanto para ovinos y caprinos. Observando, que la inmunización por la vacuna no interfiere, sugiriendo que la prueba tiene valor para detectar la infección y ser utilizada en los programas de control de la LC. Actualmente no solo se realiza a nivel de suero sino también en leche (Prescott *et al*, 2002; Menzies *et al*, 2004; Meyer *et al*, 2005; Sunil *et al*, 2008; Oreiby and Hegazy, 2016).

d) Diagnóstico molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Permite la amplificación directa de segmentos de ADN específicos de *C. pseudotuberculosis* sin necesidad de clonación (D'Afonseca, 2010). Se ha utilizado la amplificación de un fragmento de 815 pares de bases, del gen 16S rRNA (Çetinkaya 2002; Baird 2007) También se ha empleado una prueba de PCR múltiple (mPCR) que incluye iniciadores de tres regiones genéticas (16S rRNA, *rpoB*, y *pld*) (Baird y Fontaine, 2007; Retmal *et al*, 2011; Çetinkaya *et al*, 2002).



## 2.7 Tratamiento

El tratamiento con antibiótico parenteral no es efectivo por la fibrosis presentada en los abscesos, la presencia del exudado purulento y la naturaleza intracelular de la bacteria. Por lo que, el tratamiento paliativo se realiza localmente (cuando se trata del cuadro superficial) y se puede hacer por medio de la debridación del absceso retirando el contenido purulento, o realizando una disección de toda la lesión y se retira quirúrgicamente (Baird y Baird, 2007; O'Reilly *et al*, 2010; Fontaine y Baird, 2008).

## 2.8 Prevención

Para evitar la exposición del rebaño a la infección, los animales que se vayan a introducir, deberán ser sometidos a observación para la identificación de animales afectados. En caso de ser ovinos de lana, curar las lesiones causadas por la esquila y dar una limpieza y desinfección al instrumento cada vez que se utilice (Baird y Fontaine, 2007; Fontaine y Baird, 2008; Dorella *et al*, 2006a; Miranda, 2010).

Se cuenta con diferentes tipos de vacunas experimentales como: bacterinas, toxoides, bacterinas- toxoides, atenuadas, y de ADN.

También se cuentan con vacunas comerciales que incluyen toxoides de diferentes especies clostridiales (Glanvac-6) y mezclas de biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Todas estas vacunas con resultados diferentes, sin evitar la infección del rebaño (Lacasta *et al*, 2015; Moussa *et al*, 2016). Además no todas las vacunas desarrolladas para borregos son funcionales para cabras y a la inversa (Ruiz *et al*, 2011). En varios países la principal forma de control de la linfadenitis caseosa es con la vacunación, como es el caso de Australia donde han disminuido hasta un 20% la prevalencia. En algunos de estos países tienen acceso a vacunas comerciales como la Glanvac – 6, sin embargo en México no se cuenta con vacunas comerciales disponibles (Fontaine y Baird, 2008; Ruiz *et al*, 2008; Cubero *et al*, 2002).

## 2.9 Control

El control se vuelve vital dentro del rebaño, ya que el exudado purulento cuenta con un concentración de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo (U.F.C./g), la ruptura del absceso es suficiente para la contaminación del ambiente. La capacidad de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir en la tierra y en los fómites, permite la continua presencia del mismo (Ruiz *et al*, 2008; Fontaine y Baird, 2008).

La medicación con antibacterianos es ineficaz, debido a que no pueden difundirse por el absceso entre el material purulento y otro factor a considerar es una bacteria intracelular. Debido a esto, se deben de llevar acabo otras estrategias, como las que a continuación se mencionan (Baird y Fontaine, 2007; Fontaine y Baird, 2008; Dorella *et al*, 2006; O'Reilly *et al*, 2010):

- a) La mayor recomendación es la debridación del absceso retirando el contenido purulento, o realizando una disección de toda la lesión y se retira quirúrgicamente (Baird y Fontaine, 2007; O'Reilly *et al*, 2010).
- b) Separar a las crías de sus madres después del parto y alimentarlas con calostro y leche sustituta. Manejar a las crías en un rebaño independiente, con la finalidad de disponer de animales de reposición seronegativos. (Cubero *et al*, 2002)

Apoyando con la vacunación se propone un programa de saneamiento: detectar los animales infectados, eliminar todo animal positivo al diagnóstico con o sin signos, vacunación de aquellos en riesgo y medidas generales de higiene (Ruiz *et al*, 2008; Cubero *et al*, 2002; Dorella *et al*, 2006b; Gaabary *et al*, 2010; Guimaraes *et al*, 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que no existen vacunas disponibles en México y que las existentes no muestran la actividad deseada es necesario el desarrollo de nuevos inmunógenos. Aunque se conoce que la vía de transmisión es por mucosas (oral e inhalación de aerosoles) y heridas en la piel no se tiene mayor estudio de vacunación por mucosas. Se tiene como antecedente a Hodgson *et al* (1994), que administraron una sola dosis con PBS por vía oral de Toxminus (cepa de *C. pseudotuberculosis* mutante), aunque tuvieron protección al desafío e indujeron una respuesta humoral no presentó una buena estimulación de linfocitos Th1. Además muestrearon las heces de los animales vacunados aislando la cepa Toxminus.

Por lo anterior se propone la utilización de un acarreador que permita tener contacto del antígeno por mayor tiempo y poder tener mayor estimulación del sistema inmune. Se encontró que los minerales de arcilla (ej. Vermiculita) pueden interactuar con diferentes polímeros, tanto naturales como sintéticos, con la superficie externa y también penetrar en los espacios nanoestructurales, agujeros y túneles.

#### 4. HIPÓTESIS

Si la vermiculita funciona como acarreador de antígenos (PLD y/o somático) de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, entonces, este candidato a inmunógeno puede ser administrado por vía oral.

#### 5. OBJETIVOS

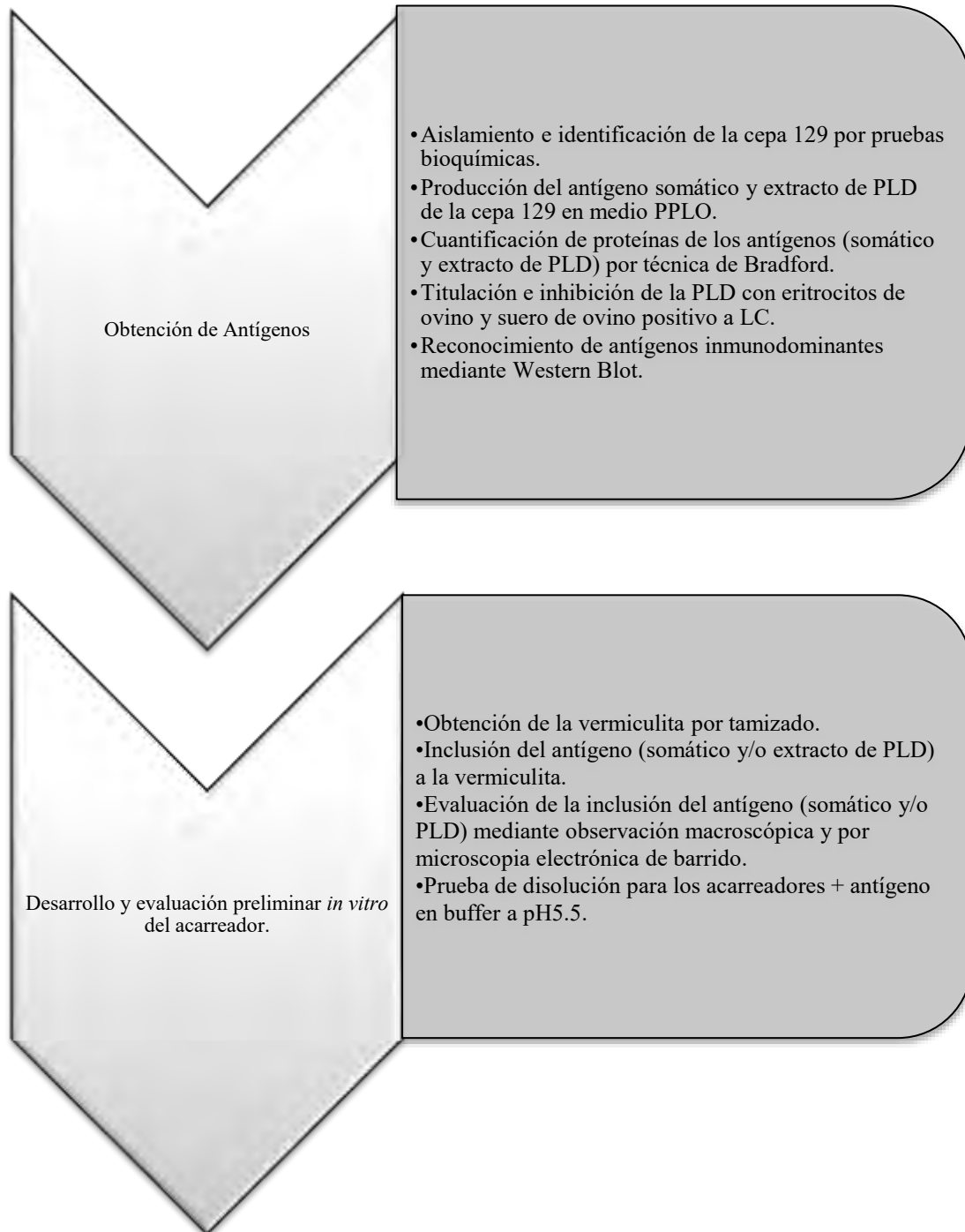
##### 5.1 Objetivo general

Desarrollar un acarreador para el antígeno (somático y/o el extracto de PLD) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante la vermiculita que será utilizado como un candidato a inmunógeno oral en ovinos.

##### 5.2 Objetivos particulares

- ⊙ Aislar e identificar la cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante pruebas bioquímicas y la  $\beta$  hemólisis en agar sangre para obtener los antígenos.
- ⊙ Producir un antígeno somático y un extracto de PLD utilizando una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para la inclusión a la vermiculita.
- ⊙ Elaborar la prueba de titulación de la PLD y la inhibición de la hemólisis mediante glóbulos rojos de ovino y el efecto lítico de la PLD para determinar la presencia de la PLD en el extracto y la protección contra la PLD.
- ⊙ Realizar el Western Blot mediante el antígeno somático y el extracto de PLD para reconocer las proteínas inmunodominantes de las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- ⊙ Evaluar la vermiculita y la inclusión de los antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante pruebas *in vitro* para obtener un acarreador.

## 6. ETAPAS DEL ESTUDIO



## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

- Cepa 129 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (obtenida a partir de exudado de absceso de ovino, remitida al laboratorio de Microbiología e Inmunología de la FES- Cuautitlán) y cepa de referencia *Corynebacterium pseudotuberculosis* biotipo *ovis* ATCC 43924 (donada por laboratorio de Microbiología e Inmunología de la FES- Cuautitlán).
- Sueros de ovinos procedentes de unidades productivas en Irapuato, Guanajuato positivos a LC (alícuotas de 1 ml en congelación).
- Glóbulos rojos de ovino sanos, conservados en solución de Alsevier's (2:1) y en refrigeración hasta su uso.
- Albumina sérica bovina (1mg/ml) stock.

### 7.2 MÉTODOS

#### 7.2.1 Aislamiento

La cepa 129 (donada por el servicio de diagnóstico del laboratorio de microbiología de la FESC Campo 4) se inoculó en agar sangre y agar PPLO por la técnica americana y se incubó a 37° C por 48 hrs (Chirino – Zárraga *et al*, 2006).

#### 7.2.2 Identificación

Aquellas colonias características de *C. pseudotuberculosis* se les realizó la tinción de Gram, al observar al microscopio bacterias Gram (+), puras, con morfología característica y agrupadas en letras chinas, se procedió a la realización de las pruebas primarias y secundarias (Chirino – Zárraga *et al*, 2006).

#### 7.2.3 Obtención de antígenos (somático y PLD) de *C. pseudotuberculosis*

El método para la obtención del antígeno será de acuerdo a Kaba *et al*, (2001) con algunas modificaciones. Se utilizó la cepa 129 pura e identificada de *C. pseudotuberculosis* y la cepa ATTC, las cuales se sembraron en agar PPLO y caldo PPLO - 1%. Tween 20.

A) Extracto de bacteria en caldo PPLO.

1. Se cultivó en agar sangre la cepa a 37° C por 48 h.
2. La cepa se estandarizó al tubo 1 del Nefelómetro de Macfarlán y se inoculó con 1ml en los 250 ml de caldo PPLO + 0.1% Tween 20, incubando a 37° C por 72 hrs.
3. Se expandió el caldo obtenido con 250 ml de caldo PPLO + 0.1% Tween 20 y se volvió a incubar a 37° C por 48 hrs.
4. Se centrifugó a 6000rpm / 15 min / 4° C y el pellet se suspendió en PBS (phosphate buffer saline). El sobrenadante se ocupó para la obtención de la PLD.
5. Se lavó 3 veces centrifugando a 10000 rpm / 10 min / 4°C. El pellet se resuspendió en cada lavado.
6. El pellet se concentró en 1ml de PBS y se homogenizó.
7. Se tomó 200 µl del antígeno concentrado y se centrifugó (mismas constantes que en el lavado).
8. El pellet se resuspendió en 1ml de buffer de preparación de antígeno.
9. Se calentó a 90° C / 10 min.
10. Se centrifugó a 10000 rpm / 10 min
11. Se extrajo el sobrenadante y se congeló a -20° C, hasta su uso.

B) Obtención de la PLD del sobrenadante del medio PPLO.

1. El sobrenadante del medio PPLO se prefiltró (prefiltro+ 0.45mm + prefiltró 0.22mm).
2. Lo obtenido se filtró con membranas Millipore de 0.22 µm de diámetro.
3. El sobrenadante filtrado se congeló a -20°C hasta su uso.

C) Extracto de bacteria en agar PPLO

1. La cepa se cultivó en agar sangre a 37° C por 48 hrs.
2. La cepa se estandarizó al tubo 1 del Nefelómetro de Macfarlán y se inoculó la caja de agar PPLO, incubando a 37° C por 72 hrs.
3. La cepa se volvió a estandarizar al tubo 1 del Nefelómetro de Macfarlán y se inocularon 20 cajas de PPLO con 100 µl por estría cerrada y se incubó a 37° C por 48 hrs.
4. Se cosecharon cada 5 cajas en 1 ml de PBS.

5. Se lavó 3 veces centrifugando a 10000 rpm / 10 min / 4°C. El pellet se resuspendió en cada lavado.
6. El pellet se concentró en 1ml de PBS y se homogenizó.
7. Se tomó 200 µl del antígeno concentrado y se centrifugó (mismas constantes que en el lavado).
8. El pellet se resuspendió en 1ml de buffer de preparación de antígeno.
9. Se calentó a 90° C / 10 min.
10. Se centrifugo a 10000 rpm / 10 min
11. Se decantó el sobrenadante y se congeló a -20° C, hasta su uso.

Para la formación del inmunógeno la biomasa y el extracto de PLD se inactivaron con formaldehído a una concentración final de 0.5 %, se liofilizó (Labconco, Freezone 6, USA) y congeló a -20° C el extracto de PLD.

#### 7.2.4 Determinación de proteínas

Se realizó la técnica de Bradford en microplaca y fue leída en un espectrofotómetro (Thermo- Scientific).

1. En siete viales se colocó PBS y/o albúmina sérica bovina (BSA) (cuadro 2).

Cuadro 2. Preparación de la curva control.

VIAL	1	2	3	4	5	6	7
PBS	1000µl	990µl	980µl	960µl	940µl	920µl	900µl
BSA		10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl

2. En otros tres viales se colocó la muestra de antígeno pura, una dilución 1/10 y otra dilución de 1/100.
3. En una placa de fondo plano se realizó una curva por triplicado de los siete viales (PBS/BSA) y por duplicado de los otros tres viales (antígeno y diluciones de antígeno), poniendo 50µl de cada uno de los viales en los pozos.
4. A cada pozo se le agrego 200µl del reactivo de Bradford.
5. Se realizó la lectura en espectrofotómetro con un filtro de 620nm.



### **7.2.5 Titulación de la fosfolipasa D (PLD) e inhibición de la hemólisis**

Para la titulación de la PLD y la inhibición de la hemólisis se realizaron por duplicado dos técnicas la de Bueno y Gines (1993) y la de Ellis *et al* (1991).

Preparación de glóbulos rojos (GR). Se utilizaron glóbulos rojos de ovino conservados en Alsevier's.

1. Los glóbulos rojos se centrifugaron a 3000 r.p.m. por 5min.
2. El sobrenadante se desechó.
3. El pellet (GR) se retiró de la capa flogística y se resuspendieron en PBS al 0.5% y al 5%.
4. Se realizaron tres lavados a 3000 r.p.m. por 5min.

Primero se tituló la hemolisina, se buscó un 100% de hemólisis para posteriormente poder realizar la inhibición de la hemólisis. Mediante dos técnicas:

- A) Técnica de Bueno y Gines (1993) con algunas modificaciones.

#### **Titulación de la PLD:**

1. Se puso 200 µl de PBS en 10 tubos.
2. En el primer tubo se le agregaron 200 µl de PLD y se realizaron diluciones dobles.
3. Se agregaron 20 µl GR al 5%.
4. Se incubó 24hrs a 37° C.
5. Se obtuvo el título a partir de una hemólisis de 100%

#### **Inhibición de la hemólisis:**

1. Se puso 100 µl de PBS en 10 tubos.
2. Se agregó 100 µl de suero y se realizaron diluciones dobles.
3. Se agregó 100 µl de 4 UH PLD (previamente titulada).
4. Se incubó 2hrs a 37° C.
5. Se agregaron 50 µl de GR 5% y se mezcló.
6. Se incubó a 37° C toda la noche.

B) Técnica de Ellis *et al* (1991).

**Titulación de la PLD:**

1. Se puso 250 µl de PBS en 10 tubos.
2. En el primer tubo se le agregaron 250 µl de PLD y se realizaron diluciones dobles.
3. Se agregaron 250 µl GR al 0.5%.
4. Se incubo 1hrs a 37° C.
5. Se obtuvo el título a partir de una hemólisis al 100%

**Inhibición de la hemólisis:**

1. Se puso 30 µl de PBS en pozos de una placa de fondo en U.
2. Se agregó 30 µl de suero y se realizaron diluciones dobles.
3. Se agregó 30 µl de PLD a 4 UH (previamente titulada).
4. Se incubo 2h a 37°C.
5. Se agregaron 30 µl de GR 0.5% y se mezcló.
6. Se incubo a 37° C toda la noche.

Las lecturas se realizaron con observación de lisis y sedimentación de GR. Como controles: GR, PLD + GR, suero control positivo y suero control negativo.

**7.2.6 Western Blot (Kaba *et al*, 2001)**

- Preparación de la muestra
  1. En microtubos se colocaron 10 µl de buffer muestra.
  2. Se agregaron 20 µl del extracto bacteriano a los tubos.
  3. La preparación se hirvió a 69° C por 10 min.
- Electroforesis (Gel SDS – PAGE)
  1. Se preparó el gel separador, adicionándose en la parte superior isopropanol 80% esperando hasta que polimerizara.
  2. Se preparó el gel concentrador sirviéndose entre los cristales, inmediatamente se pusieron los peines. Esperando a que polimerizara.
  3. Los cristales se colocaron en el tanque, el cual se llenó con buffer de electroforesis 1X y se quitaron los peines.

4. En los canales se pusieron las muestras (10  $\mu$ l) y el marcador de peso molecular (5  $\mu$ l).
  5. Se corrió a 180 V / 35 min.
- Electrotransferencia
    1. Del polo negativo al positivo se colocó una esponja, papel filtro, gel, membrana activada, papel filtro y esponja; se llenó con buffer de transferencia.
    2. Se montaron los electrodos en la caja y se llenó con agua y hielo.
    3. Se corrió a 30 V / 75 min / 400 Amp.
    4. Al término, la membrana se colocó en leche al 3%. Se refrigeró toda la noche.
    5. La membrana se pasó a una bolsa + el antígeno primario, sellándola y se metió a la estufa bacteriológica 37° C / 2 hrs.
    6. Se pasó la membrana en tres lavados con Tris NaCl pH 7.4.
    7. Se colocó en otra bolsa la membrana + antígeno secundario, en la estufa bacteriológica a 37° C / 1 hrs.
    8. Se retiró la membrana y se le aplicó 3 lavados con Tris NaCl pH 7.4
    9. La membrana se sumergió en buffer de revelado en un cuarto oscuro hasta que se observaron líneas indicativas de la reacción.
    10. La reacción se detuvo lavando con agua. Revisando las líneas con el marcador de peso molecular.

#### Sueros control

El suero control positivo fue obtenido de un ovino con diagnostico bacteriológico positivo a LC y el negativo de un ovino negativo a esta enfermedad, los cuales se pasaron a viales y congelados hasta su uso.

#### **7.2.7 Diseño y evaluación del acarreador.**

- a) Obtención del acarreador (vermiculita).

Se tamizó con mallas (#18, #12 y #6) la vermiculita para obtener tamaños uniformes (mm), a cada tamaño se le midió la absorción de agua y fueron observados por microscopia electrónica.

b) Inclusión de los diferentes antígenos al acarreador.

Se trabajó con el tamaño de 1.68 mm de vermiculita y se le incluyó el antígeno somático, sobrenadante de PLD y antígeno somático más sobrenadante de PLD. El efecto de la inclusión de los antígenos se realizó con estudios de microscopia electrónica así como por la observación visual del sistema formado.

c) Pruebas de disolución "*in vitro*"

Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180 min y 3 días) considerando la primera muestra al tener la vermiculita más antígeno el primer contacto con la mezcla de disolución y considerando como minuto cero.

A cada muestra se le midió la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford en microplaca, estas proteínas fueron liberadas a la mezcla de disolución (PBS pH 5.5). Se realizaron estudios de microscopia electrónica para el acarreador al término de la disolución.

d) Microscopía electrónica de barrido

Las muestras fueron recubiertas en oro por 300 segundos (Ionizador Denton Vacum Desk V) y se observaron en el microscopio (JEOL Modelo JEM-6010 L.A.).

## 8 RESULTADOS

### Aislamientos e identificación

La cepa (129) aislada de exudado de absceso de ovino fue donada por el servicio de diagnóstico del laboratorio de microbiología (FESC UNAM). Se logró purificar la cepa y se caracterizó bioquímicamente, dando como resultado: *C. pseudotuberculosis* biotipo nitrato negativo (cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de las pruebas realizadas para la caracterización bioquímica de la cepa 129.

PRUEBA	RESULTADO
Tinción de Gram	Bacilos, Gram (+), formación en letras chinas
Agar sangre	$\beta$ hemólisis
SIM	(-)
MR	(+)
VP	(-)
O/F	F(+)
Urea	(+)
Nitrato	(-)
Xilosa	(-)
Dulcitol	(-)
Maltosa	(+)
Glucosa	(+)
Trehalosa	(-)

La cepa 129 y la cepa ATCC se utilizaron para la producción del antígeno somático y del extracto de PLD, de cada una de las cepas se obtuvo un concentrado de un mililitro de antígeno somático en agar y de medio PPLO y 500 ml de extracto de PLD.

Del caldo PPLO+T-20 1% antes de la obtención de los antígenos y término del periodo de incubación se tomó 1ml de cada una de las cepas y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (U.F.C./ml). En el caso de la cepa 129 se obtuvieron  $4.5 \times 10^4$  U.F.C./ml y para la cepa ATCC fueron  $6.7 \times 10^6$  U.F.C./ml.

### Determinación de proteína

Se realizó la técnica de Bradford para la determinación de proteína de cada uno de los antígenos, los resultados fueron los siguientes (cuadro 4):

Cuadro 4. Cantidad de proteína de los antígenos de la cepa 129 y cepa ATCC de *C. pseudotuberculosis*.

ANTÍGENO	Microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Cepa 129	Cepa ATCC
Antígeno somático obtenido de medio PPLO + Tween-20 1%	5558.80	6650.31
Antígeno somático obtenido de agar PPLO	8811.06	4823.70
Antígeno de la PLD obtenido del sobrenadante del medio PPLO + Tween-20 1%	642.76	551.42

### Titulación de hemolisina

La prueba se realizó para el extracto de PLD de ambas cepas (cuadro 5), el título de la hemolisina se tomó en la última dilución de la PLD donde se presentó el 100% de hemólisis teniendo en una unidad hemolítica (1 UH).

Cuadro 5. Título de la PLD de las cepas 129 y ATCC *C. pseudotuberculosis* mediante las dos técnicas.

Técnica	Título de la PLD	
	Cepa 129	Cepa ATCC
Ellis <i>et al</i> (1991).	64 UH	128 UH
Bueno y Gines (1993).	16 UH	32 UH

### Inhibición de la hemolisina

Para la inhibición se utilizaron 4 UH en ambas técnicas, por lo que se diluyó la PLD de cada cepa. Para la técnica de Ellis *et al* (1991) la cepa 129 se diluyó en 1/16 y la cepa ATCC en 1/32, y para la técnica de Bueno y Gines (1993) la cepa 129 se diluyó en 1/4 y la cepa ATCC en 1/8. El título de anticuerpos fue la última dilución de suero donde existió sedimentación de glóbulos rojos (cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de las pruebas de inhibición de la hemólisis por la fosfolipasa D de *C. pseudotuberculosis* con sueros 12A y 2.

Técnica de Inhibición de la Hemólisis	Fosfolipasa D de la cepa 129				Fosfolipasa D de la cepa ATCC			
	Suero 12A		Suero 2		Suero 12A		Suero 2	
	Último pozo con sedimentación	Título de anticuerpos	Último pozo con sedimentación	Título de anticuerpos	Último pozo con sedimentación	Título de anticuerpos	Último pozo con sedimentación	Título de anticuerpos
Ellis <i>et al</i> (1991).	6	1/64	6	1/64	6	1/64	6	1/64
Bueno y Gines (1993).	6	1/64	6	1/64	2	1/4	1	1/2

Se observó inhibición de la hemólisis por lo que el antígeno de PLD es reconocido por los anticuerpos presentes en los sueros.

#### Tinción con azul de Coomassie / Western Blot

Se realizó la electroforesis con las diferentes muestras de *C. pseudotuberculosis* y el gel resultante se tiñó con Coomassie (Imagen 2). Solo se obtuvo una banda de 31 kDa en los antígenos ATCC obtenido de agar y caldo y en la cepa 129 obtenido de agar.

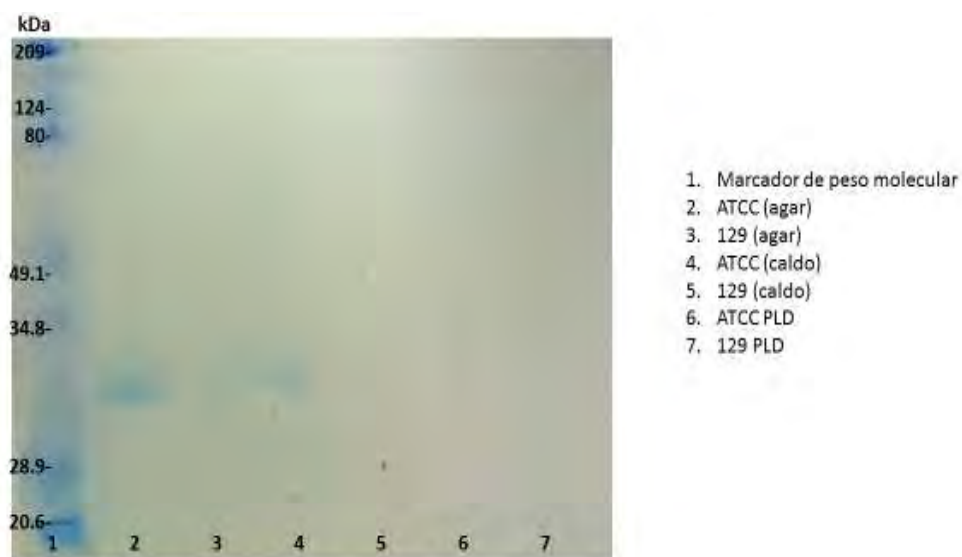


Imagen 2. Resultado de la Tinción de Coomassie de diferentes proteínas de *C. pseudotuberculosis*.

En el Western Blot se reveló una banda de 31kDa para los extractos de PLD, bandas de 100, 50, 31 y 25 kDa para la cepa ATCC y bandas de 150, 125, 100, 75, 56, 50, 37, 31 y 25 kDa para la cepa 129 (Imagen 3).

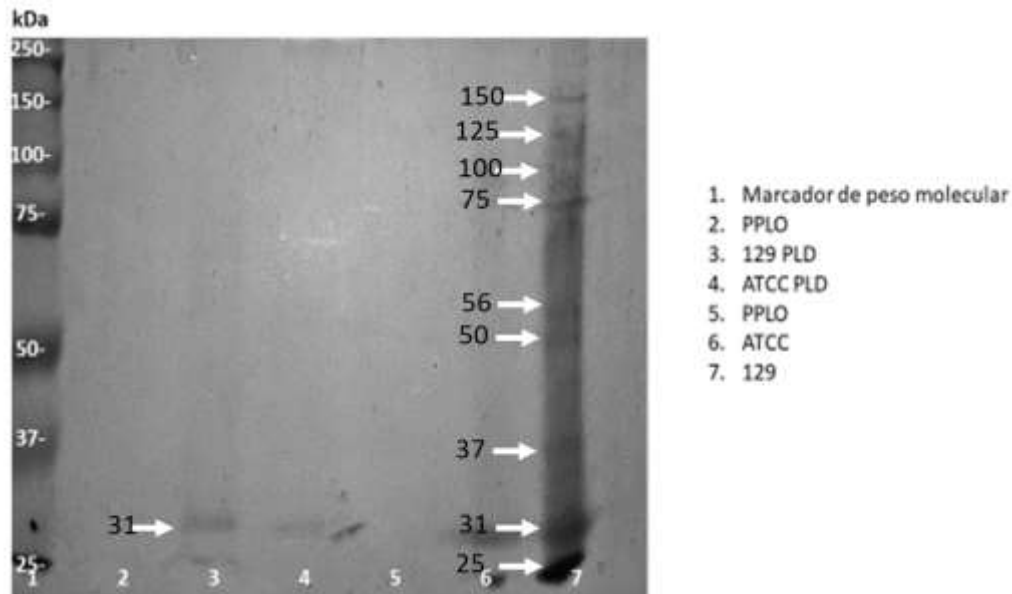


Imagen 3. Resultado del Western Blot de diferentes antígenos de *C. pseudotuberculosis*.

### Obtención de vermiculita

Se obtuvieron tres lotes de vermiculita por el tamaño: 1-1.68, 1.68- 3.1 y más de 3.1 mm. En la prueba de absorción del agua destilada se obtuvo un porcentaje de 35%, 30% y 25% respectivamente. Al deshidratar la vermiculita su morfología cambió comprimiéndose y formándose una sola lamina (Imagen 4). Por microscopia electrónica se observó la conformación de láminas y la porosidad que tiene la vermiculita (Imagen 5).





Imagen 4. Vermiculita natural (A), hidratada (B) y deshidratada (C).

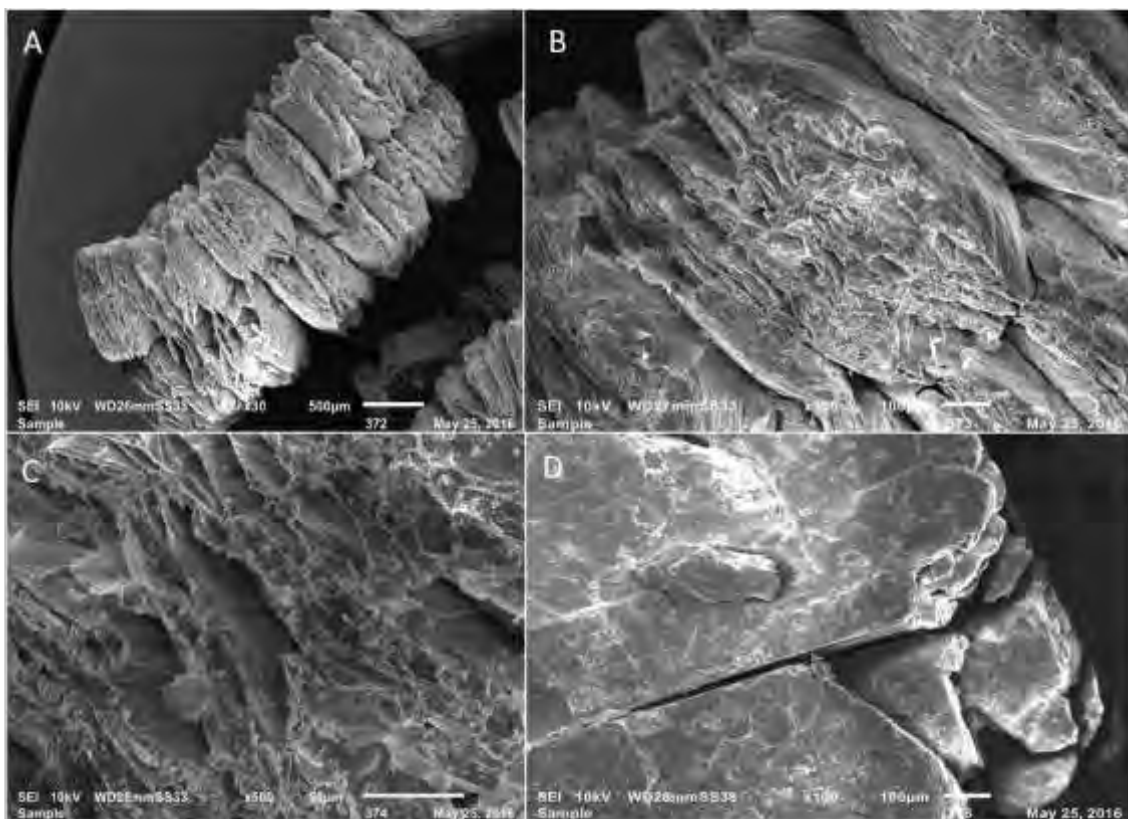


Imagen 5. Microscopia electrónica de la vermiculita natural (A. 30X, B. 100X y C. 500X) y deshidratada (D. 100X).

### Inclusión del antígeno

En la observación macroscópica de la vermiculita más los antígenos no se formó la estructura laminar como en el caso de la vermiculita deshidratada, pero se acortó el espacio entre el laminado y se vio una película de polvillo en la superficie y entre el laminado (Imagen 6). También la consistencia de la vermiculita cambió a una más firme.



Imagen 6. Vermiculita con inclusión. A. Inclusión con antígeno somático. B. Inclusión con antígeno somático más extracto de PLD. C. Inclusión con extracto de PLD.

La vermiculita adsorbió de antígenos los siguientes promedios: la vermiculita más antígeno somático 61.39%, la vermiculita más extracto de PLD más antígeno somático 60.37% y la vermiculita más extracto de PLD 87.79%.

En la microscópica de la vermiculita más extracto de PLD (Imagen 7), en la superficie se observó una sustancia amorfa, no solo en la superficie sino también en el espacio entre las láminas de la vermiculita. En la vermiculita más antígeno somático (Imagen 8) se observó un conglomerado del antígeno en la superficie, a un mayor acercamiento se tuvo estructuras semejantes a la bacteria de forma individual o conglomeradas atrapadas entre las láminas y adheridas en la superficie de las láminas de vermiculita. En la vermiculita con extracto de PLD más antígeno somático (Imagen 9), se observó que la sustancia amorfa y la bacteria estaban en las mismas zonas formando conglomerados.

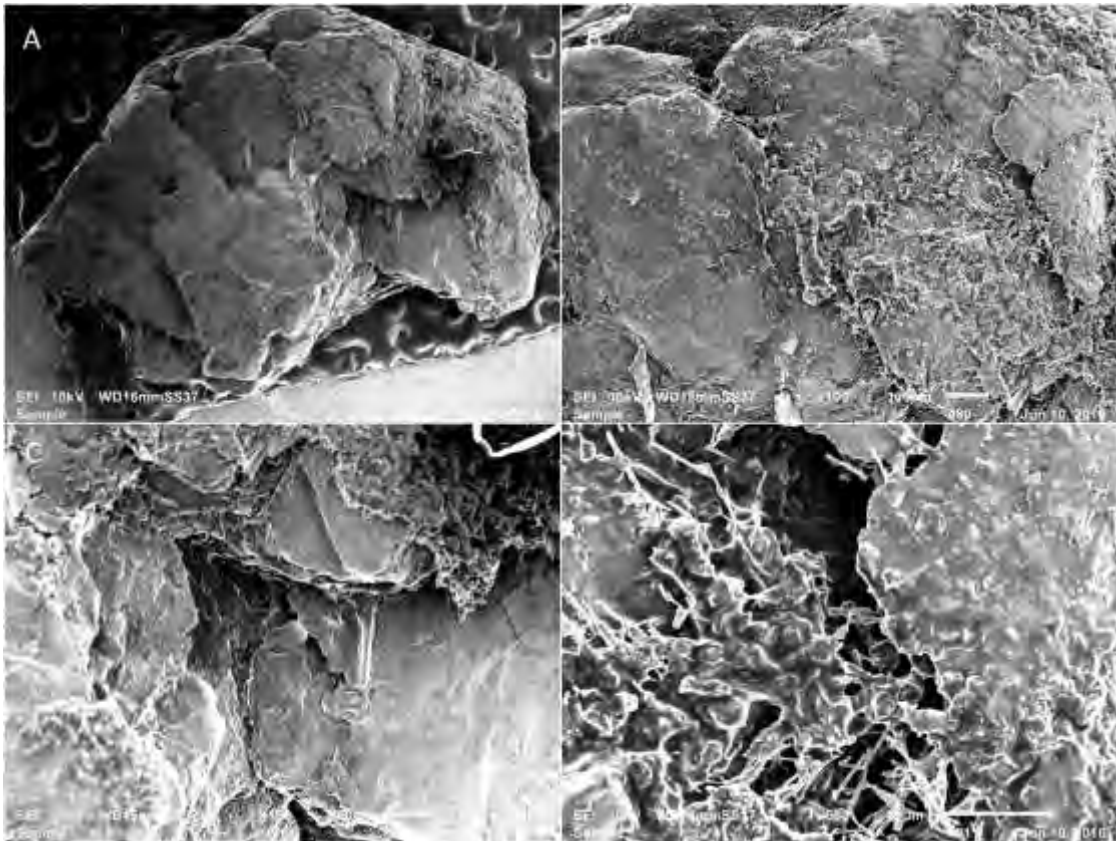


Imagen 7. Microscopia electrónica de la vermiculita más extracto de PLD. (A. 30X, B. 100X C. 100X y 500X) en las que se observa una sustancia amorfa en la superficie y entre el laminado.

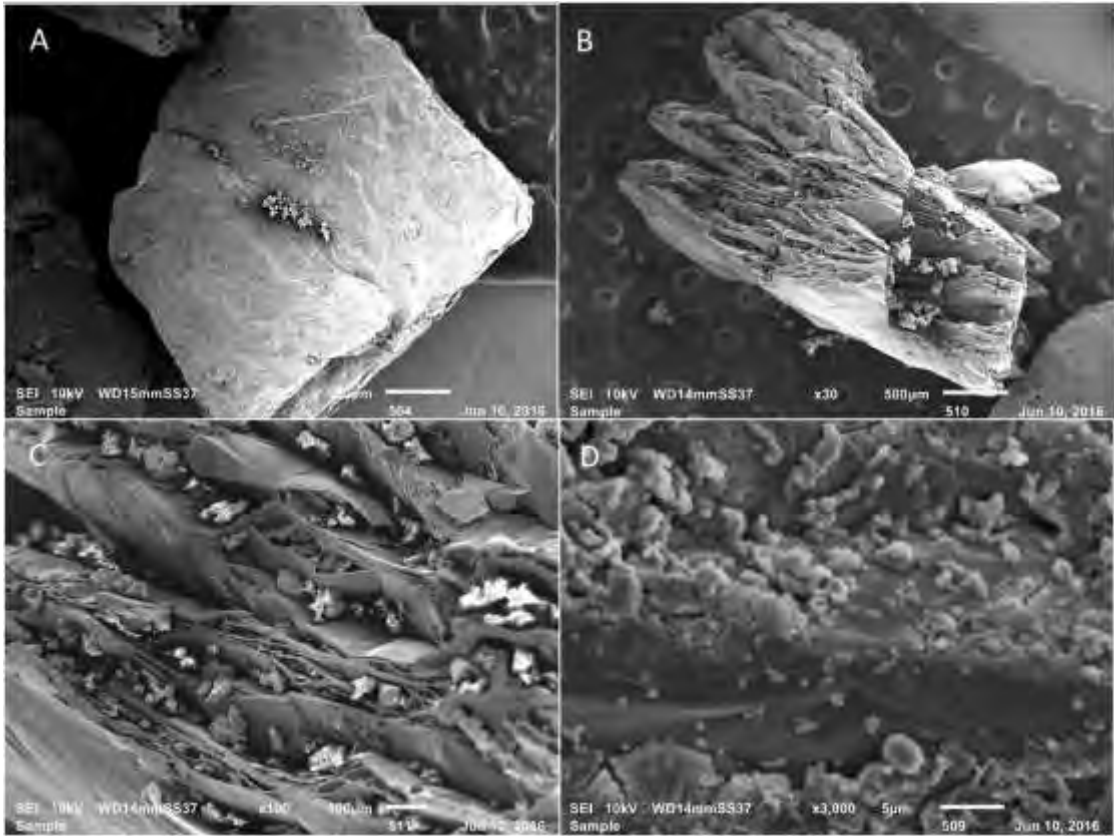


Imagen 8. Microscopia electrónica de la vermiculita más antígeno somático (A. 30X, B. 30X C. 100X y 3000X) en las que se observan los cúmulos de bacterias en la superficie y entre las láminas.

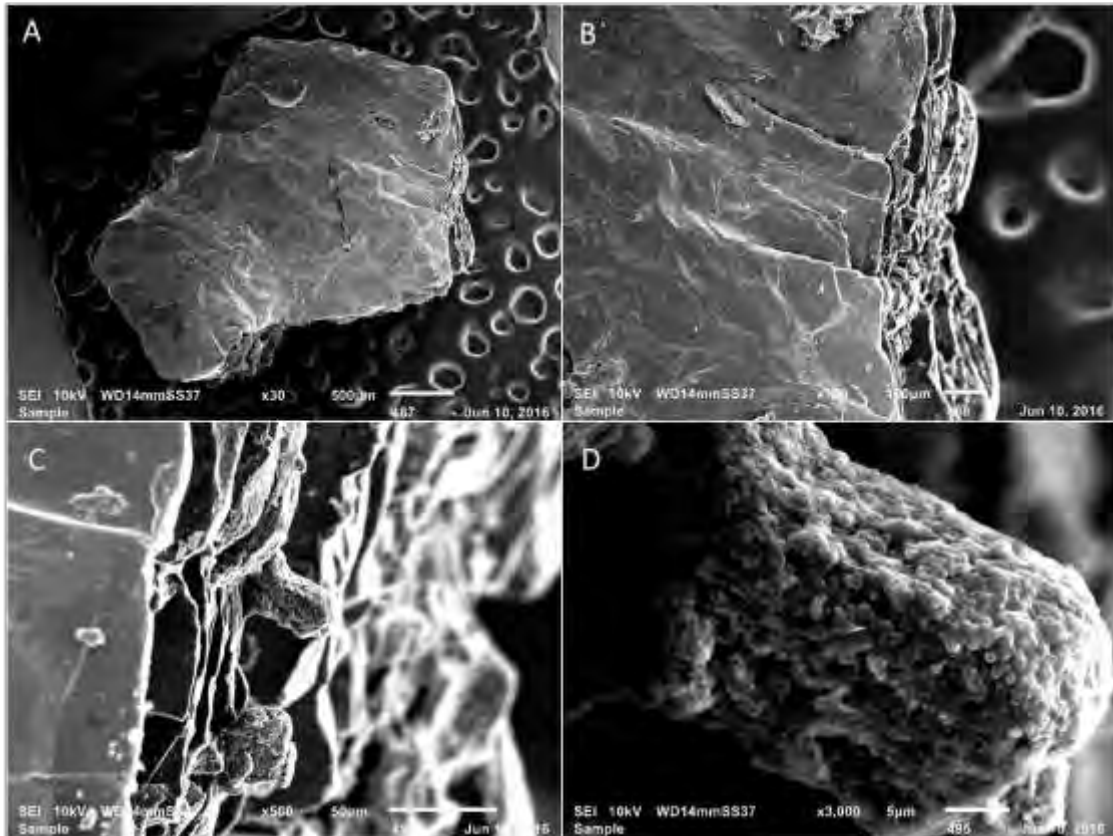
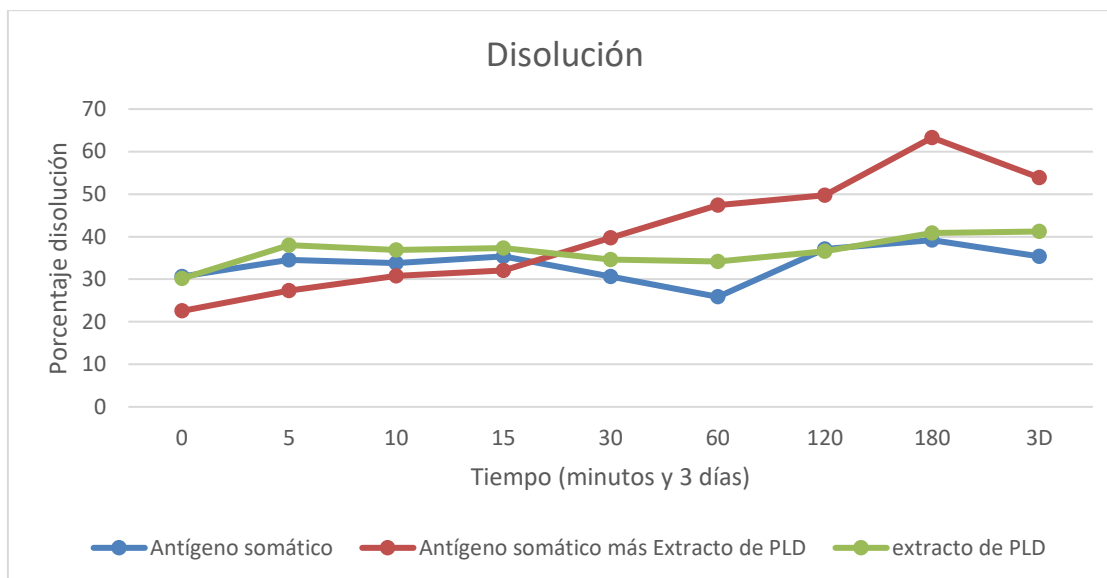


Imagen 9. Microscopía electrónica de la vermiculita con el extracto de PLD y antígeno somático (A. 30X, B. 100X C. 500X y 3000X) en las que se observa un conglomerado de bacterias con PLD y de forma aislada.

### Pruebas de disolución “*in vitro*”

Se realizó la prueba de disolución (Grafica 1) por sextuplicado para cada antígeno (antígeno somático, antígeno somático más extracto de PLD y extracto de PLD), se observó que en caso de vermiculita más antígeno somático y vermiculita con extracto de PLD tienen una dispersión rápidamente y sin gran modificación durante el tiempo de la prueba, para la vermiculita con antígeno somático y extracto de PLD se observó una dispersión del antígeno de forma gradual.



Gráfica 1. Resultados promedio de la prueba de disolución para los diferentes antígenos de *C. pseudotuberculosis* y la vermiculita.

En la observación macroscópica de la vermiculita al término de la disolución, se pierde la película de polvillo y es más visible el espacio interlaminar. En la observación microscópica de la vermiculita más el extracto de PLD (Imagen 10), no se observa en la superficie la sustancia amorfa, no solo en la superficie sino tampoco entre las láminas de la vermiculita. En el caso de la vermiculita más el antígeno somático (Imagen 11) en la superficie no se observa el aglomerado, al ir aumentando se tienen estructuras semejantes a la bacteria sola o conglomeradas en menor cantidad, no solo atrapadas entre las láminas sino en la superficie de la lámina de la vermiculita. En la vermiculita más el extracto de PLD y el antígeno somático (Imagen 12), no se observa la sustancia amorfa en la superficie y el antígeno somático se observa principalmente en pequeñas aglomeraciones y algunas aisladas.

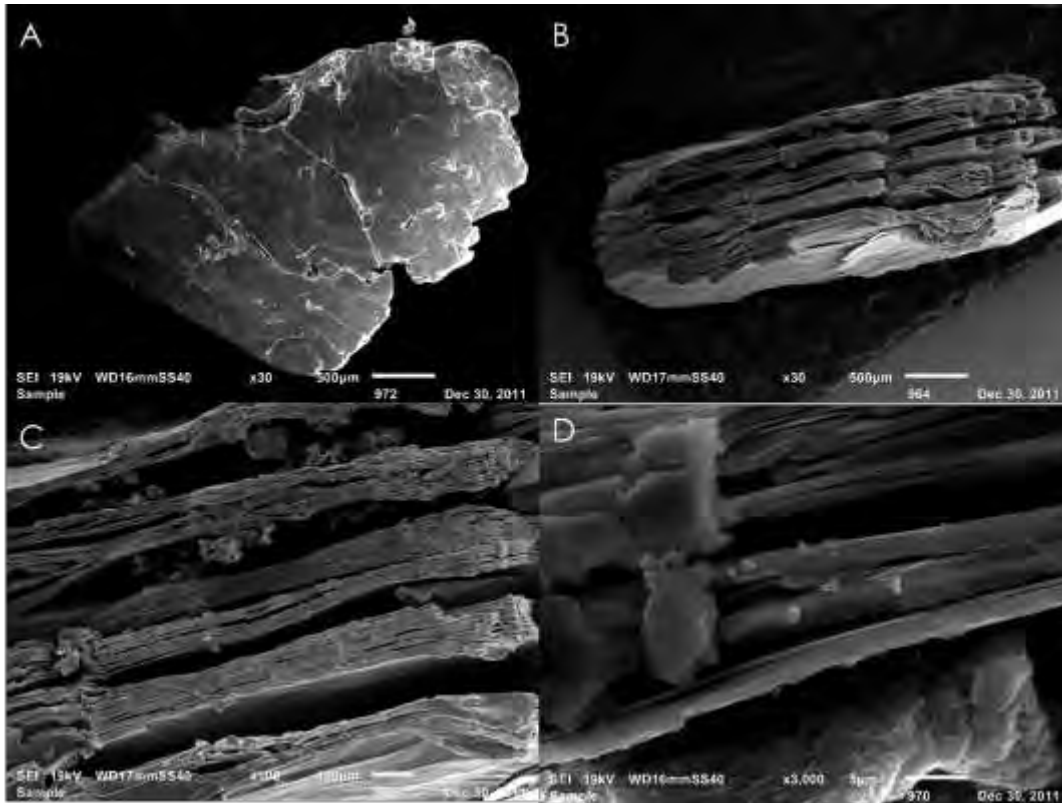


Imagen 10. Microscopia electrónica de la vermiculita más extracto de PLD. (A. 30X, B. 30X C. 100X y 3000X) de *C. pseudotuberculosis*.

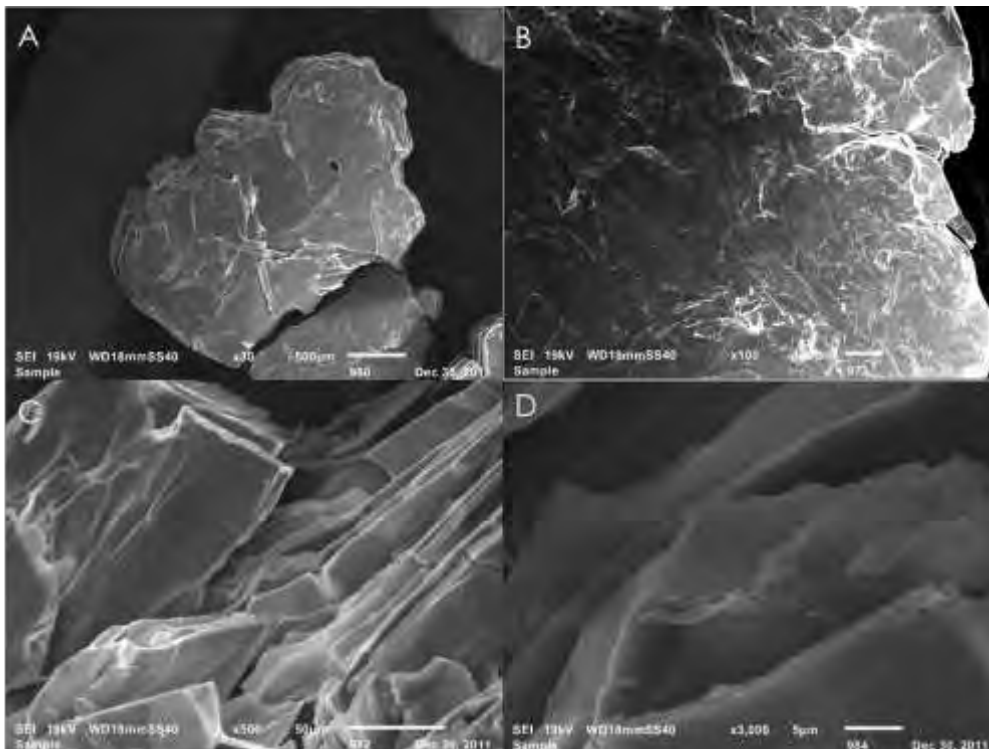


Imagen 11. Microscopia electrónica de la vermiculita más antígeno somático (A. 30X, B. 100X C. 500X y 3000X) de *C. pseudotuberculosis*.

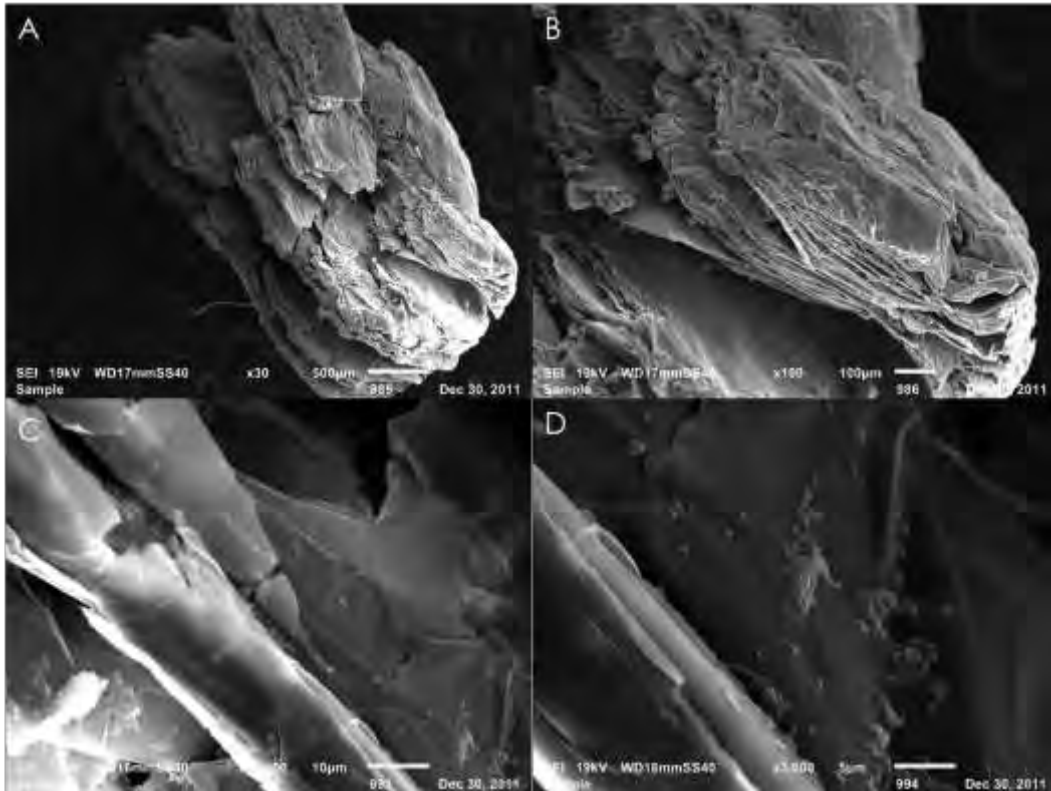


Imagen 12. Microscopia electrónica de la vermiculita más extracto de PLD con antígeno somático de *C. pseudotuberculosis* (A. 30X, B. 100X C. 500X y 3000X).



## 9 DISCUSIÓN

El aislamiento e identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en este estudio consistió en identificar colonias características (pequeñas, redondeadas, blanco cremoso y fácil desplazamiento y fragmentación), en la observación de  $\beta$  hemólisis en agar sangre y su caracterización bioquímica lo cual es parecido a lo reportado por García, (1988); Dorella et al, (2006)a; Baird and Fontaine (2007) y Fernández (2009). En éste trabajo el medio de cultivo utilizado para la obtención de los antígenos bacterianos fue el medio PPLO sólido y líquido, los cuales han sido utilizados en otros trabajos para el mismo objetivo y facilita el manejo de la cepa pura identificada.

La cepa 129 de *C. pseudotuberculosis* se identificó como biotipo I (biovar *equi*) por su capacidad de reducir nitratos. Aunque, en la mayoría de los casos las muestras de pequeños rumiantes no reducen nitratos, se conoce de cepas provenientes de caballos y de vacas negativos a nitratos (Baird and Fontaine, 2007). Existen reportes de aislamientos provenientes de ovinos positivos a reducción de nitratos y se reconocimiento en pequeños rumiantes (Cubero et al, 2002; De la Fuente, 2012).

La concentración de proteína de los antígenos en el presente trabajo fue de 8811.06  $\mu\text{g/ml}$  para el antígeno somático obtenido de agar PPLO y para el antígeno obtenido de caldo PPLO fue de 5558.8  $\mu\text{g/ml}$ . Esto concuerda por lo obtenido por De la Fuente (2012) donde fue mejor la obtención de antígeno por la cosecha de colonias en el agar PPLO que en la centrifugación del caldo PPLO para obtener la bacteria; respecto a la concentración de proteína de los antígenos en dicho trabajo fue de 5814.35  $\text{mg/ml}$  para el antígeno somático obtenido de agar PPLO y para el antígeno obtenido de caldo PPLO fue de 847.59  $\text{mg/ml}$ . En el presente trabajo se observó una mayor obtención de proteína en ambos casos siendo más significativo en el caso del caldo, esto se puede deber a que en el trabajo previo se utilizó Tween-20 al 0.1% y en el trabajo actual al 1%, se ha reportado que el uso de Tween favorece el crecimiento bacteriano (Cubero *et al*, 2002).

En el caso del extracto de PLD se obtuvo 642.76  $\text{mg/ml}$  y 551.42  $\text{mg/ml}$  para la cepa 129 y ATCC respectivamente, esta diferencia se debe a que la cepa 129 es una cepa silvestre (campo) y la cepa ATCC es de referencia.

Para el reconocimiento las proteínas antigénicas de la cepa 129, se utilizó el Western Blot, encontrándose diferentes bandas, que incluyeron: 150, 125, 100, 75, 56, 50, 37, 31 y 25 kDa para el extracto bacteriano y de 31 kDa para el extracto de PLD. En ambos casos se obtuvo una banda de 31 kDa.

De la Fuente (2012) obtuvo diez proteínas con un peso aproximado de: 11.66, 16.84, 31.04, 42.10, 50.69, 60.91, 68.84, 77.81, 93.5 y 126.98 kDa en el antígeno somático derivado de agar PPLO. En el cual considera como los dos antígenos inmunodominantes (31.06 y 68.84 kDa) y las bandas 16.84, 50.69 y 60.91 kDa como la base de los antígenos somáticos de la cepa C-11. Existe un parecido entre las proteínas de ese estudio (31.04, 50.69, 77.81 y 126.98 kDa) y el actual estudio (31, 50, 75 y 125 kDa).

En el trabajo de Kaba *et al*, (2001) en la reacción de Western Blot obtuvieron diez proteínas de peso aproximado de 16.9, 24.3, 27.25, 31.18, 34, 48.77, 50.9, 57.36, 63.82 y 73.51 kDa. En este estudio se observó un parecido a las proteínas de la cepa 129 (25, 31, 50, 56 y 75 kDa), que sugiere que estas proteínas antigénicas son las mismas.

Hoelzle *et al* (2013) mediante Western Blot reconocieron con suero de ovino diferentes proteínas: 12, 22.5, 30, 32, 40, 48, 61, 65, 69, 74, 83, 110, 135 y 150 kDa. Mencionando como inmunodominantes las bandas de 30, 40, 48, 69, 74, 83 y 150 kDa, y consideraron restringidas a ovinos las proteínas de 69 y 40 kDa. En el actual trabajo se consideró como PLD a una proteína con peso de 31kDa a diferencia de Hoelzle *et al* (2013) que la consideran de 30 kDa, pero teniendo parecidas las identificadas de 75 y 150 kDa.

Varios autores como Muckle *et al*, (1992), Kaba *et al*, (2001) y Ellis *et al*, (1991) tuvieron reacciones de sueros de pequeños rumiantes, infectados naturalmente y experimentalmente, con bandas de 31.7, 31.4 y 31.5 kDa (Miranda, 2010). Coincidiendo peso molecular con un rango de 31 kDa. En el actual trabajo se obtuvieron proteínas de 31 kDa tanto para el extracto bacteriano y de la PLD concordando con los anteriores autores.

En un análisis proteómico serológico (SERPA) se obtuvieron las siguientes proteínas: 24.25, 40.67, y 63.06 kDa como seroproteoma accesorio y de 32.52, 41.24, 72.27, 51.31, 122.82, 84.93, 70.23, 36.55, 82.51, 40.19 y 38.55 kDa como núcleo del seroproteoma (Seyffert *et al*, 2014). En el presente trabajo se asemeja con el anterior en la identificación de las proteínas de: 50, 37, 31 y 25 kDa, teniendo tres bandas del núcleo y una del seroproteoma accesorio.

Se observó el efecto hemolítico del extracto de PLD de la cepa 129 en eritrocitos de ovino, y posteriormente se tituló mediante dos técnicas la de Ellis *et al* (1991) y la de Bueno y Gines (1993), obteniendo 64 UH y 16 UH respectivamente. En la técnica de Ellis *et al* (1991) se tuvo un título cuatro veces más que en la de Bueno y Gines (1993) esto se debe a diferentes factores como es el tiempo de incubación y la concentración de glóbulos rojos.

De igual forma, se reconoció el extracto como antígeno con la inhibición de la hemólisis mediante las técnicas anteriormente mencionadas, por lo que se obtuvo el título de dos sueros. En esta prueba se tuvo diferente título en la inhibición para el extracto de PLD de ATCC con la técnica de Bueno y Gines (1993), al dejar más tiempo la incubación del sugerido se logró observar el título igual al de Ellis *et al* (1991) por lo que el tiempo es un factor importante para el efecto de la hemolisina en los eritrocitos.

A pesar de ser dos pruebas (titulación de la hemolisina y la inhibición de la hemólisis) útiles han quedado en desuso por las diferencias que se tienen de tiempos, temperaturas y concentraciones de eritrocitos, no obstante de esto se logró tener un acercamiento para las concentración en vacunas y sobretodo tener un título de sueros de animales vacunados.

La cepa 129 se utilizó para la inclusión al acarreador (vermiculita), aunque es una biovariedad *equi* se sabe que animales infectados por esta especie puede generar inmunidad cruzada a la biovariedad *ovis* (Soares *et al*, 2013). De igual manera, se tienen datos de protección de búfalos con uso de vacunas con biovariedad *ovis*, siendo la biovariedad 2 la causante de enfermedad en el búfalo (Moussa *et al*, 2016). Se debe destacar que no se ha observado si hay inmunidad cruzada de biovariedad *ovis* a la biovariedad *equi* (Soares *et al*, 2013). Esto es importante por el hecho de tener aislamientos de la biovariedad *equi* de ovinos y la funcionalidad de la vacunación en estos casos.

Hay que recalcar que las vacunas comerciales no confieren protección completa, además de que se tiene persistencia de LC en los rebaños y donde la vacunación es esporádica en algunos rebaños (Lacasta *et al*, 2015; Windsor and Bush, 2016).

Por otro lado, se encontró que los polímeros pueden interactuar con la superficie externa de los minerales de arcilla (ej. vermiculita) y también penetrar en los espacios nanoestructurales, agujeros y túneles. Los polímeros derivados naturalmente tienen la ventaja potencial del reconocimiento biológico que puede apoyar positivamente la

adhesión y la función celular, pero tienen propiedades mecánicas pobres (Valásková and Martynková, 2012). Por estas características se seleccionó como material del acarreador a la vermiculita, además que fueron observadas en la microscopía electrónica que en la vermiculita pura y en la inclusión se encontró el antígeno (extracto bacteriano y/o PLD) como se muestra en las imágenes 5 a 9.

La estructura de vermiculita contiene capas interlaminares de agua que están sujetas a los procesos de hidratación y deshidratación. Las propiedades de hidratación están controladas por los cationes intercalados de  $Mg^{2+}$  y cantidades menores de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$ . El radio y la carga del catión influyen en el grado de estado de hidratación en la capa intermedia y en las secuencias de la capa de apilamiento. El estado de hidratación de la vermiculita se define por el número de capas de agua en el espacio interlaminar. El espacio basal de la vermiculita de Mg fue declarado bajo convenio de 0.902 nm sin agua, 1.150 nm para una capa de agua y 1.440 nm para dos capas de agua (Valásková and Martynková, 2012). Esto explica su capacidad de absorción de agua y el aumento de tamaño macroscópicamente, siendo mayor de acuerdo a la superficie.

En el presente estudio en la vermiculita deshidratada, se observó una compresión de las láminas (microscópicamente) y un cambio morfológico macroscópicamente. Su *et al*, (2016) mencionan que las pérdidas de masa de vermiculita ocurridas de 30-210 ° C se atribuyen a la eliminación del agua adsorbida en la superficie y el agua de la capa intermedia asociada con los cationes intercalados, respectivamente. Esto también sucede en el espacio basal de la vermiculita (Valásková and Martynková, 2012).

El acoplamiento de las partículas de vermiculita a las bacterias parece ser el resultado al carácter hidrofóbico de los sorbentes y sorbatos. Chattopadhyay y Puls (1999) afirman que una alta adsorción de bacterias a ciertas arcillas es probablemente debido a su alta superficie BET y su hidrofobicidad superficial. Además, la influencia de fuerzas atractivas (como las fuerzas de Van der Waals) es directamente proporcional a la superficie y las cargas positivas en los bordes de los minerales de arcilla favorecen una alta adsorción también (Müller, 2009).

Otros autores indican que las interacciones electrostáticas influyen en la adhesión de las bacterias a las partículas de arcilla. También se menciona que la unión celular aparentemente ocurre por medio de polisacáridos extracelulares (EPS) e implica cationes polivalentes que actúan como un "puente" entre la superficie celular y mineral (Müller, 2009; Wen *et al*, 2016). En este estudio se comprobó en la microscopía electrónica, puesto

que hay antígeno (bacteria y/o PLD) que no se encontró capturado entre las láminas (efecto de la deshidratación) y si adherido en las paredes de las láminas de la vermiculita, dando paso a la formación de una matriz (acarreador + agente activo).

Esta interacción se puede ver afectada por la densidad de las cargas en los bordes que depende del pH de la dispersión y surge de la adsorción o disociación de protones. En un medio ácido, un exceso de protones crea cargas positivas del borde, cuya densidad disminuye al aumentar el pH (Valásková and Martynková, 2012). Por lo que es importante considerar el pH al cargar el acarreador (vermiculita) con el antígeno, para optimizar las concentraciones de inclusión y al momento de la disociación del mismo. Esta disociación se logró al momento en PBS con pH 5.5, se determinó la concentración proteica (antígeno) y por la observación en microscopía electrónica.

Liu *et al* (2017) demostraron una mayor adsorción en pH 2 -3 (fuerte atracción electrostática) y al aumentar el pH de la solución disminuyó la adsorción, hasta casi al 0%. Esta similar situación se ha observado en estudios previos del mismo autor sobre minerales de filosilicatos. Siendo importante por el cambio de pH que enfrentará el acarreador en el sistema digestivo, permitiendo la liberación del antígeno. Además que al pasar a través del tracto gastrointestinal el cambio de pH tiende a la alcalinización y por lo cual se espera una mejor disolución.

La vermiculita presentó una mejor adsorción de la vermiculita más PLD (87.79%), esto se puede deber a la propiedad de la PLD como proteína y menor tamaño, permitiéndole interactuar con la superficie, espacio interlaminar y túneles. A diferencia de la bacteria con mayor tamaño permitiéndole solo la interacción con la superficie y el espacio interlaminar de la vermiculita. Demostrando que la vermiculita puede actuar como un acarreador de antígenos de *C. pseudotuberculosis*.

En la prueba de disolución “*in vitro*” se observó una mejor curva, comparada con solo el extracto de PLD y de antígeno somático, para el caso de antígeno somático más extracto de PLD. Para la curva de disolución del antígeno somático más extracto de PLD se observó una dispersión gradual a partir de 22.55% hasta un máximo de 63.29% a los 180 min.; para el antígeno somático tuvo una dispersión promedio de 33.6% durante todo el proceso y su máximo fue de 39% a los 180 min. y para el extracto de PLD se tuvo una dispersión promedio de 36.6% con un máximo de 41% a los 180 min. Estos últimos llegaron a su meseta en poco tiempo y sin permitir una mayor dispersión de los antígenos. El tiempo de disolución del antígeno se debe considerar, por el tiempo en que tarda el inmunogeno al llegar hasta intestino delgado. Se considera que aproximadamente 2 a 4

horas tarda en recorrer el alimento desde boca hasta intestino delgado en rumiantes (Relling y Mattioli, 2003; Wu and Papas, 1997)

Además que es importante contar una bacterina toxoide porque se necesita tanto de la PLD y los ácidos micólicos para una mayor protección. Al tener solo una bacterina se disminuye la incidencia de la LC pero en casos de infección no evita la diseminación de la bacteria causando abscesos en diferentes sitios y en caso de solo toxoide decrece la diseminación de la bacteria y abscesos (Windsor, 2011).

Al tener una vacuna oral permite una sola dosificación como en el trabajo Hodgson *et al* (1994), que administraron una sola dosis con PBS por vía oral de Toxminus. También permitiría la prevención y diseminación de la enfermedad a través de mucosas y siendo de apoyo para la estimulación de inmunidad calostrual (Miranda, 2010). Manejando un programa de vacunación previo al parto y a los corderos cuando baje la inmunidad materna.

## 10 CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se cubrieron los objetivos de aislar e identificar a *Corynebacterium pseudotuberculosis* y la obtención de antígenos, los cuales quedan disponibles para la realización de estudios posteriores.
2. Así mismo, se logró la obtención del título de PLD y detecto mediante la inhibición de hemólisis.
3. Se obtuvieron antígenos somáticos, identificados por Western Blot observándose nueve proteínas (126.98, 93.5, 77.81, 68.84, 60.91, 50.69, 42.19, 31.06, 16.84 y 11.66 kDa) y la PLD se identificó con un peso de 31.0 kDa.
4. La vermiculita se reconoce como un acarreador para los antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por su capacidad de adsorción y dispersión de estos.

## 11 RECOMENDACIONES

Se recomiendan trabajos posteriores para realización de pruebas “*in vivo*” de la matriz como inmunógeno para conocer su capacidad de protección al desafiar los animales por diferentes vías de transmisión y establecer su alcance como inmunógeno.

Seguir con estudios de la vermiculita para aprovechar sus características estructurales y químicas para su uso en veterinaria.

Investigar la interacción de la vermiculita y otras bacterias causantes de enfermedad en los ovinos.

## 12 REFERENCIAS

1. Alves, F. S. F., and Olander, H. (1999) Uso de vaccina toxoide no controlado da linfadenite caseosa em camprinos. *Vet.Noticias*. 5: 69-75.
2. Award, F. I. (1960) Serologic investigation of pseudotuberculosis in sheep. I. Agglutination Test. *Am. J. Vet. Res.* 21: 251 – 253
3. 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
4. Baird G.J., and Fontaine M. C. (2007) *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J. Comp. Path.* 137: 179 – 210.
5. Barrientos J. S., Cortés N., y Tórtora J. L. (2008) Diferentes biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* están involucrados en la Linfadenitis Caseosa Cutánea y Visceral. *RECVET Vol. III: N° 4*.
6. Binns S. H., Green L- E., and Bailey M. (2007) Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.* 123: 169–179.
7. Braga, W.; Schul, S.; Nuñez, A.; Pezo, D.; and Franco, E. (2007) A primary *Corynebacterium pseudotuberculosis* low dose infection in alpacas (*Lama pacos*) protects against a lethal challenge exposure. *Small. Rum. Res.* 72: 81 – 86.
8. Brown, C. C., Olander, H. J., Biberstein, E. L., and Morse, S. M. (1986) Use of a toxoid vaccine to protect goat against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 47:1116-1119.
9. Burrell D. H. (1980). Hemolysin inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Res. Vet. Sci* 25:190 – 194.
10. Burrell, D. H. (1981). Caseous lymphadenitis in goats. *Aust. Vet. J.* 57:105-110.
11. Cameron, C. M. (1973). The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. *Cornell Vet.* 30: 41 – 46.
12. Carne, H. R., and Onon, E. O. (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature.* 271:246-248.
13. Carne, H. R., and Onon, E. O. (1982). The exotoxins of *Corynebacterium ulcerans*. *J. Hyg. (Camb).* 88: 173-191.
14. Cesari E. (1930) Sur le diagnostic de la lymphadenie caséense por l'intradermoreacción aà la Preisz – Nocardine. *Bull. Acad. Vet. France* 36: 291 – 295.
15. Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., Debaere, T., and Vaneechoutte, M. (2002) Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiol.* 88:75-83.



16. Chikamatzu, S., Zhao, H., Kikuchi, N., and Hiramune, T. (1989) Seroepidemiological survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep in Japan using enzyme-linked immunosorbent assay and immuno-diffusion. *Jpn. J. Vet. Sc.* 51(5):887-891.
17. Chirino – Zárrega, C., Scaramelli, A., and Rey – Valeirón, C. (2006) Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Rum. Res.* 2006; 65: 170–175.
18. Chirino – Zárrega, C., Scaramelli, A., Rey – Valeirón, C., and Carrero, L. (2009) Diagnosis of caseous lymphadenitis by ELISA in naturally infected goats from Venezuela. *Small. Rum. Res.* 2006; 87: 92–95.
19. Costa, L.R.R. , Spier, S. J., Hirsh, D. C. (1998) Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Vet. Mic.* 62: 135 – 143.
20. Cubero, P. M. J., Real, F., González, M., y León-Vizcaíno, L. (2002) Epidemiología de la Pseudotuberculosis. *Enfermedades Infecciosas. Ovis.* 17 – 39.
21. D’Afonseca, V., Prosdocimi, F., Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., and Moraes, P. M. (2010) Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiological Res.* 165: 312 – 320.
22. Dercksen, D. P.; Brinkhof, J. M. A.; Dekker, N. T.; Maanen, K.; Bode, C. F.; Baird, G. and Kamp, E. M. (2000) A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Mic.* 75: 167 – 175.
23. Desiderio, V. J. and Turillo, A. L. (1979) Serum proteins of normal goats and goats with caseous lymphadenitis. *Am. J. Vet. Res.* 40: 400 – 402.
24. Dorella, F.A., Estevama, E.M., Cardoso, P.G., and Savassi, B.M. (2006) An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 114: 298 – 303.
25. Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S. C., Miyishi, A., and Azavedo, V. (2006) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37: 201 – 218.
26. Egen, B., Cuevas, A. W., Macnamara, P., Sammons, D. W., Humphreys, R., and Songer, J. G. (1989) Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1319-1322.
27. Ellis, T. M., Sutherland, S. S., Wilkinson, F. L., Mercy, A. R., and Paton, M. W. (1987) The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions and the transmission of this bacterium to other sheep. *Aust. Vet. J.* 64:261-263.
28. 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.

29. Ellis, J. A., Hawk, D. A., Mills, K. W. and Pratt, D. L. (1991) Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep whit caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28: 289-301.
30. Estrvao, S. G., Gallardo, A. A., Abalos, M. A., y Álvarez, L. A. (2009) *Corynebacterium pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revisión de casos. REDVET 10.
31. Fernández, M. I. (2009) Identificación y poder patógeno de microorganismos del género “*Corynebacterium*” aislados de muestras clínicas. Memoria para obtener al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid.
32. Ferrer, L. M., Lacasta, D., Chacón, G., Ramos, J. J., and Villa, A. (2009) Clinical diagnosis of visceral caseous lymphadenitis in Salzwedder ewe. *Small Rum. Res.* 87: 126 – 127.
33. Fontaine M. C., Baird G.J., Connor, K. M., Rudge, K., Sales, J., and Donachie, W. (2006) Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine* 24: 5986 – 5996.
34. Fontaine M. C., and Baird G.J. (2008) Caseous Lymphadenitis. *Small. Rum. Res.* 76: 42 – 48.
35. Gaabary, M. H., Osman, S. A., and Oreiby, A. F. (2009) Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Rum. Res.* 87: 116 – 121.
36. García V. S. (1980) Aislamiento y caracterización de corinebacterias de muestras de ovinos y caprinos en México. Tesis de Licenciatura. ENEP-Cuautitlán, UNAM.
37. Gershwin, L. J., Krakowca, S and Olsen, R. G. (1995) Principles of immunology in immunology and immunopathology of domestic animals. 2° edition. Mosby. USA. Pp 3-34
38. Gillespie, J. H., Timoney, J. F. Scott, F. W. (1988) The genera *Corynebacterium* and *Eubacterium* in Hagan and Bruner’s microbiology and infectious diseases of domestic animals 8° edtion. Cornell University Press. USA. P.p. 250 – 252.
39. Guilloteau, L., Pépin, M. (1990) Recruitment of 99m – technetium – or 111 – indium – labeled polymorphonuclear leukocytes in experimentally induced piogranulomas in lambs. *J. Leuk. Biol.* 48: 343 – 352.
40. Guimaraes, A. S., Seyffert, N, Bastos, B. L., Portela, R. W. D., and Meyer, R. (2009) Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Rum. Res.* 87: 86 – 91.
41. Hard, G. C. (1970) Adoptive transfer of immunity in experimental *Corynebacterium ovis* infection, *J. Comp. Pathol.* 80: 329 – 334.
42. Hoelzle, L. E., Scherrer, T., Muntwyler, J., Wittenbrink, M. M., Philipp, W., and Hoelzle, K. (2013) Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

- and the induced humoral immune response in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 164: 359 – 365.
43. Hsu, T. Y., Renshaw, H. W., Livingston, C. W., Augustine, J. L., Zink, D. L., and Gauer, B. B. (1985) *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxin: fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1206-1211.
  44. 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.
  45. Kaba, J., Kutschke, L., and Gerlach, G-F. (2001) Development of an ELISA for the diagnosis *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Vet. Microbiol.* 78: 155-163.
  46. Lacasta, D., Ferrer, L. M., Ramos, J. J., González, J. M., Ortín, A., and Fthenakis, G. C. (2015) Vaccination schedules in small ruminant farms. *Vet. Microbiol.* 181: 36-38.
  47. Lajoie, D., and Cordes, M. (2015) Spider, bacterial and fungal phospholipase D toxins make cyclic phosphate products. *Toxicon* 108: 176- 180
  48. Lan, D. T. V., Tanigushi, S., Makino, S., Shirahata, T., and Nakane, A. (1998). Role of endogenous tumour necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 42: 863-870.
  49. León, L., Garrido, A. F., González, C. M., and Cubero, P. M. (2002) Anatomía patológica de la pseudotuberculosis en: artículos técnicos de sanidad animal Sa008. *OVIS.* 78: 1 - 21.
  50. Liu, S., Wu, P., Yu, L., Li, L., Gong, B., Zhu, N., Dang, L., and Yang, C. (2017) Preparation and characterization of órgano- vermiculite based on phosphatidylcholine and adsorption of two typical antibiotics. *Applied Clay Science.* 137: 160- 167.
  51. Mackaness, G. B. (1970) The monocyte in cellular immunity. *Semin. Hematol.* 7: 172 – 184.
  52. Maki L. R., Shen S. H., Bergstrom R. C., and Stetenbach, L. (1985) Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep, using an enzyme linked immunosorbent assay. *AM. J. Vet. Res.* 46: 212-214.
  53. Malone, F. E., Hartley, H. M., and Skuce, R. A. (2010) Bacteriological examinations in sheep health management. *Small Rum. Res.* 92: 78 – 83.
  54. McKean, S, Davis, J., and Moore, R. (2005) Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes and Infection* 7: 1352 – 1363.

55. Menzies, P. I., Muckle, C. A., Hwang, Y. T., and Songer, G. J. (1994) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Small Rumin. Res.* 13: 193-198.
56. Menzies, P. I., Hwang, Y-T., and Prescott, J. F. (2004) Comparison of and interferon- $\gamma$  to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 100: 129-137.
57. Meyer, R., Regis, L., Vale, V., Paule, B., Carminati, R., Bahia, R., Moura – Costa, L., Schaer, R., Nasciminetto, I., and Freire, S. (2005) In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 107: 249 – 254.
58. Miranda M. N. (2010) Revisión bibliográfica sobre la inmunidad que se presenta en la linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM.
59. Moussa I. M., Ali M. S., Hessain A. M., Kabli S. A., Hemeg H. A., and Selim S. A. (2016) Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematousskin disease. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 23: 718-723.
60. Muckle C. and Gyles C. (1986) Exotoxic activities of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Current Microbiol.* 13: 57 – 60.
61. Muckle C., Menzies P., Li, Y., and Van Wesenbeck M. (1992) Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbio.* 30: 47 – 58.
62. Müller, B. (2009) Impact of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* and its genetic derivatives on vermiculite: Effects on trace metals contents and clay mineralogical properties. *Geoderma* 153: 94- 103.
63. Muller, B., Henton, M., Lane, E., Parsons, S., and Kotze, A. (2011) Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Vet. Microbio.* 147: 340 – 345.
64. Navarrete, G. S. M. (1988) Obtención de toxina a partir del aislamiento de *Corynebacterium ovis*. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán. UNAM.
65. 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 of abscesses. *Prev. Vet. Med.* 95: 115–126.

66. Oreiby A. F., and Hegazy Y. M. (2016) Diagnosis of ovine caseous lymphadenitis by blood and milk gamma interferon assays. *Small Rum. Res.* 144: 209-112.
67. Pacheco, L. C., Pena, R. R., Castro T. L., Dorella, F. A., and Alves, F. S. F. (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.
68. Paule, B. J. A., Azevedo, V., Regis, L. F., Carminati, R., Bahia, C. R., Vale, V. L. C., and Moura – Costa, L. F. (2003) Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-g production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 96: 129 – 139.
69. Pavan, M. E., Robles, C., Cairo, F.M., Marcellino, R., and Pettinari, M. J. (2011) Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase b-subunit gene (rpoB). *Res. Vet.* 02.007.
70. Pépin, M., Pardon, P., Lantier, F., Marley, J., Leveius, D., and Lamand, M. (1991) Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet. Microbiol.* 26: 381-392.
71. Pépin, M., Seow, H. F., Corner, L., Rothe, J. S., Hodgson, A. L. M., and Wood, P. R. (1997) Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.* 28: 149-163.
72. Playfair, J. H. L. (1992) Complement in: immunology at glance 5<sup>o</sup> Edition. Blackwell Scientific Publications, Great Britain.
73. 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.
74. Quinn, J. P., Markey, K. B., Carter, E. M., and Donnelly, J. W. (2002) Infection and immunity in veterinary microbiology and microbial disease 1<sup>o</sup> edition Blackwell Publishing. United Kingdom. 495 – 515.
75. Renshaw, H.W., Graff, V. P., and Gates N. L. (1970) 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.
76. Retmal, P., Ríos, M., Cheuquepán, F., Abalos, P., Pizarro – Lucero, J., Borie, C., and Gutierrez, J. (2011) Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis* rpoB gene sequence. 03.012
77. Ruiz, J.C., D’Afonseca, V., Silva, A., Ali, A., Pinto, A.C., et al (2011) Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. *PLoS ONE* 6(4): e18551

78. Ruiz, L., Barrera, M., y Frias, M. T. (2007) Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. RECVET Vol. II, N° 8.
79. Ruiz, L., Barrera, M., y Frias, M. T. (2008) Linfadenitis caseosa II: Diagnóstico, control y aspectos epizootiológicos. RECVET Vol. III, N° 4.
80. Schreuder, B. E. C., Ter Laak, F. A., and Derckesen, D. P. (1994) Eradication of caseous lymphadenitis in dairy goats: first report of the disease in Netherlands. *Vet. Q.* 81: 61 – 67.
81. Seyffert, N., Faria, R., Jardim, J., Marques, W., de Paula, T., Rocha, N., de Oliveira, K., Wagner, R., Silva, A., Miyoshi, A., Le, Y., and Azevedo, V. (2014) Serological proteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. *Vet. Microbiol.* 174: 255-269.
82. Seyffert N., and Guimarães A. S. (2010) High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins – based ELISA. *Research in Veterinary Science* 88: 50–55
83. Shen, D. T., Jen, L. W., and Gorham, J. P. (1982) The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by enzyme – linked immunosorbant assay (ELISA). *Proceeding 3<sup>rd</sup> International Conference on goat production and disease.* Tucson Arizona 445 – 448.
84. Soares, S. C., Trost, E., Ramos, R., Carneiro, A. R., Santos, A. R., Pinto, A. C., Barbosa, E., Aburjaile, F., Ali, A., Diniz, C., Hassan, S. S., Fiaux, K., Guimarães, L. C., Bakhtiar, S. M., Pereira, U., Almeida, S. S., Abreu, V., Rocha, V. S., Dorella, F. A., Miyoshi, A., Silva, A., Azevedo, V., and Tauch, A. (2013) Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine. *J Biotec.* 167: 135- 141.
85. Solanet, J.J., Malena, R., Estein, S. M., y Belchior, S. E. (2011) Desarrollo de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en carneros vacunados o infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Argentina de Microbiología* 43: 9 – 17.
86. Sting, R., Steng, G., and Spengler, D. (1998) Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. *Zentralb. Veterinarmed.* 45: 209-216.
87. Stapleton, S., Bradshaw, B., and O’Kennedy, R. (2009) Development of a surface plasmon resonance-based assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Analytica Chimica Acta* 651: 98 – 104.
88. Su, X., Ma, L., Wei, J., and Zhu, R. (2016) Structure and thermal stability of organ-vermiculite. *Applied Clay Science* 132-133: 261 -266.

89. Sunil, V., Menzies, P. I., Shewen, P. E. and Prescott J. F. (2008) Performance of a whole blood interferon- gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. *Vet. Microbiol.* 128: 288-297.
90. Sutherland, S. S., Ellis, T. M., Mercy, A. R., Paton, M., and Middleton, H. (1987) Evaluation of an Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for the Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in sheep. *Vet. Microbiol.* 263-266.
91. Ter Laak, E. A., Bosch, J., Bijl, G. C., and 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: 1125-1132.
92. Trost, E., Ott, L., Schneider, J., Schroder, J., and Jaenicke, S. (2010) The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into generegulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics* 11:728
93. Urquiza, P. M. P. (2007) Establecimiento de una prueba de ELISA para el diagnóstico de linfadenitis caseosa en cabras. Tesis de licenciatura. FESC – UNAM.
94. Valásková, M., and Martynková, S. (2012) Vermiculite: Structural Properties and Examples of the Use. INTECH 209-229.
95. Windsor, P. A., and Bush, R. D. (2016) Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? *Small Ruminant Research* 142: 6-10.

## ANEXO 1

### Reactivos:

#### A) Aislamiento:

Agar sangre (BectonDickson).

Medio PPLO (Becton Dickson).

#### B) Caracterización bioquímica(Becton Dickson):

Oxidación - Fermentación (O-F)

Caldo Urea

Rojo de Metilo-VogesProskaver (MR- VP)

Nitratos

Sulfhídrico-Indol-Motilidad (SIM)

#### C) Azúcares con base de agua peptonada:

Glucosa (Sigma Aldrich)

Maltosa (Sigma Aldrich)

Trehalosa (Sigma Aldrich)

Xilosa (Sigma Aldrich)

Manitol (Sigma Aldrich)

#### D) Tren de tinción de Gram (Sigma Aldrich):

Cristal violeta

Lugol

Acetona

Safranina

#### E) Obtención de antígeno

PBS (150 mMNaCl, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> X 12 H<sub>2</sub>O, 2.5 mMKCl, pH7.2) (Sigma Aldrich)

Buffer de preparación de antígeno (0.5 M Tris pH 6.8; 5.2% SDS, 8.7% 2-mercaptoetanol) (Sigma Aldrich)

#### F) Determinación de proteínas

Reactivo de Bradford (Bio-Rad)



### G) Western Blot

Buffer muestra

Gel separador (acrilamida/ Bis acrilamida 30%) (Sigma Aldrich)

Isopropanol 80% (Sigma Aldrich)

Buffer tank 1X (Tris base, glicerina, SDS) (Sigma Aldrich)

Marcador de peso molecular (Bio-Rad)

Buffer transfer (Tris Base, metanol, glicina) (Sigma Aldrich)

Leche al 3%.

Tris NaCl pH 7.4 (Sigma Aldrich)

Buffer de revelado (Tris NaCl, Tris Base) (Sigma Aldrich)

Material/ Equipo (Se mantiene bitácora de uso, junto monitoreo, mantenimiento preventivo y calibración):

Esponja (Bio-Rad)

Papel filtro (Whatman)

Membrana (immobilon –p transfer membrane, tipo PVDF, poro 45µm)

Tubos de ensaye de 5 y 10 ml, estériles

Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml, estériles

Viales estériles

Estufa bacteriológica (Blu-M)

Agitador (Caframo RZR-1)

Centrífuga

Microscopio compuesto

Espectrofotómetro (Thermo- Scientific)

Jeringas de 10 ml

Micropipetas (10, 200, 500, 1000 µl)

Micropipeta multicanal (200 µl)

Puntas para micropipeta diferentes capacidades