



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“PRODUCCIÓN DE UNA BACTERINA PARA LINFADENITIS
CASEOSA Y LA EVALUACIÓN DE SU COMPOSICIÓN A TRAVÉS
DE ELECTROFORESIS”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

GIOVANY ORTIZ ARANA

ASESORES:

Dr. en C. ROBERTO MONTES DE OCA JIMÉNEZ.
M en C. POMPOSO FERNÁNDEZ ROSAS.
Dr en C. JORGE PABLO ACOSTA DIBARRAT.

REVISORES:

Ph.D. Juan Carlos Vázquez Chagoyan.
M. en C. Arturo García Álvarez

Toluca, México, Agosto de 2016



“Producción de una bacterina para linfadenitis caseosa y la evaluación de su composición a través de electroforesis”

**“PRODUCCIÓN DE UNA BACTERINA PARA LINFADENITIS CASEOSA Y LA
EVALUACIÓN DE SU COMPOSICIÓN A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS”**

INDICE

DEDICATORIAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE CUADRO.....	vii
ÍNDICE FIGURA.....	viii
ÍNDICE ANEXO.....	ix
RESUMEN.....	x
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
Antecedentes de la Enfermedad.....	2
Sinonimia.....	2
Epidemiología de LAC.....	2
Importancia Económica.....	4
Potencial Zoonótico.....	4
Características del Agente.....	5
Antígenos y Factores de Patogenicidad.....	5
Transmisión.....	8
Inmunopatogénesis.....	9
Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad.....	11
Diagnóstico Clínico.....	12
Procedimientos de Laboratorio.....	13
Diagnóstico diferencial.....	14
Diagnóstico molecular.....	14
Inmunógenos ensayados para el control de la LAC.....	15
Vacunas experimentales.....	17
Bacterina muerta o inactivada.....	17
Bacterina viva atenuada.....	19
Bacterina con subunidades antigénicas.....	19
Bacterina recombinante.....	20
Resistencia de <i>C. pseudotuberculosis</i> a la inmunoprofilaxis.....	20
III. JUSTIFICACIÓN.....	23

IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVOS.....	26
General.	26
Específicos.	26
VI. MATERIAL Y MÉTODO.....	27
VII. LIMITE DE ESPACIO.....	35
VIII. LÍMITE DE TIEMPO.....	36
IX. RESULTADOS	37
X. DISCUSIÓN	47
XI. CONCLUSIÓN.....	49
XII. SUGERENCIA.....	50
XIII. LITERATURA CITADA	51
ANEXOS.....	61

ÍNDICE CUADRO

Cuadro 1.- Pesos moleculares de las proteínas antigénicas reconocidas por sueros de cabras con infección natural con <i>C. pseudotuberculosis</i>	8
Cuadro 2.- Desarrollo de bacterinas experimentales de <i>C. pseudotuberculosis</i> en los últimos 40 años	17
Cuadro 3.- Primers usados para la detección de genes de virulencia y genes filogenéticos	28
Cuadro 4.- Primers usados para la detección de genes de virulencia Fag A-D....	29
Cuadro 5.- Resultado API-Coryne <i>C. pseudotuberculosis</i> candidatos para la elaboración de bacterina	38
Cuadro 6.- Variaciones en Reducción Nitrato a Nitritos de aislados de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	39
Cuadro 7.- Genes de Virulencia de aislamientos de <i>C. pseudotuberculosis</i> candidatos elaboración de bacterina	40
Cuadro 8.- Presentación clínica de los Aislamientos <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> candidatos a la elaboración de la bacterina	41
Cuadro 9.- Resultados variabilidad fenotípica y genotípica de los aislados de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> por pruebas bioquímicas tradicionales, Sistema Apy-Coryne, PCR y prestación clínicas	42
Cuadro 10.- Conteo en placa (UFC/ml) de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	43
Cuadro 11.- Bando proteico de bacterinas <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	46

ÍNDICE FIGURA

Figura 1. Países que han informe su situación sanitaria sobre linfadenitis caseosa	3
Figura 2.- Patogenia linfadenitis caseosa	11
Figura 3.- Lesión linfadenitis caseosa ovino región de la cabeza	12
Figura 4.Extracción de ADN	28
Figura 5.Electroforesis en gel poliacrilamida en condiciones desnaturizante sistema discontinuo. (A) Montaje y preparación en gel poliacrilamida (B) Sobrenadante de bacterinas de aislado <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (C) Ejemplo estimación del peso molecular proteínas hipotética desconocida de <i>E.Coli</i>	33
Figura. 6 Morfología. Colonia de asilamiento <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> , presencia β hemolisis	37
Figura 7. Ovinos. Abscesos en nódulos linfáticos mandibulares (A) y nódulo paratoideo (B)	41
Figura 8. Conteo en placa <i>C. pseudotuberculosis</i> determinación microorganismos presentes de la bacterina ATCC 43429	43
Figura 9.- Bacterina y prueba esterilidad. Bacterina 4-4 (A), prueba de esterilidad placa gelosa sangre 8% (B), placa infusión cerebro corazón (BHI)	44
Figura 10. Visualización bandeado proteico en el pellet de las bacterinas.....	45
Figura 11.Visualización bandeado proteico de las bacterinas extracto sobrenadante	46

ÍNDICE ANEXO

Anexo A. Aislamientos <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en ovinos y caprinos	61
Anexo B. Protocolo de pruebas API-Coryne	62
Anexo C. Curva de calibración de proteínas totales	64
Anexo D. Preparación de soluciones	65
Anexo E. Preparación del Gel poliacrilamida	66
Anexo F. Tinción de proteínas	67
Anexo G. Perfiles bioquímicos en el sistema API-Coryne. Aislamiento de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> obtenidos de abscesos ovinos y caprinos	68
Anexo H. Perfiles bioquímicos clásicas. Aislamiento de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> obtenidos de abscesos ovinos y caprino	69
Anexo I. Identificación de Genes Virulencia y Genes Patogenicidad	70
Anexo J. Gen virulencia Fag B. Aislado 3540 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	71

RESUMEN

PRODUCCIÓN DE UNA BACTERINA PARA LINFADENITIS CASEOSA Y LA EVALUACIÓN DE SU COMPOSICIÓN A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS

“Giovany Ortiz Arana; Dr. en C. Roberto Montes de Oca Jiménez; M. en C. Pomposo Fernández; Dr. En C Jorge Pablo Acosta Dibarrat”.

La linfadenitis caseosa ovina es una enfermedad causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*, que forma piogranulomas externos e internos en los ovinos y caprinos, lo cual provoca disminuciones en la producción de carne, leche o lana, disminuyendo las posibilidades de comercialización. Es considerada una de las enfermedades más importantes, desde el punto de vista económico Países desarrollados y en vía de desarrollo una vez que la enfermedad se instaura dentro de una producción es difícil la erradicación dicha enfermedad. El presente estudio se elaboró 6 bacterinas a partir de 60 aislados de ovinos y caprinos obtenidos dentro del territorio nacional. Dichas bacterinas se seleccionaron conforme a las similitudes y variabilidades en las características fenotípicas de la bacterias a través de los resultados obtenidos por pruebas de identificación de bioquímicas clásicas y sistema identificación API-Coryne (González, 2014) y a las similitudes y variabilidades en las características genotípicas a partir de la identificación de los genes de patogenicidad *PLD*, *rpoB*, *16srADN*, y genes de virulencia *Fag A*, *Fag B*, *Fag C*, *Fag D* (Hernández, 2015), presente de los aislados *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*, relacionándose con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, con el fin de la determinación del patrón bandeado presentes de dichas bacterinas a través de electroforesis en gel poliacrilamida en condiciones desnaturizante sistema discontinuo (SDS-PAGE). En este estudio se detectó 8 bandas proteicas con pesos moleculares de 14, 17, 20, 28, 31, 75,108 y 125 kDA presente en 83.33% (5/6) de las bacterinas elaboradas a partir de aislados autóctonos de *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis* obtenidos de ovinos y caprinos. Se detectó 3 bandas proteicas de alto peso molecular de 125,108 y 75 KDA presente en las bacterinas del pellet (masa celular) y 5 bandas proteicas de bajo peso molecular de 14, 17, 20,28 y 31 kDA en el extracto del sobrenadante.

I.- INTRODUCCIÓN

La pseudotuberculosis o linfadenitis caseosa es una enfermedad bacteriana supurativa infectocontagiosa de evolución crónica causada por el agente *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que afecta principalmente a pequeños rumiantes aunque también afecta vacas, caballos y otros animales domésticos (Brown y Olander 1987; Aleman *et al.*, 1996). Se han comunicado casos de infecciones en humanos que tienen contacto con animales infectados (Peel *et al.* 1997). Países como Australia, Canadá, Estados Unidos y Nueva Zelanda es considerada una de las enfermedades infecciosas económicas más importantes por afectar la producción ovina y caprina. Causando pérdidas debido al deterioro del estado general progresivo del animal que se traduce en: una disminución de la producción de lana, carne, leche; desórdenes reproductivos y decomiso de vísceras. Pese a su incidencia se ha subestimado la importancia de linfadenitis caseosa (LAC) en la producción ovina y caprina. (Esteveo y Gallardo 2006).

Debido a su curso crónico y poca respuesta al tratamiento es difícil erradicar la infección de una vez que se establece en una explotación. Por ello, las estrategias para establecer los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad deben ser integrales. Algunos de los aspectos limitantes para el control de LAC es que no existen pruebas de diagnóstico suficientemente sensibles y específicas para establecer el diagnóstico; además, las vacunas y bacterinas no han arrojado resultados satisfactorios en modelos animales. La protección ofrecida por las vacunas comerciales (Glanvac™ 3 y 6) en Australia, reportan aproximadamente 20 - 65% de protección de la inmunización en los animales.

El presente documento pretende identificar genes que codifican para los factores de patogenicidad y proteínas inmunogénicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis* aislados de campo, con el fin de producir una bacterina y su evaluación protectora en ovinos. Se realizará la identificación de los genes 16S rDNA, rpoB, PLD, Fag A, Fag B, Fag C y Fag D, en 60 aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*.

Se pretenden seleccionar aquellas cepas que portan mayor número de genes de patogenicidad y se relacionará con los registros de los casos clínicos más graves de LAC, para producir una bacterina contra LAC. Una vez producidas las bacterinas y se les realizará estudio electroforético en gel de poliacrilamida, para identificar el patrón bandas de proteínas presentes en las bacterinas.

Palabras clave: Linfadenitis caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, genes de patogenicidad, bacterina inactivada, electroforesis SDS-PAGE, proteínas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

Antecedentes de la Enfermedad.

Un microorganismo parecido a *Corynebacterium pseudotuberculosis* fue descrito por primera vez en 1888 por un veterinario francés llamado Edmond Isidore Nocard, quien reconoció a este como causante de la linfangitis bovina. Tres años más tarde, en Budapest, Hugo Von Preisz aisló una bacteria similar a partir de un absceso renal en oveja, por lo cual el microorganismo fue denominado "Bacilo de Preisz y Nocard". Nocard en 1893 volvió a observar el microorganismo en el pseudomuerto equino y al año siguiente Preisz lo describió en detalle, denominándolo *Bacillus pseudotuberculosis ovis*. En 1911 Buchanan sugirió eliminar la designación de la especie, quedando entonces *Bacillus pseudotuberculosis*. (Baird y Fontaine, 2007). En 1918, Ebersson sugirió reclasificarlo como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Con la edición del Manual Bergey muchas de las discrepancias fueron solucionadas denominándose en 1923 como *Corynebacterium ovis*.

Con la salida de la 6° edición del Manual Bergey en 1948, el nombre oficial cambió a *Corynebacterium pseudotuberculosis* que en la actualidad resulta el término correcto para su denominación. (Merchant y Parcker, 1980 ; Brown y Olander, 1987; Baird y Fontaine, 2007).

Sinonimia.

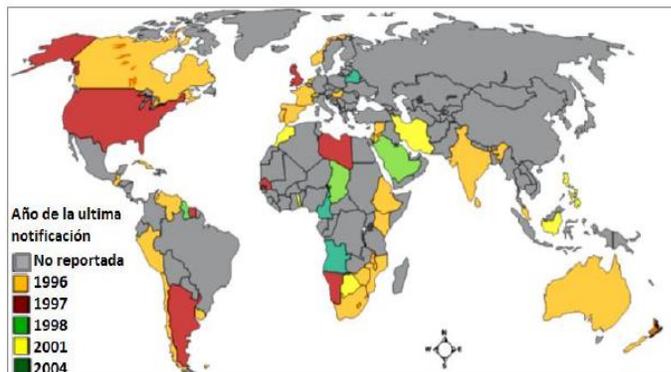
- Linfadenitis Caseosa (LAC).
- Pseudotuberculosis.
- Apostema de los ovinos.
- Síndrome de la oveja flaca.
- Enfermedad de Preisz-Nocard (Esteveo *et al.*, 2006).

Epidemiología de LAC.

C. pseudotuberculosis es un microorganismo cosmopolita que produce la enfermedad de linfadenitis caseosa ovina (LAC), que es una enfermedad de importancia mundialmente debido a la alta prevalencia y por originar pérdidas económicas en la producción ovina y caprina. Es una enfermedad muy difundida pero poco comunicada, por ello la prevalencia en pequeños rumiantes es subestimada debido a la falta de notificación en muchos países (Çetinkaya *et al.* 2002).

A partir de 1996 - 2004, entre los 201 países que informaron sobre su situación sanitaria de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE). En la (Figura 1), 64 declararon que no tenían animales LAC dentro de sus fronteras. Estos países se distribuyen en las Américas (19 de 42 países), África (18 de 51), Asia (11 de 43),

Europa (14 de 51) y Oceanía (2 de 14) (OIE, 2009). Sin embargo, países como México, Brasil, Turquía, Egipto, entre otros; presentan la enfermedad dentro de sus producciones ovinas y caprinas, pero se declaran libres de esta enfermedad es probablemente que este sub-notificada o no la reportan con las autoridades internacionales competentes, ya que la declaración de la OIE se realiza únicamente por las autoridades sanitarias oficiales de cada país.



Organización Mundial Sanidad Animal (OIE, 2009)

Figura 1. Países que han informe su situación sanitaria sobre linfadenitis caseosa (OIE, 2009).

En Australia se reporta una prevalencia del 54 % (Nairn *et al.*, 1977; Batey, 1986); en Tasmania (Middleton *et al.*, 1991) encontraron lesiones de la enfermedad en el 26% de los animales que investigaron. En Europa, se refiere que la enfermedad se reporta en Holanda desde 1984 (Lark *et al.*, 1992), mientras que en Francia la enfermedad la reportan con una prevalencia de un 54% (Pépin *et al.*, 1988).

En América. Se reportan aislamientos de varias zonas dentro de los Estados Unidos como Arizona, Texas, Washington, Wyoming, Iowa, y en Canadá se reportan en regiones como Ontario y Alberta. Pépin y col (Pépin *et al.*, 1988) refieren una prevalencia del 42.4% en regiones del oeste de los Estados Unidos. En Brasil en la región de Río de Janeiro encontraron que el 77% de los rebaños caprinos estaban infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, con porcentajes de afectación que varían desde el 3.5% al 100 % presentaciones de las lesiones en los animales (Ruiz *et al.*, 2007).

En México el 5.4% de los exudados nasales pertenecientes a ovejas trashumantes en Xalatlaco presentaron *Corynebacterium spp.*, (Ochoa *et al.* 1996), en otro

estudio se identificó en lesiones de nódulos linfáticos el 65% de los casos se aisló *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Songer *et al.*, 1988).

Importancia Económica

La linfadenitis caseosa causa importantes pérdidas económicas en las producciones ovinas y caprinas en todo el mundo, principalmente debido a la disminución en producción lana, carne y leche. En las hembras provoca desórdenes reproductivos con un menor porcentaje de preñeces en el rebaño y en los machos rechazo de carneros. Por otra parte durante el sacrificio el decomiso de vísceras y pieles en los mataderos (Paton *et al.*, 1994; Arsenault *et al.*, 2004).

Estos hechos podrían impactar en las exportaciones, disminuyendo las posibilidades de comercialización o el valor de la carne ovina. Es considerada una de las enfermedades más importantes, desde el punto de vista económico, que afecta ovejas y cabras en países como USA, Canadá y Australia (Burrell, 1980, Paton *et al.*, 1994, Stanford *et al.*, 1998), habiéndose comunicado para Australia una pérdida en la producción de lana de 17 millones de dólares (Paton *et al.*, 1994).

Potencial Zoonótico

Actualmente la infección por *C. pseudotuberculosis* ha sido reconocida como una enfermedad zoonótica emergente. En general, las infecciones en humanos son raras y usualmente se presentan como LAC adquirida por exposición ocupacional. La prevalencia de la enfermedad en el humano causado por *C. pseudotuberculosis* es probablemente este subestimada, ya que sólo 33 casos han sido reportados durante un período de 42 años desde 1966 a 2008 (Bastos, *et al.*, 2012).

Durante los últimos años, fueron más frecuentes los casos clínicos comunicados en humanos relacionados a infecciones por corinebacterias, siendo consideradas como patógenos oportunistas (Coyle M y Lipsky B, 1990). Esto podría deberse posiblemente a: (i) el aumento de personas inmunocomprometidas, (ii) a que durante años anteriores se subestimó el potencial patógeno de este género y (iii) por el interés que ha surgido en la taxonomía de este grupo bacteriano (Funke *et al.*, 1997; Lipsky *et al.*, 1982).

Características del Agente.

La clasificación taxonómica de agente de la de linfadenitis caseosa ovina es la siguiente,

Dominio	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Corynebacterineae</i>
Familia	<i>Corynebacteriaceae</i>
Género	<i>Corynebacterium</i>
Especie	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
Biovar	“Ovis”

Este microorganismo es un patógeno intracelular facultativo que exhibe formas pleomórficas, tales como coccoides y bacilares filamentosos, que varían en tamaño de 0.5 micras a 0.6 micras por 1.0 micras a 3.0 micras. Es una bacteria no esporulante, no encapsulada y no móvil; sin embargo, tiene fimbrias. Esta bacteria es un anaerobio facultativo y crece mejor una temperatura de 37°C, a un pH de 7.0 a 7.2 (Alves *et al.*, 2005).

Antígenos y Factores de Patogenicidad.

En comparación con otras bacterias patógenas, pocos estudios han investigado los determinantes de virulencia de *C. pseudotuberculosis*. Sin embargo, una comprensión de los mecanismos moleculares y la base genética de la virulencia en *C. pseudotuberculosis* ha mejorado rápidamente. Se ha comunicado que *C. pseudotuberculosis* produce varios factores de virulencia (Aleman y Spier 2001), sin embargo, la patogénesis se debe principalmente a dos factores a los ácidos corynomicólicos y la exotoxina de carácter proteico denominada fosfolipasa D (PLD); ambos contribuyen a la inflamación, edema y diseminación durante el desarrollo de abscesos (Brown y Orlander, 1987, Songer, 1997).

Una de las características más importantes de *C. pseudotuberculosis* es, sin duda su poderosa exoproteína. Ésta fue caracterizada por primera vez por (Carne, 1978; Onon, 1978) quien determinó que era una fosfatidilcolina fosfalido hidrolasa más conocida por fosfolipasa D (PLD). Biológicamente esta exoproteína funciona como un factor de permeabilidad que promueve la difusión del patógeno desde el sitio inicial de la infección a todos los tejidos del cuerpo del hospedero. Además, esta exoproteína causa necrosis de las células endoteliales, lo que contribuye al paso de *C. pseudotuberculosis* de la dermis a los pequeños vasos sanguíneos,

obteniendo con ello el acceso a los vasos linfáticos (Songer, 1997; Egen *et al.*, 2005). Además, PLD se considera una exoproteína citotóxica para las células blancas de la sangre, ya que promueve la destrucción de macrófagos de cabra durante la infección experimental.

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son uno de los grupos de proteínas entre los organismos más altamente conservadas (Qamra *et al.*, 2005). Actualmente se sabe que las proteínas HSPs actúan en eventos como el agotamiento de los nutrientes, alteración metabólica, infección viral, la transformación y otros procesos celulares (Kultz, 2005). Proteínas chaperonas o chaperoninas se encuentran en casi todos los organismos (si no todos) (Braig, 1998) y se clasifican en seis familias: hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, y Hsp100. Sin embargo, en las células procariotas, las proteínas chaperonas más caracterizadas son las hsp60 (groEL), hsp70 (dnaK) y hsp10 (groES) (Eom *et al.*, 2005), y en el género *Corynebacterium* se han descrito dos genes el hsp60 y el gen hsp10 (Barreiro *et al.*, 2004).

En los estudios realizados por Rabbit *et al.*, datos no publicados (Barreiro *et al.*, 2004) se caracterizaron los primeros genes hsp10 y hsp60 de *C. pseudotuberculosis* y se sabe que la mayoría de las HSP son capaces de promover una respuesta inmune tipo humoral y celular, y por lo tanto, tienen propiedades inmunogénicas. Basado en esta información, el mismo grupo de investigación probó una vacuna de ADN hsp60 y una proteína recombinante (Costa *et al.*, 2011).

Otros factores de virulencia importantes para *Corynebacterium pseudotuberculosis* incluyen la proteína integral de membrana (Fag A), transportador enterobactina hierro (Fag B), ATP vinculante proteína de la membrana citoplasmática (Fag C) y proteína de unión al hierro (Fag D, todos estos factores están relacionados con la adquisición y transporte de hierro que son importantes para la supervivencia bacteriana durante la infección en el entorno de huésped (Brown y Holden, 2002).

Este mecanismo ha sido ampliamente descrito en bacterias Gram negativas y también en las bacterias Gram positivas, donde varios trabajos han sido publicados en las bases moleculares de la absorción de hierro (Brown *et al.*, 2001).

Sin embargo, en *C. pseudotuberculosis* (Billington *et al.*, 2002) describen un operón *Fag A*, *Fag B* y *Fag C* con la identidad 32-47% a las proteínas implicadas en los sistemas de captación de hierro. Los genes *Fag A*, *Fag B*, *Fag C* y *Fag D* se encuentran ligados con el gen PLD en la producción de la enfermedad. Estos genes raramente se expresan *in vitro*. Pero cuando estos genes se expresan durante la infección, aumentan la virulencia de *C. pseudotuberculosis*, lo que

indica que pueden ser necesarios para la expresión de estos genes factores del huésped (Billington *et al.*, 2002).

El hallazgo de estos genes de patogenicidad, son los que contienen los elementos de virulencia clásicos, incluyendo genes para la absorción de hierro, subunidades fimbriales, elementos de inserción y las proteínas secretadas, probablemente adquiridos a través de la transferencia horizontal, y que contribuye a la comprensión de cómo esta especie causa la enfermedad (Ruiz *et al.*, 2011). Dado que el tratamiento de la linfadenitis caseosa es difícil, debido a que es una bacteria intracelular y se caracterizan por producir la enfermedad de manera crónica y latente, son capaces de sobrevivir y multiplicarse aun dentro de las células y estas bacterias están en un nicho inaccesible a los anticuerpos circulantes, su eliminación requiere mecanismos inmunes distintos a los ya vistos para las bacterias extracelulares, por lo cual la vacunación sería una alternativa importante (Meyer *et al.*, 2002). El potencial de interferencia del PLD y los genes en la aptitud FAG bacteriana, que dan la capacidad para multiplicarse y sobrevivir en el huésped colocan estos genes como candidatos para la producción de vacunas vivas. Modificando por medio de mutagénesis el sitio específico del gen PLD, o los genes en la aptitud FAG bacteriana (Hodgson *et al.*, 1999; Billington *et al.*, 2002).

Adrien *et al.*, (2004) compararon diferentes técnicas para la obtención de extractos antigénicos de *C. pseudotuberculosis* de secreción, de superficie y somáticas. Para la caracterización de estos extractos se emplearon técnicas de electroforesis SDS-PAGE, Western blot y inmunotransferencia. Se detectaron 16 bandas inmunorreactivas de 24,28 ,31 ,41 ,43 ,50 ,52 ,64 ,68 ,72 ,75 ,85 ,90 ,108 y 125 kDa. Las bandas 24,31 ,40 ,41 ,68 ,75 ,108 y 125 kDa fueron reconocidas con mayor intensidad, confirmando los hallazgos de (Ellis *et al.*, 1991), que también obtuvieron 15 bandas por encima de 100 kDa por SDS-PAGE.

Además de las bandas antigénicas de 25,31 ,40 ,63 y 68 kDa descritas por estos autores y otros (Ellis *et al.*, 1991; Braithwaite *et al.*, 1993), existen al menos 3 proteínas inmunodominantes de 75, 108 y 125 kDa, todas ellas presentes en la fracción celular. Curiosamente, estos antígenos de alto pesos moleculares se detectaron a través de dos métodos de extracción el primero por la ultrafiltración del medio de cultivo (BHI) y el segundo por medio de precipitación con sulfato de amonio, técnica comúnmente utilizada para el estudio de los antígenos de secreción (Ellis *et al.*, 1991; Braithwaite *et al.*, 1993).

Cuadro 1.- Pesos moleculares de las proteínas antigénicas por la técnica SDS- PAGE y Westerblot de cabras en infección natural con *C. pseudotuberculosis*.

Método extracción	Peso molecular	125	108	90	85	75	68	64	53	50	43	41	40	31	28	24
Extracto somático (detergente)		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Extracto somático ultrasonificación		X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Extracto (NaCl)		X	X			X		X				X	X			X
Extracto secretado		X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X

(Adrien *et al.*, 2004)

Transmisión.

El potencial de *C. pseudotuberculosis* puede sobrevivir durante varias semanas en el medio ambiente que contribuye a su capacidad de propagarse dentro de un rebaño (Augustine *et al.*, 1986 y Buxton *et al.*, 1977). La transmisión entre las ovejas o cabras se produce principalmente a través de la contaminación de heridas superficiales o abrasiones y casos excepcionales se ha reportado que también se puede transmitir por aérea. (Alemán y Spier, 2001). La transmisión a través de las heridas pueden aparecer durante los procedimientos comunes, tales como trasquilado, la castración y etiquetado de oído o a través de lesiones en los órganos internos como el hígado, riñón, páncreas, pulmón, etc. del animal generados por otros eventos traumáticos. Algunas veces la tos de las ovejas y cabras infectadas por esta bacteria puede estar en contacto con cortes en la piel de otras ovejas, lo que constituye otro medio de transmisión (Paton *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 2001).

Inmunopatogénesis.

La progresión de LAC en pequeños rumiantes, comienza como una infección primaria de la herida y se diseminan por los vasos linfáticos subcutáneos o submucosas, donde las bacterias son fagocitadas por macrófagos que migran al sitio de invasión (Aleman y Spier, 2001). Según Brown y Olander (1987), en la patogénesis de la linfadenitis caseosa existen dos factores que juegan un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad. La producción de una exotoxina termolábil de carácter proteico denominada fosfolipasa D (PLD) y la presencia de ácidos micólicos en la pared celular de la bacteria.

Los pasos de la infección se han separado en las siguientes fases:

a) Fase inicial (días 1-4). Es caracterizado por el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos al sitio de inoculación y el drenaje de los nódulos linfáticos. Después de *C. pseudotuberculosis* es capturado por las células fagocíticas, tales como neutrófilos y macrófagos, el fagosoma se fusiona con el lisosoma, formando el fagolisosoma (Batey, 1986). Las bacterias sobreviven dentro de los macrófagos debido a que algunos macrófagos no pueden producir óxido nítrico en respuesta a *C. pseudotuberculosis* en vivo, lo que resulta en la limpieza ineficaz del organismo (Bogdan *et al.*, 1997). Estos efectos podrían estar asociados con la capa lipídica externa en la pared celular de *C. pseudotuberculosis* y otros componentes antigénicos que atenúan la producción de óxido nítrico por los macrófagos. Durante ese tiempo, las bacterias se liberan como resultado de un proceso que conduce a la muerte de los fagocitos, aunque esta propiedad varía entre las diferentes cepas (Stefańska *et al.*, 2010).

Los lípidos de la pared celular constituyen un factor piogénico, relacionado con la infiltración masiva con leucocitos polimorfonucleares, que transportan a las bacterias a los nódulos linfáticos, y con el efecto citotóxico que destruye a los macrófagos (Brown y Olander 1987; Aleman y Spier 2001).

La exoproteína fosfolipasa D (PLD) y esfingomielinasa hidrolizan, respectivamente, lisofosfatidilcolina y esfingomielinina de las membranas de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos. La desestabilización de las membranas provoca la lisis celular, incrementando la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edema y facilitando la colonización y diseminación regional y sistémica en el huésped (Lipsky, *et al.* 1982, Peel, *et al.*, 1997, Aleman y Spier, 2001).

La fosfolipasa D inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la degranulación de células fagocíticas, y activación del complemento por la vía alternativa, ocasionando necrosis y trombosis de linfáticos y favoreciendo la supervivencia y

multiplicación del microorganismo (Aleman y Spier, 2001). Otro elemento importante al analizar la patogenia es, sin duda, la secuencia de eventos que caracterizan a la enfermedad, los cuales son los siguientes:

b) Fase de amplificación (5-10 días), que se caracteriza por el desarrollo de piogranulomas. La infección parte de heridas superficiales de la piel y aun cuando exista supuración, lo más común es que se recobre la herida espontáneamente antes de producirse la enfermedad; si esto no ocurre la infección se extiende a los nódulos linfáticos locales y aquí se multiplican y se convierten en parásitos facultativos intracelulares. El tejido linfoide se acumula alrededor de la lesión (leucocitos y neutrófilos) sobre todo bacterias y fibrocitos formando capas en la periferia. Los metabolitos tóxicos y la exoproteína matan a los leucocitos lenta pero continuamente. Este proceso da lugar a la formación de abscesos. Las bacterias no controladas por la pared del absceso entran a los capilares y forman colonias que ocluyen y forman trombos en los vasos; lo cual produce isquemia, que junto a las toxinas, mata a las células de la parte sana, y se adiciona una nueva capa a la masa necrótica (Dorella *et al.*, 2006)

c) Fase de estabilización, caracterizado por la maduración y la persistencia de la piogranulomas (Pépin, *et al.*, 1997). En la (figura 2). Si escapan bacterias vivas se disemina la enfermedad a través de los vasos linfáticos, y penetra en otros ganglios y, eventualmente en los vasos sanguíneos, de esta forma puede llegar a diferentes órganos donde se repite la formación de abscesos con desarrollo de procesos neumónicos, pielonefritis, ataxia, etc. El tejido conectivo de los abscesos puede romperse y descargar pus y bacilos al exterior (Bofill, *et al.*, 1988).

Patogenia

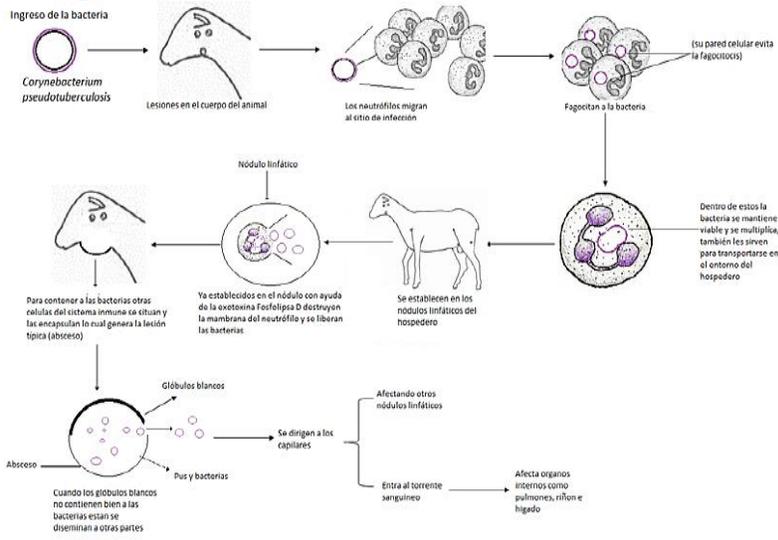


Figura 2.- Patogenia linfadenitis caseosa (Aldama, 2016).

Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad.

Según Brown y Olander (1987) a pesar de que *Corynebacterium pseudotuberculosis* ha sido aislado de abscesos y otros procesos supurativos en diversas especies animales, este solo se reconoce como causa de síndromes o enfermedades específicas en tres especies. Es reconocido como un agente etiológico de diferentes síndromes en pequeños rumiantes, equinos y bovinos (Von Graevenitz y Krech, 1992). En pequeños rumiantes la enfermedad se clasifica en dos formas clínicas bien diferenciadas: típica y atípica. Por una parte las formas típicas, son las que forman focos caseosos en forma cutánea que luego se abscedan, se distingue una presentación clásica y una forma visceral (León *et al.*, 2002).



Figura 3.- Presentación cutánea linfadenitis caseosa ovino región de la cabeza.

Fuente original (Ortiz, 2016).

La primera se caracteriza por la supuración y necrosis de ganglios del sistema linfático subcutáneo, que se palpan a través de la piel y pueden exudar pus. En ovinos, la apariencia morfológica de los nódulos abscedados, se puede presentar con la característica de catáfila de cebolla.

En la forma visceral los abscesos se manifiestan en órganos importantes como pulmones, hígado y riñones, causando deterioro en la condición orgánica del animal y pudiendo evolucionar hacia estados caquéticos de curso crónico (Euzéby, 1999, Yeruham *et al.*, 2000; León *et al.*, 2002). Los cuales plantean, que tanto en ovinos como en caprinos, la forma interna con abscesos viscerales es la menos frecuente, pero la más severa de la enfermedad.

Las formas atípicas, son poco frecuentes; las lesiones macroscópicas no se corresponden con un nódulo caseoso, considerándose dentro de ellas la toxemia neonatal o icterohemoglobinuria de recién nacidos y formas localizadas en las que la lesión es de naturaleza piógena: artrosinovitis, endometritis, epididimitis, mamitis, orquitis (León *et al.*, 2002).

Diagnóstico Clínico.

El diagnóstico presuntivo de la infección por *C. pseudotuberculosis* en vivo, se basa en la palpación de ganglios superficiales aumentados de tamaño, las características macroscópicas de los exudados, signos clínicos como fiebre o pérdida de peso, y datos epidemiológicos como la prevalencia local, la edad del ovino (Estevao *et al.*, 2006).

El diagnóstico definitivo se establece a través del análisis bacteriológico. El cultivo del microorganismo generalmente se realiza a partir de exudados obtenidos de los

abscesos y tejido necrosado (Aleman y Spier 2001; León *et al.*, 2002). Se necesita un medio más rico de nutrientes para favorecer el crecimiento rápido y abundante de *Corynebacterium pseudotuberculosis* lo cual se logra con la suplementación con suero o sangre.

Procedimientos de Laboratorio.

El análisis bacteriológico incluye microscopía. A la observación microscópica se pueden observar algunos bacilos Gram positivos agrupados en forma empalizada o de letras chinas. (Chirino *et al.*, 2005).

Para cultivar muestras de hisopos nasales, especímenes fecales, suelo o materiales semejante, es conveniente utilizar un medio selectivo con telurito de potasio, en este medio el crecimiento es de color negro lodoso y la superficie presenta pequeñas cavidades. *C. pseudotuberculosis* crece mejor en 37°C en velobiosis. En medio agar sangre el crecimiento aparece en 24 a 48 horas, se observan colonias, prácticamente transparentes o blancas, secas y rodeadas de una β hemólisis tenue de menos de 1 mm de diámetro. La prueba de reducción de nitratos a nitritos diferencia los biotipos de *C. pseudotuberculosis biovar ovis* y *biovar equi* (Leardini *et al.*, 2002; Vay y Almuzara, 2002).

Se han evaluado sistemas comerciales para la identificación de corynebacterias como el sistema API-Coryne identification system (Biomérieux, France), API20S system (Analytab Productos, NY). Minitek identification system (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), 60-min Rapid Identification Method (Austin Biological Systems, Austin, Tex), Biolog system (Biolog, Calif). Estos sistemas incluyen test enzimáticos y de fermentación de azúcares. Los métodos rápidos ayudan en la identificación pero no superan la precisión de los métodos microbiológicos convencionales, debido a que requieren de pruebas adicionales para arribar a la identificación final (Coyle y Lipsky, 1990; Funke *et al.*, 1997; Hommez *et al.*, 1999).

En los procedimientos de serología la ELISA se emplearon diferentes soportes antigénicos como antígenos bacterianos de pared celular, exotoxina y exotoxina recombinante, utilizándose para detectar infecciones en ovinos (Kaba *et al.*, 2001). Comercialmente hay disponibles métodos de ELISA, que pueden determinar infecciones subclínicas entre 30 a 60 días pos infección. Los mismos mostraron una especificidad y sensibilidad del 85%. En general, como desventaja, los métodos serológicos pueden presentar resultados falsos positivos debido a similitudes antigénicas entre diferentes especies de corinebacterias y en animales vacunados contra la enfermedad (Aleman and Spier, 2001; Çetinkaya *et al.*, 2002).

Diagnóstico diferencial.

El diagnóstico diferencial con otras patologías, que se manifiestan con abscesos de características similares, es sumamente importante. Entre ellas infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Actinomyces*, *Mycobacterium tuberculosis* y *paratuberculosis*, traumatismo, cuerpos extraños, reacciones de sensibilidad a inyectables y menos comunes tumores (Burrel 1980, Aleman y Spier 2001, León *et al.* 2002). En este aspecto los análisis histopatológicos y cultivos bacteriológicos confirman la etiología de la enfermedad (Burrel 1980, Brown y Olander 1987).

Diagnóstico molecular

Secuenciación del Gen 16S ADN Ribosomal (16S rADN).

Es la más utilizada en el diagnóstico genotípico bacteriano en general. La comparación de las secuencias de los genes 16S rADN o de los que los codifican, permite (Drancourt *et al.*, 2000).

- a) Establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una gran repercusión en la taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente en los tratados fundamentales de Bacteriología, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* y *Procaryotes*. Disponibles en <http://www.springer.com/bergeysoutline/main.htm> y <http://www.prokaryotes.com>, respectivamente. (Drancourt *et al.*, 2000).
- b) La identificación rápida y precisa de las bacterias. En Microbiología Clínica, la identificación molecular basada en la secuenciación del gen 16S rADN se utiliza para bacterias cuya identificación por otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, hecho que sucede en difteromorfos en general y en corinebacterias en particular. (Drancourt *et al.*, 2000).

El uso en los métodos de biología molecular, tal como es el caso de la secuenciación del gen 16S rADN ha facilitado delimitar de manera más estricta los diferentes géneros bacterianos. Por lo tanto la secuencia del gen 16S DNA es el marcador molecular más ampliamente utilizado para determinar las relaciones filogenéticas de las bacterias. Sin embargo, el polimorfismo endógeno limita su utilidad para el análisis taxonómico o la identificación a nivel de especie (Çetinkaya *et al.*, 2002).

Un ensayo de PCR basado en los genes 16S rADN ha sido desarrollado para identificar *C. pseudotuberculosis*, aunque este ensayo fue útil para

estimar la prevalencia de CLA en los animales estudiados, presentaba algunas limitantes: (i) como que era dependiente de cultivo bacteriano; y (ii) que no era lo suficientemente específica para distinguir *C. pseudotuberculosis* de *Corynebacterium ulcerans* y por lo tanto se requiere la identificación de otros genes como PLD y RpoB que son más específicos para distinguir entre especies y subespecies del género *Corynebacterium* (Çetinkaya et al., 2002).

Secuenciación del Gen RpoB

Es el que codifica para la subunidad de la RNA polimerasa (las mutaciones en este gen condicionan la aparición de resistencia de diferentes microorganismos a rifampicina) (Khamis *et al.*, 2004; Khamis *et al.*, 2005). La secuencia completa de este gen es de aproximadamente 3.500 pb. El punto de corte del grado de semejanza para definir especies y subespecies del género *Corynebacterium* ha sido establecido en <96.6 y >98% respectivamente. Pero la secuenciación de un fragmento de 434 a 452 pb permite identificar acertadamente especies de *Corynebacterium*. El mayor grado de semejanza de esta secuencia parcial entre dos especies ha sido de 95.9% frente a un 99.7% de la secuencia completa de 16S rADN (1.500 pb) (programa SVARAP) (Renaud *et al.*, 2007).

Secuenciación o Identificación del Gen Pld.

Que corresponde a un gen que codifica para una proteína (fosfolipasa D) la cual altera la permeabilidad vascular y afecta la función de los neutrófilos en la respuesta inflamatoria (D´Afonseca *et al.*, 2008). Es un blanco de amplificación en ensayos de PCR para discriminar entre aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Corynebacterium ulcerans* una especie genotípicamente muy relacionada.

Estos tres genes *pld*, *rpoB*, *16sRNA*, son los más importantes para el diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y los tres fueron amplificados en un estudio de PCR multiplex con excelentes resultados; obteniendo un método de alta sensibilidad reproducibilidad y eficacia en el diagnóstico de la bacteria (Pacheco *et al.*, 2007).

Inmunógenos ensayados para el control de la LAC. Vacunas comerciales.

La mayoría de las vacunas comerciales actualmente disponibles para linfadenitis caseosa se combinan con vacunas contra otros agentes patógenos. Vacunas

comerciales están disponibles en diversas regiones del mundo. Por ejemplo, Fort Dodge Animal Health (ahora Pfizer), produce una vacuna llamada Biodectin™ que se comercializa en muchos países (Bastos et al., 2012). Ésta vacuna Biodectin™ ha ofrecido una protección a los animales aproximadamente 20% dentro de los rebaños vacunados (Pfizer, 2016).

La vacuna Glanvac™ 3 y 6 (CSL Limited, Australia, Nueva Zelanda), es producida en los Estados Unidos por la compañía Serum Colorado, que es una vacuna multicomponente que incluye antígenos ultrafiltrados de *C. pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novytipo B*, *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei*. La vacuna se administra tanto a ovejas como cabras. Esta vacuna se basa en la inactivación de la fosfolipasa D (PLD) y se denominan vacunas de toxoide. (Paton, et al., 1994), en un análisis de la eficacia de una vacuna combinada contra el toxoide LAC, informaron de una reducción en el número y tamaño de los abscesos pulmonares LAC y una disminución en la propagación de esta enfermedad en el rebaño. (Bastos et al., 2012).

La vacuna Glanvac™ 3 y 6 se aplica un 1 ml por vía subcutánea en el lado del cuello justo detrás y por debajo de la base de la oreja. En los animales no vacunados previamente de todas las edades, se da una dosis de 1 ml y se repite 4 semanas más tarde. Se aplica a todos los animales de las dosis de refuerzo anual para controlar linfadenitis caseosa. La protección ofrecida por las vacunas comerciales Glanvac™ 3 y 6, es del 65%. Se ha reportado como efectos adversos en ovejas, el desarrollo de signos de shock anafiláctico poco después de administración del booster. El precio comercial oscila entre \$1113.92 a \$3920.02 MXM, dependiendo de la presentación y el laboratorio, el precio por vacunación anual de un solo animal oscila \$20.13 a \$31.26 MXM (Zoetis, 2016).

Existe otra vacuna la de USDA (Nacional Animal Disease Center, Ames, IA USA) que contiene pared celular no viable con o sin muramil dipéptido de *C. pseudotuberculosis*. La vacuna está hecha de una cepa viva atenuada (1002) de *C. pseudotuberculosis*, se ha autorizado para su uso en Brasil desde el año 2000, ya está siendo producida industrialmente y la vacuna está disponible en una forma líquida que debe ser administrada anualmente a los animales, por vía subcutánea; una versión liofilizada también está siendo desarrollada por la Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola en colaboración con la Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Federal de Bahía, Brasil (Bastos et al., 2012). Esta vacuna viva confiere alrededor del 83% de protección contra el LAC en cabras en ensayos y en pruebas de campo.

Otra vacuna viva atenuada, LinfoVac (Laboratorios Vencofarma do Brasil Ltda; www.vencofarma.com.br), que tiene licencia para su uso en ovejas y cabras, también está disponible actualmente en Brasil. La dosis es de 1 ml,

independientemente del peso del animal y debe ser aplicada por vía subcutánea. Se vacuna a cabras y a corderos de tres meses de edad, su refuerzo es a los 30 días post vacunación. Y se aplica un refuerzo por año una sola dosis. A pesar de que estas vacunas han estado disponibles comercialmente desde hace mucho tiempo, CLA sigue siendo frecuente (Bastos et al., 2012).

Vacunas experimentales.

Bacterina muerta o inactivada.

Estos estudios han animado a los científicos para crear un modelo de vacuna basada en el uso de células bacterianas muertas, llamados bacterina. *C. pseudotuberculosis* inactivada pueden imitar teóricamente la infección primaria, la promoción de inmunoprotección sin causar enfermedad. Un resumen de los datos de estudios publicados en los últimos 40 años en los modelos de vacuna se presenta en la cuadro 2. (Quevado et al., 1957; Brogden et al., 1984; Brogden et al., 1996; Stanford et al., 1998).

Cuadro 2. Desarrollo de bacterinas experimentales de *C. pseudotuberculosis* en los 40 años.

Año de publicación	País de origen	Modelo animal	Composición del inmunógeno	Tipo de adyuvante	Vía de administración
1972	Australia	Ovino	Bacterinas	AP	----
1984	USA	Ovino	Bacterina o CW	WOE	IM
1985	USA	Ratón	Bacterina o CW	MDP, TDM, BCG y Cpar	IP
1986	USA	Cabra	Toxoide	FIA	SC
1987	USA	Ovino	Bacterina	-----	SC
1988	Brasil	Cabra	Bacterina	AP	-----
1989	Noruega	Cabra	Bacterina o toxoide	Levamisol	-----
1989	Noruega	Cabra	Bacterina + toxoide	-----	-----
1990	USA	ovino/ ratón	Bacterina	MDP	IM / IP
1991	USA	Ovino/ Cabra	Dried whike Cp cells	MO + AA	IM
1991	USA	Ovino	CST	BPA	-----
1991	Australia	Ovino	Toxoide o Bacterina + toxoide	AH	SC
1991	Australia	Ovino	Toxoide o toxoid Cp+5 clostridial toxoide	AH/ Sodium selenate	SC
1991	Australia	Ovino	Bacterina o Cp vivo atenuado	AH	SC
1991	Brasil	Cabra	Bacterina o Cp vivo atenuado	AP (bacterin)	ID
1991	Australia	Ovino	Cp Toxminus	-----	SC
1992	Australia	Ovino	Cp Toxminus o Cp Toxminus recombinante	-----	OR
1994	Australia	Ovino	40-kDa antígeno	AH	SC
1996	USA	Ovino / Cabra	Bacterina	MDO + MO	IM
1997	Australia	Ratón	Cp vivo aroQ mutante o Cp vivo pld mutante	-----	IP

“Producción de una bacterina para linfadenitis caseosa y la evaluación de su composición a través de electroforesis”

1998	Australia	Ovino	Cp vivo aroQ mutante o Cp vivo pld mutante	-----	SC
1998	Canadá	Ovino	Glanvac® 6, Case-Vac® or bacterina	MDP + MO (bacterin)	SC / IM
1998	USA	Ovino	Bacterina + toxoide	AH	SC
1999	Australia	Ovino	Glanvac 6 o recombinante Glanvac® 6	MA	SC
2000	Alemania	Cabra	Cw	-----	-----
2000	Australia	Ovino	Cp Toxoide + 5 Clostridial toxoide	AH / Moxidectina	SC
2002	Brasil	Cabra	Cp. Viva atenuada Liofilizado	No	ID
2003	Perú	Ratón	CST	AH	SC
2005	Egipto	Ratón	Bacterina, toxoide o bacterina + toxoide	MO	SC
2006	Reino Unido	Ovino	Bacterina, rPLD, bacterina + rPLD, or Glanvac® 3	AH	SC
2007	Perú	Alpacas	Cp Live	-----	SC
2007	Perú	Alpacas	CW o CST	MDP	SC
2007	Egipto	Ratón	Bacterina, rPLD, o bacterina + rPLD	MO	SC
2008	Brasil	Cabra	Crude CST, concentrado CST + oligodeoxinucleotida CpG, o viva atenuada Cp	FIA	SC
2009	Brasil	Ratón	Proteína recombinante Heat-shock 60 (rHsp60)	FCA / FIA	SC
2010	Egipto	Ovino	Bacterina, bacterina + rPLD, Gamma-irradiated Cp + rPLD or BCG + rPLD	MO (excepto BCG)	SC
2010	USA	Ratón	Bacterina + toxoide	-----	-----
2010	Turquía	Ovino	Bacterina + toxoide	FCA	SC
2011	Arabia Saudita	Ovino	Glanvac® 6	Aceite Olivo	SC

Abreviación : Immunógenos - Cp = *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Bacterina = Cp células completas muertas; CW = sonificado pared celular Cp.; CST = exotoxinas de sobrenadante del cultivo filtrado; Toxoide; = exotoxina fosfolipasa D inactivada (PLD); rPLD = recombinante PLD; Glanvac® and Case-Vac® = vacunas comerciales; Toxinus = Gen PLD Cp mutado; Adyuvantes - WOE = agua en aceite en emulsión; MO = aceite mineral; AA = Arlcel A o mono oleato de manitol; AH = hidróxido de aluminio; AP = Fosfato de aluminio; MDP = muramyl di péptido; TDM = trehalosa dimicolato; BCG = células muertas *Mycobacterium bovis* BCG; Cpar = células muertas *Corynebacterium parvum*; FCA = adyuvante completo Freund's; FIA = adyuvante incompleto Freund's ; BPA = adyuvante polímero bloque; MA= adyuvante multicomponente; Vía de administración- SC = subcutáneo; IM = intramuscular; IP = intraperitoneal; ID = intradérmico; OR = oral. (Bastos et al., 2012)

Un producto compuesto de bacterina inactivada de *C. pseudotuberculosis* y una bacterina inactivada más PLD inactivado por formaldehído, fue probado en ensayos de campo; obteniendo como resultado la presencia de anticuerpos contra PLD, así como a antígenos celulares de *C. pseudotuberculosis*. Se observó un aumento significativo progresivo en la respuesta inmune tipo humoral en la octava semana, pero los títulos de anticuerpos disminuyeron a las treinta y dos semanas. Después del desafío, el número de granulomas fue significativamente menor en los animales vacunados en comparación con los controles, lo cual apoya el uso de una vacuna que combina exotoxina con antígenos somáticos (Piontkowski y Shivvers, 1998).

Bacterina viva atenuada.

Para mejorar los resultados de los modelos de vacunas basadas en cepas vivas, los investigadores modificaron genéticamente una cepa mutante de *C. pseudotuberculosis* en el que el gen del PLD se eliminó por mutagénesis sitio específico, llamada “Toxminus”. Cuando se inocula en ovejas, este mutante era menos virulento, sin causar granulomas locales. Con una dosis, (10^8 CFU / dosis) se observaron pequeños granulomas en ganglios linfáticos y la bacteria mutante fue aislada en sólo uno de estos granulomas. Estos resultados confirmaron que PLD es esencial para la supervivencia de *C. pseudotuberculosis in vivo*. Las respuestas inmunes de tipo humoral y celular causadas por esta cepa mutante de *C. pseudotuberculosis* se encontró que eran menos severas que las inducidas por cepas de tipo salvaje. Por lo tanto, la cepa Toxminus que codifica un PLD modificado genéticamente no tiene efectos secundarios adversos y confiere inmunoprotección (Hodgson *et al.*, 1992).

En los ensayos de vacunación, todas las ovejas inmunizadas mostraron evidencia de bajos títulos de anticuerpos para PLD. Sin embargo, después del desafío, los títulos aumentaron significativamente, lo que indica que los animales habían sido sensibilizados por la vacuna. Sin embargo, la tasa de protección de los animales inmunizados era sólo el 44% (Hodgson *et al.*, 1999).

En otros estudios, el grupo Toxminus desarrolló un nuevo mutante, Toxminus con un gen adicional que codifica una forma inactiva del PLD. Esta forma inactiva se obtuvo mediante la sustitución de una histidina por una tirosina en el sitio activo de la enzima. Animales oralmente vacunados con este mutante fueron 100% protegidos contra una cepa de tipo salvaje. Estos resultados confirman la importancia de la PLD como un antígeno protector y demostrando tanto el potencial para el desarrollo de una vacuna contra el LAC (Hodgson *et al.*, 1994).

Bacterina con subunidades antigénicas.

Modelos de vacuna de subunidad antigénicas también se han desarrollado en un intento de mejorar la respuesta inmunológica específica y promover mayores tasas de protección. La proteína CP40, un antígeno de *C. pseudotuberculosis* fue identificado por una estrategia que emplea células secretoras de anticuerpos derivados localmente (ASC). Donde se llevó a cabo una inmunización en ovejas, en el cual se aplicó dos dosis 100 µg de la proteína CP40 con adyuvante de hidróxido de aluminio, dando como resultado protección contra la infección con *C. pseudotuberculosis*, con una reducción del 82% en el número de ovejas infectadas y una reducción de 98% en las lesiones pulmonares, lo que sugiere que el

antígeno de 40 kDA desempeña un papel importante en la inmunidad a LAC (Walker *et al.*, 1994).

Bacterina recombinante.

En un estudio se ha probado utilizar la proteína de choque térmico Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* como un candidato a vacuna contra la LAC. La inmunización se realizó en ratones con Hsp60 recombinante (rHsp60) que se expresó en *E. coli* purificado e indujo una respuesta de IgG anti-Hsp60 significativa, con una mayor producción de IgG1 en lugar de IgG2 α . Además de una respuesta inmune mediada que se caracterizó por una producción elevada de IFN- γ e IL-10. Sin embargo, la administración subcutánea de rHsp60 no indujo una protección eficaz contra la infección intraperitoneal con *C. pseudotuberculosis* (Pinho, *et al.*, 2009).

Resistencia de *C. pseudotuberculosis* a la inmunoprofilaxis.

La resistencia a la infección por *C. pseudotuberculosis* es un proceso complejo que implica componentes de la respuesta no específica y específica del hospedero, por lo tanto la respuesta inmunitaria humoral y celular son importantes (Zaki, 1976., Batey *et al.*, 1986; El-Enbaawy *et al.*, 2005). La importancia de los mecanismos humorales se ha demostrado mediante la evaluación de numerosos ensayos de vacunas comerciales y experimentales, que incluyen preparaciones a base de sobrenadante de cultivo celular inactivado o toxoides (Eggleton *et al.*, 1991; Stanford *et al.*, 1998.) fracciones bacterianas de la pared celular atenuada (Brogden *et al.*, 1984; Braga *et al.*, 2007.) y bacterias muertas (Simmons *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1998), exotoxinas y sus subunidades (Hodgson *et al.*, 1999) o patógenos modificados genéticamente (Chaplin *et al.*, 1999; De Rose *et al.*, 2002).

Los avances con respecto a la inmunoprofilaxis se han hecho, y el uso de estas preparaciones reduce el número y el tamaño de granulomas en los animales expuestos. Sin embargo, para controlar adecuadamente la infección, la activación de los macrófagos debe mejorarse; de hecho, muchos investigadores están ahora centrándose en el IFN gamma (IFN- γ) y de la respuesta (Bastos *et al.*, 2012).

El mismo grupo también investigó el papel de estas citoquinas durante la infección por *C. pseudotuberculosis* secundaria en ratones. Ellos encontraron que tanto TNF- α y IFN- γ son necesarios para la supervivencia y el desarrollo de inmunidad protectora. Durante la infección secundaria, los ratones se recuperaron 50% más rápido, lo que sugiere la importancia de estas citoquinas en la activación de los macrófagos (Bastos *et al.*, 2012).

Otro estudio sobre la respuesta inmune innata durante el curso temprano de la infección reveló la participación del sistema del complemento en la defensa contra *C. pseudotuberculosis*. Los experimentos demostraron que el receptor del complemento tipo 3 (CR3) desempeña un papel clave en el reclutamiento de células inflamatorias durante el curso de la infección. De hecho el tratamiento de ratones con un anti-CR3 mAb dio lugar a la proliferación sin restricciones de las bacterias en el bazo y el hígado. Un examen histológico reveló también que los fagocitos mononucleares no migran a los sitios de la multiplicación bacteriana, como lo demuestra la inhibición de la migración de células inflamatorias y un gran número de bacterias en sus órganos. Estos resultados revelaron la importancia de la respuesta inmune innata a través del CR3 en la resistencia a la infección por *C. pseudotuberculosis* en ratones (Lan *et al.*, 1999).

Se llevó a cabo en un estudio en ovejas inoculadas con cepas atenuadas y con cepas de tipo salvaje de *C. pseudotuberculosis*; donde evaluaron la expresión de mRNA de citoquinas durante la infección. Este estudio experimental reveló que en el sitio de la inoculación, se aumentaron los niveles de las citoquinas inflamatorias TNF- α y la interleucina-1 β (IL-1 β). Además la máxima expresión de TNF- α , IL-2 e IFN- γ se produjo al séptimo día post inoculación, y se detectaron los más altos niveles de IL-1 β e IL-6 mRNA 28 días después de la inoculación (Bastos *et al.*, 2012). Los niveles de mRNA de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) fueron elevados en animales con granulomas en los ganglios linfáticos. Estos resultados sugieren que el desarrollo de granulomas podría ser una consecuencia de la presencia de células Th1 y Th2, así como la elevada producción de citoquinas tales como IFN- γ , IL-2, IL-4, TNF- α y MCP-1. Estos datos sugieren que los granulomas constituyen un factor importante para limitar la infección por *C. pseudotuberculosis* (Pépin *et al.*, 1997).

Un estudio realizado en México por Hernández, (2015) caracterizó aislados autóctonos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, demostrando la variabilidad en las características fenotípicas y genotípicas de la bacteria por medio de sistema API-Coryne y la identificación de genes de virulencia y patogenicidad.

Comentado [HO1]:

La problemática que existe con la linfadenitis caseosa ovina en diferentes países que se declaran libres de esta enfermedad, como es el caso particular en México, no se ha llegado a incursionar sobre la investigación de las características de la *C. pseudotuberculosis* con referente a cepas de otros países, No existen reportes oficiales del uso de vacunas extranjeras dentro del territorio nacional para el control de la enfermedad o el desarrollo de inmunógeno para LAC.

Por lo tanto este trabajo se pretende desarrollar un inmunógeno con cepas mexicanas, dada la variabilidad de la protección conferida por bacterinas elaboradas con cepas no autóctonas demostrados en otros estudios en diferentes países. Este trabajo se enfocara a la identificación de bandas de proteínas

presentes en bacterinas producidas con cepas nacionales constituyéndose en uno de los primeros trabajos sobre la elaboración y evaluación de bacterinas en el territorio nacional. Así siendo punto de referencia en el cual, surjan nuevas líneas de investigación para el desarrollo de nuevo conocimiento entorno a la bacteria, en el desarrollo de nuevas vacunas para el control de la enfermedad dentro del territorio nacional.

III. JUSTIFICACIÓN

La LAC se considera una enfermedad de importancia en países desarrollados en la producción de ovinos y caprinos por el gran impacto, por las pérdidas en la producción de carne, leche, lana y en la falla reproductiva. Pero en países en vías de desarrollo son escasos los trabajos sobre la prevalencia de esta enfermedad. Las características genéticas del agente y mucho menos el desarrollo y la evaluación de un inmunógeno. Con relación a la frecuencia de presentación de la enfermedad, solo el 60% de los países que lo reportan, solo el 18.7% la consideran una enzootia y el 10% la notifican como casos excepcionales. La LAC una vez que se instaura en una producción es difícil de controlar; por la facilidad de contagio, la pobre respuesta a agentes terapéuticos y el costo del tratamiento, la habilidad del agente etiológico de persistir en el ambiente, la dificultad en detectar subclínicamente a los animales afectados, no aplicar vacunas y la falta de conciencia en los productores. En sentido general, podemos decir que a esta afección no se le presta la atención que debiera, debido a que solo el 31.2% de los países se declaran afectados y toman algún tipo de medida, de ellos solo el 8.3% realiza algún tipo de prueba para su diagnóstico; elemento que refleja el bajo nivel diagnóstico que existe internacionalmente para esta enfermedad. En los países afectados solo el 25 % realizan algún tipo de tratamiento para el control de la enfermedad y solo el 10.4 % se aplican algún tipo de programa de vacunación. (Ruiz *et al.*, 2007).

Existen vacunas y bacterinas comerciales, multicomponentes con fracciones de exoproteínas en países desarrollados, pero que no han logrado dar un resultado confiable en ovinos y cabras. En casos excepcionales, algunas vacunas si han podido lograr resultados inmunitarios deseables en el modelo ovino, pero no así en el modelo caprino, debido a que puede estar asociado con el tipo de respuesta inmune provocada. Otras vacunas experimentales con el gen *PLD* modificado de *C. pseudotuberculosis* han obtenido un considerable efecto protector evaluado con la reducción de la prevalencia y el número de lesiones en ovejas y cabras.

Ha habido grandes avances en la comprensión de la respuesta inmune contra *C. pseudotuberculosis*, pero aún se necesitan más estudios para desarrollar un inmunógeno para ovejas y cabras que promueva la protección del 100% dentro del rebaño.

En México los estudios de prevalencia de la enfermedad están localizados pero no existen estudios nacionales. No existen estudios que hayan desarrollado y evaluado un inmunógeno dentro del territorio Mexicano utilizando modelo ovino o caprino, utilizando cepas nativas para el control de la enfermedad.

En las producciones ovinas y caprinas en territorio nacional aún no se ha empleado un programa de vacunación sistemático para el control de dicha

enfermedad, aunque existan vacunas internacionales aprobadas, Sin embargo existen limitantes para la utilización de las mismas, como son los costos de importación, el precio de las vacunas comerciales que oscila entre \$1113.92 a \$3920.02 MXM, dependiendo la presentación y el laboratorio, el precio por vacunación anual de un solo animal oscila \$20.13 a \$31.26 MXM (Zoetis, 2016).

Otro factor que puede interferir en la protección conferida por inmunógenos elaborados con cepas no autóctonas podría ser que las fracciones proteicas antigénicas no sean las mismas entre las cepas de origen mexicano y cepas de otros países. Un estudio (Syed *et al.*, 2014), demostró en *C. pseudotuberculosis* variabilidad de número proteínas estructurales en las cepas Cp. 258 y Cp. 316 y Cp. 1002. Demostrando la presencia proteína únicas en la cepa *C. pseudotuberculosis* 1002 MtrA (Regulador de respuesta de unión DNA) y la proteína IspH (4-hidroxi-3-metilbut-2-enil reductasa difosfato) que estas relacionadas con la virulencia de la bacteria y sobrevivencia dentro del hospedero.

IV. HIPÓTESIS

Las bacterinas elaboradas a partir de cepas *Corynebacterium pseudotuberculosis* de origen mexicano contra la linfadenitis caseosa presentarán perfiles proteicos similares y diferenciados con cepas no autóctonas.

V. OBJETIVOS

General.

- La producción y caracterización electroforética de bacterinas contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* producidas a partir de aislamientos de campo previamente caracterizados fenotípica y genéticamente

Específicos.

- A partir de 60 aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidos de muestras clínicas (Gonzalez, 2014). Se seleccionaran aquellos con características bioquímicas diferenciales, portadores del mayor número de genes de patogenicidad PLD, HSP60, FAC A, FAC B, FAC C, FAC D (Hernández, 2015) y que correspondan a cuadros clínicos graves como candidatos para la elaboración de bacterinas experimentales.
- Elaborar bacterinas a partir de los aislamientos seleccionados con base en las características fenotípicas y genotípicas y del cuadro clínico que generaron en el rebaño caprino y ovino
- Determinar los perfiles de las proteínas inmunogénicas de las bacterinas ya producidas.

VI. MATERIAL Y MÉTODO.

Aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis.

A partir de 209 muestras recolectadas en municipios pertenecientes al estado de Jalisco se identificaron 69 aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por bioquímicas tradicionales recolectados a partir de hisopados de animales identificados con lesiones clínicas de linfadenitis caseosa ovina y caprina. De los cuales solo se procesaron 60 aislamientos los cuales se conservaron en medio de congelación a -80°C (Hernández, 2015) (Anexo A).

Posteriormente se procedió a realizar el sembrado en medio de cultivo de gelosa sangre, incubándolas a 37°C por 24-48 horas, en condiciones microaerofílicas velobiosis. Se observó el crecimiento de colonias color crema y rodeadas de una zona de β hemólisis. A los aislamientos se les realizó la tinción de Gram dando como resultado bacilos Gram positivos cortos y curvos.

Se identificaron por pruebas bioquímicas clásicas como catalasa y ureasa positiva, fermentación de glucosa, galactosa, maltosa y manosa. El biotipo *ovis* no reducen los nitratos a diferencia de los aislados de equinos. Se aplicaron además pruebas bioquímicas de identificación miniaturizado Api Coryne (Lab. Biomeriux, REF, 20-900. Francia). El procedimiento, realización e interpretación de la prueba se llevó a cabo de acuerdo al Manual Api Coryne suministrado por el laboratorio fabricante (Anexo B).

Caracterización molecular.

Extracción de ADN.

Se llevó a cabo la extracción de ADN de los 60 aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante un kit comercial KAPA BIOSYSTEMS siguiendo las especificaciones del proveedor.

El protocolo fue el siguiente:

La extracción de ADN se realizó en volumen de 100 μ L establecidos de la siguiente manera: PCR-Grade wáter: 88 μ L, 10x kapa Express Extract Buffer: 10 μ L, 1 U/ μ L Kapa Express Enzyme: 2 μ L. Se mezclaron los componentes según el cuadro y se procedió a la lisis de la muestra a 75 °C por 10 min, para luego inactivar la enzima a 95 °C por 5 min; posteriormente un proceso de centrifugación de 1 min a 12 rpm para sedimentar los restos celulares, se extrajo el sobrenadante a un tubo nuevo y se desecha el pellet (Figura 1). Los extractos fueron estables a 4 °C durante al menos 1 mes y a -20 °C durante al menos 6 meses.



Figura 4.Extracción de ADN (Promega, 2016)

Caracterización molecular

Se llevó a cabo la identificación genotípica de los 60 aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*(Anexo) mediante el uso del ADN extraído con el kit comercial KAPA BIOSYSTEMS con la técnica de PCR multiplex mediante el protocolo establecido por (Pacheco *et al.*, 2007), la cual se basa en la utilización de tres pares de primers que amplifican tres genes específicos de *C. pseudotuberculosis* y los cuales son capaces de diferenciar entre otros géneros de *Corynebacterium*, garantizándonos la correcta identificación.

- Identificación de tres genes: 16S rRNA, *rpoB*, *pld*.
- Mediante tres pares de cebadores específicos:

Cuadro 3.- Primers usados para la detección de genes de virulencia y genes filogenéticos.

Gen	Primers	Secuencia (5´ a 3´)	Pares de bases	de Referencia
16S RNA	16S-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	816	(Centrikaya et al., 2012)
	16S-R	TCTCTACGCCGATCTTGTAT		
<i>Rpob</i>	C2700F	CGTATGAACATCGGCCAGGT	446	(Khamis et al., 2004)
	C3130R	TCCATTTGCGCGAAGCGCTG		
<i>Pld</i>	PLD-F	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	203	(Pacheco et al., 2007)
	PLD-R2	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG		

El PCR Multiplex se realizó en un volumen final de 50 µl conteniendo 25 µl 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 12 µl 10x primer mix (2 µl de cada primer (dilución de 100 pmol/µl), 5 µ de DNA (10 ng/µl).

El protocolo de la reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne TC 512) es las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 58 °C por 40 s y 68 °C por 1 min 30s; y una final extensión de 68 °C por 7 min.

La amplificación de los productos se resolvieron por la técnica de Electroforesis en un gel de Agarosa al 1.5 % y visualizados con tinción de Bromuro de etidio en un trasiluminador (DNR Mini Bis Pro).

Identificación de genes de Virulencia y Patogenicidad.

Se llevó a cabo por un PCR de punto final del gen “Fag A” y del Fag “B” y un PCR Multiplex para la identificación de los genes “Fag C y Fag D” genes involucrados en la patogenicidad y virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de los aislados que surgieron positivos en el PCR multiplex montados en este estudio basados en el protocolo previamente establecido por Sá *et al.*, (2013). Los genes involucrados en factores de patogenicidad y virulencia que serán analizados son los siguientes: Gen *pld* el cual ya estaría identificado en la primer reacción de PCR multiplex, y genes *Fag A*, *Fag B*, *Fag C* y *Fag D*.

- Identificación de 4 genes: *Fag A*, *Fag B*, *Fag C*, *Fag D*.
- Mediante 4 pares de cebadores específicos:

Cuadro 4.- Primers usados para la detección de genes de virulencia *Fag A-D*.

<i>Fag_A</i> F	5'AGCAAGACCAAGAGACATGC3'		Sá et al., 2013
<i>Fag_A</i> R	5'AGTCTCAGCCCAACGTACAG3'	245	Sá et al., 2013
<i>Fag_B</i> F	5'GTGAGAAGAACCCCGGTATAAG3'		Sá et al., 2013
<i>Fag_B</i> R	5'TACCGCACTTATTCTGACACTG3'	291	Sá et al., 2013
<i>Fag_C</i> F	5'GTTTGGCTATCTCCTTGGTATG3'		Sá et al., 2013
<i>Fag_C</i> R	5'CGACCTTAGTGTTGACATACCC3'	173	Sá et al., 2013
<i>Fag_D</i> F	5'GAGACTATCGACCAGGCAGA3'		Sá et al., 2013
<i>Fag_D</i> R	5'ACTTCTTGGGGAGCAGTTCT3'	226	Sá et al., 2013

(Sá et al., 2013)

Los ensayos de PCR *Fag A* y *Fag B* se llevaron a cabo a través de un PCR punto Final; en un volumen final de reacción de 25 µl, que contenían 20 ng de ADN

genómico, 12.5 µl 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 2 µl 10x primer mix (1 µl de cada primer (dilución de 100 pmol/µl).

La amplificación se realizará en un termociclador (Teche TC-512) con el protocolo que a continuación se describe: un ciclo de 94 ° C durante 30 s.; seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 40 s, “alineación del gen *Fag A* a 58°C durante 40 s y una alineación del gen *Fag B* a 55°C por 40s; y un paso de extensión final a 72 ° C durante 10 min.

La amplificación de los productos se resolvió por la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % y visualizados con tinción de Bromuro de etidio en un trasiluminador (DNR Mini Bis Pro).

Para los genes *Fag C* y *Fag D* se llevó a cabo un PCR Multiplex en un volumen final de reacción de 25 µl, que contenían 2.5 µl con 20 ng de ADN genómico, 12.5 µl 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 2 µl 10x primer mix (1 µl de cada primer (dilución de 100 pmol/µl).

La amplificación se realizó en un termociclador (Teche TC-512) donde se ajustó la temperatura de alineación con el protocolo siguiente: desnaturalización inicial de 94°C por 30 s, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40s, alineación de 60.5°C por 40s y una extensión de 72 ° C por 40s, terminando con un paso final de 72 ° C por 10 min.

Producción de Bacterina

Las cepas que poseían las mejores características de genes de virulencia y relacionados con los casos clínicos más graves se seleccionaron para la producción de una o varias bacterinas inactivada. Para lo cual se cultivaron en medio agar sangre por 24 - 48 horas en una incubadora con atmosfera 37°C en condiciones de velobiosis. Posteriormente se colocó una sola colonia en 250 ml de caldo BHI 0.1% Tween 80 y se incubó 24 – 72 hrs. Los cultivos se dejaron sedimentar a 4°C durante 12 horas y posteriormente se utilizó una centrifuga Eppendorf durante 20 minutos a 4024.8 g. (Müjgan *et al.*, 2010).

A los sedimentos se les realizaron 3 lavados con PBS con pH (7.4) y se centrifugó a 2263.9 g durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente los sedimentos se re suspendieron en PBS y se realizaron diluciones en base 10.

A partir de estas diluciones se inocularon en placas Petri por duplicado en agar BHI y se incubaron a 37°C por 48 horas, para estimar la cantidad de unidades formadoras de colonia en placa (UFC/ ml) conforme a la norma oficiales mexicanas (NOM-110-SSA1-1994 Y NOM-092-SSA1-1994; Müjgan *et al.*, 2010).

Para estimar la cantidad formadora de colonia en placa se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml en placa} = \text{N}^\circ \text{ de colonias significativas en las últimas placas consideradas} * \text{FDD} / \text{Volumen inicial sembrado.}$$

Dónde:

(UFC/ml en placa) Unidades formadoras colonias / en un mililitro de muestra en placa;

N° de colonias significativas en las últimas placas. Rango sensibilidad del método, que es número de colonias presente entre ≥ 25 y ≤ 250 colonias por placa

Factor Decimal de dilución (FDD). Se obtiene FD/1;

Factor de titulación (FD). Se obtiene del título de la dilución inicial * títulos diluciones sucesivas.

Volumen inicial sembrado. Volumen inóculo de muestra sembrado (1ml).

Se consideran representativas las cajas que tienen un número de colonias dentro del rango de sensibilidad del método, en este caso, entre 25 y 250 UFC. Una vez seleccionadas las cajas y hechos los promedios correspondientes, se aplica el factor de dilución, que es el inversamente proporcional número de la titulación, y se redondea el número a 2 cifras significativas (o dígitos) y se posteriormente se multiplica por la potencia 10. Por ejemplo si el promedio es de 237.5 en la dilución 10^{-3} se debe reportar como 24×10^{-4} . Siempre y cuando las 2 placas de una dilución contienen un número de colonias dentro del rango de sensibilidad del método (NOM-110-SSA1-1994 Y NOM-092-SSA1-1994).

Los sobrenadantes se retiraron y se filtraron con filtro de 0.22 micras. Posteriormente se añadió Timerosal (Merthiolate, Sigma-Aldrich) a los sobrenadantes en una relación 1 g /10 medio cultivado y se incubó a 4°C por 12 horas. Se añadirá el formaldehído a las exoproteínas a una concentración final de 0.6% y se incubará durante 7 días (Mújgan *et al.*, 2010).

Las bacterinas fueron revisadas a través de prueba de esterilidad a través de una siembra en una placa agar BHI y en una placa agar sangre ovina con el fin determinar la inhibición de la bacteria y no exista crecimiento. Finalmente se agregó Adyuvante Incompleto Freund (FIA, Sigma-Aldrich) para maximizar la respuesta inmune contra la bacterina (Mújgan *et al.*, 2010).

Método de estudio electroforético en gel poliacrilamida SDA-PAGE.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE, por sus siglas en inglés "polyacrylamide gel electrophoresis", probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia (Lomonte, 2007).

Una vez elaboración de las bacterinas de *C. pseudotuberculosis* se llevó a cabo el estudio electroforético se procedió a la realización de extracción de proteínas, se determinó la concentración de proteínas totales, utilizando una curva de calibración de proteínas, se prepararon soluciones para el corrimiento y la formulación de los geles, así como preparación de soluciones teñimiento y desteñimiento del gel poliacrilamida todos estos procedimientos descritos en los Anexo C, D, E, F. (Manual Biorad, 2016).

Extracción de proteínas de las bacterinas.

Para la extracción de proteínas somáticas y del sobrenadante de las muestras seleccionadas para la realización de las bacterinas. Con el siguiente protocolo:

Se tomaron 10 ml de la bacterina elaborada descrita en el protocolo antes mencionado, en un tubo 15 ml (Corning). Se centrifugo a 3000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante conservando 2 ml conservando tanto sobrenadante y masa celular utilizando protocolo modifica (Pérez et al., 1992).

Para la extracción de proteínas del pellet se coloca en nuevo tubo 1.5 ml Eppendorf estéril se traspasó 500 μ l de masa celular y para la extracción de proteínas del sobrenadante se traspasó 500 μ l de sobrenadante en un tubo 1.5 ml Eppendorf estéril. Se añadió 120 μ l de inhibidor de proteasas (100 μ l / 5.0 X 10⁵ UFC). Posteriormente se procedió a extracción proteínas por método mecánico utilizando el protocolo de Pérez et al., (1992) con modificaciones, que a continuación se describe brevemente.

Se colocaron microperlas estériles dentro de las muestras, y se agrega lisoenzima 120 μ l se agita la muestra durante 1 minuto a 4500 rpm y se coloca en hielo a -4°C durante 1 minuto este proceso se repite 5 ciclos con el fin de extracción de proteínas del pellet y del sobrenadante. (Pérez et al., 1992).

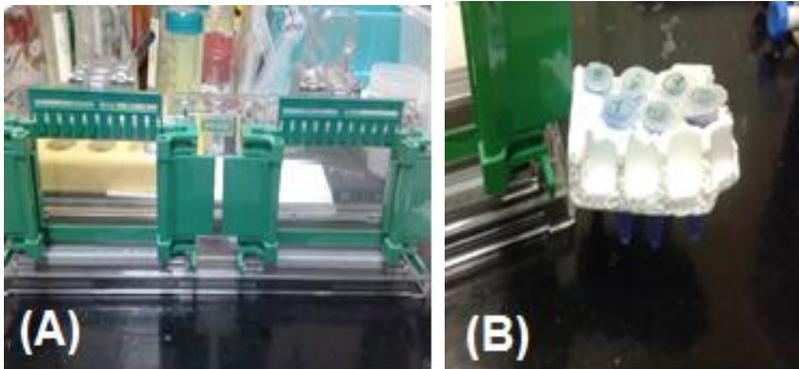
Electroforesis Gel Poliacrilamida en condiciones desnaturizante sistema discontinuo (SDS-PAGE).

Las muestras se diluyen en proporción “1:2” con el buffer de muestra. Se hierve a 95°C por 5 minutos. Previamente al corrimiento (SDS-PAGE). Las fracciones proteicas se separaron por gel de poliacrilamida unidimensional electroforesis en condiciones desnaturizantes (Laemmli., 1970). Se utilizó un sistema discontinuo (SDS-PAGE) con un gel de concentración al 4% y un gel de separación de 12%. La electroforesis se llevó a cabo en 0.25 M Tris, 1.92 M Glicina, 1% SDS, pH 8,3 tampón de migración 0,5%, durante 3 horas. La primera hora corrimiento a 80V y las dos horas restantes del corrimiento fue de 130 a 150V. Cada pocillo fue cargado con 50 mg de proteína. Las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie Blue R-250 (Adrien *et al.*, 2004).

Estimación del peso molecular de proteínas.

En la (figura 5). Mediante el uso de una regla o vernier, midió la distancia de migración comenzando la parte superior del gel de resolución para cada banda proteína desconocida. Conociendo el tamaño del gel de poliacrilamida es de 67mm se hace el cálculo del valor $R_f = \frac{\text{distancia de migración}}{\text{tamaño del gel}}$ usando la siguiente ecuación. Usando programa gráficos, debe determinar el tamaño distancia de migración del log del marcador peso molecular (MW) con relación con la función de R_f . Generando la ecuación $Y = mx + b$, se resuelve la determinación entre el marcador peso molecular (MW) y de la proteína desconocida (Manual Biorad, 2016).

$R_f = \frac{\text{la distancia de migración de proteínas desconocidas}}{\text{distancia de migración de gel de resolución}}$.



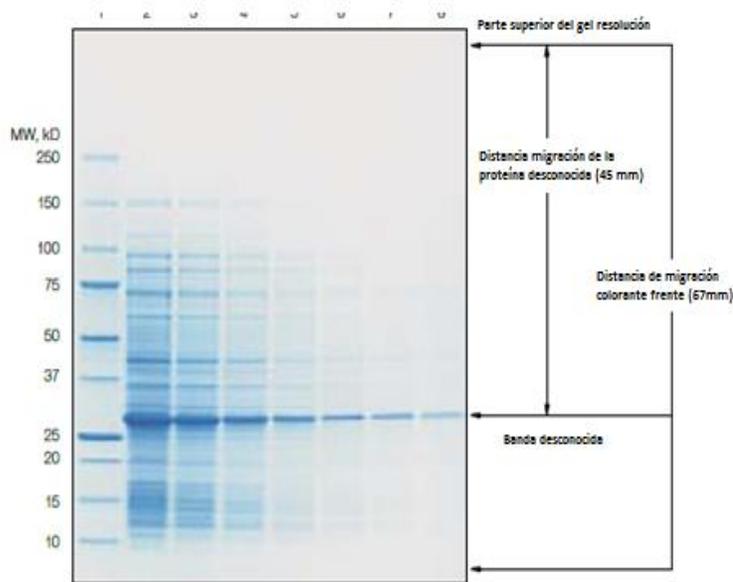
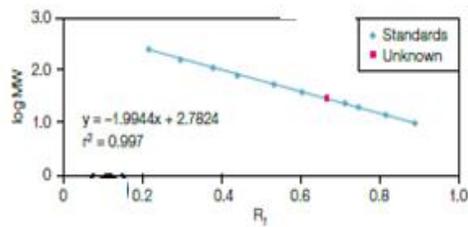


Figure 5. Ejemplo determinación peso molecular[MW] de una Proteína desconocida. Carril 1, 10 μ l Marcador peso molecular(MW) Precision Plus Protein. Carril 2-8 una dilución en serie de lisis de *E. Coli* contiene una proteína desconocida hipotética (GFP). Proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en un gel separación Tris-HCl 4-20% y tenido con Azul Coomassie Bio Safe. Gel que se muestra es el tamaño real.



Determinación de peso molecular[MW] de una proteína desconocida por SDS-PAGE. Usando curva estándar del log peso molecular[MW] R_f fue generado usando el marcador peso molecular Precision plus Protein Standers de la Figure 5. La estrecha relación lineal ($r^2 > 0.99$) entre el peso molecular proteínas y la distancia migración demuestra confiabilidad en la predicción peso molecular (MW).

(Manual Biorad,2016)

Figura 5. |Electroforesis en gel poliacrilamida en condiciones desnaturizante sistema discontinuo. (A) Montaje y preparación en gel poliacrilamida. (B) Sobrenadante de bacterinas de aislados *Corynebacterium pseudotuberculosis*, (C) Ejemplo estimación del peso molecular proteínas hipotética desconocida de *E. Coli*.

VII. LÍMITE DE ESPACIO

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Área de Bacteriología, Área de Biología Molecular, Área de Lavado, Área UV, Área de Microbiología Aviar del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), ubicada Kilometro 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco Código Postal 50200°, el clima es templado subhúmedo con lluvias en verano, las temperaturas medias en los meses que duro el experimental (Marzo del 2015 a Marzo del 2016), con una precipitación pluvial de 9.0, 20.1 y 130.1mm respectivamente. (INEGI, 2005; SMN, 2012).

Los análisis de laboratorio fueron realizados en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), en las áreas designadas.

VIII. LÍMITE DE TIEMPO

La presente investigación comprendió cinco fases, la fase recolección de muestras y adiestramiento en las técnicas de laboratorios, para el aislamiento y purificación de las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de las muestras dentro de las instalaciones del CIESA, donde se realizó entre los meses de Marzo a Mayo del año 2015; posteriormente se efectuó la segunda fase Identificación y selección de los genes que codifican para los factores de patogenicidad del agente que tuvo una duración aproximada de tres meses, la tercera fase es la preparación de una bacterina inactivada y la cuarta fase de la investigación es la evaluación de la composición de la bacterina a través de electroforesis en geles poliacrilamida (SDS-PAGE).

PLAN DE TRABAJO

Actividad	Unidad de medida	Total a realizar	Meses													
			M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F		
Protocolo de tesis	Documento	1	X	X	X											
Purificación de los genes	Genes	3				X	X	X	X	X	X	X	X			
Desarrollo de bacterinas	Bacterinas	1							X	X	X	X				
Análisis composición de la bacterina electroforéticamente.	Experimental									X	X	X				
Análisis de resultados	Documento	1											X	X		
Redacción de resultados, discusiones y conclusiones.	Documento	1												X	X	
Integración de tesis	Documento	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

IX. RESULTADOS

En base de a los resultados de 60 aislamientos de *C.pseudotuberculosis* identificados a través de pruebas bioquímicas clásicas, sistema API-Coryne y estudios moleculares de los genes *16s-rDNA*, *rpoB*, *Pld*, *Fag A*, *Fag B*, *Fag C*, *Fag D*, se seleccionaron diferentes aislados para la elaboración de 6 bacterinas para la determinación de los perfiles proteicos presentes de las mismas.

Identificación bacteriológico y pruebas bioquímicas de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*.

Un total de 60 aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* identificados mediante Bacteriología (figura 6). En el Anexo A se presenta origen de los aislamientos.



Figura 6. Morfología. Colonia de asilamiento *Corynebacterium pseudotuberculosis*, presencia β hemólisis. Fuente Original (Ortiz, 2016).

Los resultados de la prueba Api Coryne en el (Anexo G) se muestran los 69 aislamientos donde se observan diferentes perfiles. Destacándose por ejemplo el 23.2% (16/69) presentaron perfiles comunes al Api y 24.6% (17/69) presentaron perfiles variables y el 52.2% (37/69) presentaron perfiles únicos. Además, se presenta el % de positividad a cada una de las pruebas en la parte inferior por ejemplo el 100% de los aislados presentaron reacción Catalasa positiva y Urea positiva, el 100% de los aislados fue negativo a Pyr A (ácido piroglutámico β naftilamina reacción enzimática con Pírolidonil Arilamidasa) a β NAG (1-naftil-N-acetil β D-glucosaminida reacción con β -galactosidasa) a O (testigo negativo de fermentación), aproximadamente el 50 % de las cepas fue positivo a PAL (2 naftil-fosfato reacción enzimática fosfatasa alcalina) y a MAL (fermentación de la D-Maltosa). El (cuadro 5) se muestran los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* candidatos para la elaboración de la bacterina presentaban variabilidad y similitudes en pruebas sistema Apy-Coryne con cepa control ATCC 43429.

Cuadro 5.- Resultado API-Coryne *C. pseudotuberculosis* candidatos para la elaboración de bacterina.

Aislamiento	NIT	PYZ	PyrA	PAL	β GUR	β GAL	α GLU	β GAL	βNAG	ESC	URE	GEL	0	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG	CAT
ATCC 4392	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
4																					
3540	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
2-4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
H14x	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
4-4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
1-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+

Abreviación : NIT reducción de nitratos; PYZ pirazimidasa; PyrA pirolidonil arilamidasa; PAL 2 fosfatasa alcalina ; β GUR βglucuronidasa; β GAL β-galactosidasa; α GLU α- glucodasa;; βNAG N-acetil-β-glucosaminidasa; ESC β –glucosidasa (esculina); URE ureasa; GEL hidrolisis (gelatina); 0 Fermentación ; GLU Fermentación (glucosa) RIB Fermentación (ribosa); XYL Fermentación (xilosa); MAN Fermentación (manosa); LAC;SAC Fermentación (sacarosa) ;GLYG Fermentación (glicógeno); CAT catalasa; Amarillo y Morado perfil Similitud en Sistema API-Coryne.; Rojo, Verde, Rosa Variabilidad en Sistema API-Coryne.

En el cuadro 6 se puede observar en el sistema API-Coryne variaciones en la reducción de nitrato en comparación con la prueba tradicional en tubo, obteniendo 16.6% (10/60) resultado positivo en reducción de nitrato a nitrito (Anexo H). En el mismo cuadro se muestra variabilidad el aislado 4-4. Esto indica que se está perdiendo la especificidad nitrato (-) para *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis* y en contra con la especificidad nitrato positivo el *biovar equi*, lo cual demuestra que existe variabilidad características fenotípicas de la bacteria (Hernandez, 2015).

Cuadro 6.- Variaciones en Nitrato.

Identificación	Especie	Química tradicional (Nitrato)	API-Coryne (Nitrato)
4-4	Ovino	+	-
6-4	Ovino	+	-
728930	Ovino	+	-
1322	Ovino	+	-
028	Ovino	+	+
632835	Ovino	+	-
6-18	Ovino	+	-
694977	Ovino	+	-
616126	Ovino	+	-
694992	Ovino	+	+

Identificación molecular de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*

Del total de los 69 aislamientos obtenidos por bacteriología y diagnosticados por pruebas bioquímicas y sistema comercial API Coryne, solo se logró caracterizar por PCR Multiplex (Pacheco *et al.*, 2007) un total de 60 muestras (86.95 %), la amplificación de tres genes: *16s* (816pb), *rpoB* (416pb) y *pld* (203pb) determinaría la identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* al ser oligos específicos de este género y especie. El perfil fue mostrado por la mayoría de los aislados, sin embargo algunos aislados mostraron variación con perfiles diferentes en la amplificación del gen *16S* (Anexo I).

Identificación de genes de virulencia

De los 60 aislamientos caracterizados por PCR Multiplex (Pacheco *et al.*, 2012) solo en 59 (98.33%) de ellos se logró la identificación de los genes de virulencia *Fag C*, *Fag D* y *Fag A* mediante un PCR Multiplex montado en este estudio (Anexo I); sin embargo el gen *Fag B* solo se logró identificar en 58 (96.66%) de los aislamientos, en el carril 11 se muestra el aislado 3540 que no amplificó dicho gen (anexo J). En la cuadro 7 se muestran los aislamientos que no amplificaron los genes mencionados con anterioridad y aislamientos que presentaron alguna variabilidad en las pruebas bioquímicas clásicas y sistema API-Coryne.

Cuadro 7.- Genes de Virulencia de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* candidatos elaboración de bacterina.

Aislamiento	Gen 16s rADN (816 pb)	Gen rpoB (446 pb)	Gel PLD (206 pb)	Fag A (243 pb)	Fag B (291 pb)	Fag C (173 pb)	Fag D (226 pb)
3540	+	+	+	+	-	+	+
1-2	+	+	+	+	+	+	+
ATCC	+	+	+	+	+	+	+
H14X	+	+	+	+	+	+	+
4-4	-	+	+	+	+	+	+
2-4	-	+	+	+	+	+	+

Características clínicas de las lesiones donde se realizaron los aislamientos

A partir 209 muestras recolectadas en municipios pertenecientes al estado de Jalisco se identificaron 69 aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis por bioquímicas tradicionales recolectados a partir de hisopados de animales identificados con lesiones clínicas de linfadenitis caseosa ovina y caprina obteniendo una prevalencia 33%,(69/209) y una prevalencia 16.2% (34/209) se aislaron otros agentes involucrados, los exudados de los animales muestreados. De los cuales de las 69 aislamientos actualmente se cuenta 60 muestras conservadas en medio congelación a -80°C (Hernández, 2015).

En el (Anexo A) se presenta los resultados de acuerdo al tamaño del absceso, relacionados con los agentes involucrados para la formación de piogranulomas de los aislamientos obtenidos en ovinos y caprinos. En los aislados obtenidos de *C. pseudotuberculosis* el tamaño de los piogranulomas oscila una predominancia menor 5 cm 71.6 % (43/60) y con menor frecuencia tamaño de los piogranulomas 5.1 - 10 cm 16.6% (10/60). En la cuadro 8 se muestran las características de las lesiones, el tamaño del absceso, consistencia y color del tipo del exudado y el animal que fue recolectada la muestra de los aislados candidatos para la elaboración de la bacterina, que presentaron alguna similitud o variabilidad en pruebas sistema API-Coryne o pruebas moleculares.

Cuadro 8.- Presentación clínica de los Aislamientos *Corynebacterium pseudotuberculosis* candidatos a la elaboración de la bacterina.

Identificación	Especie	Localización	Tamaño del absceso	Consistencia	Color	Tipo de exudado
ATCC 43924	-	-	-	-	-	-
3540	Ovino	Cuello	< 5 cm	Suave	Verde	Seroso
H14x	Ovino	Cabeza	5.1 - 10 cm	Suave	Verde	Purento
1-2-2-L-J	Caprino	Cabeza	< 5 cm	Suave	Amarillo	Seropurulento
2-4	Caprino	Inguinal	< 5 cm	Suave	Verde	Seropurulento
4-4	Ovino	Cabeza	< 5 cm	Dura	Verde	Sanguinolento



Figura 7. Ovinos. Abscesos en nódulos linfáticos mandibulares (A) y nódulo paratoideo (B). Fuente Original (Ortiz, 2016).

En los cuadros 7 y 9 se puede observar, la cepa control ATCC 43924 y la cepa 1-2-2-L-J con el mismo perfil fenotípico y genotípico, esta cepa autóctona se obtuvo de un exudado de origen caprino. Los aislados identificados 3540 y 2-4 presentaron variabilidad en la amplificación genética. El aislado 3540 no amplificó el gen virulencia Fag B y el 2-4 no amplificó el gen 16s rADN.

El aislado H14X presentó similitud en las características fenotípicas respecto con la cepa control ATCC 43924 con ciertas variaciones en el sistema API-Coryne con resultados positivo a la prueba PAL (fosfatasa alcalina), y negativo fermentación de sacarosa y genotípicamente amplificó todos los genes de virulencia y patogenicidad. Solo este aislado presentó la forma más severa en la presentación de lesiones, donde el tamaño de piogranuloma oscilaban entre 5.1 - 10 cm.

En contraste el aislamiento 4-4 presentó un perfil único fenotípica y genotípicamente distinto en las pruebas mencionadas con la cepa ATCC 43924.

La cepa presentó un resultado positivo en la reducción de nitratos en bioquímica clásica contrastando resultados de Sistema API-Coryne, y genotípicamente no amplificó el gen 16s rADN, pero amplificó todos genes de virulencia identificados en este estudio, y su presentación clínica fue similar a otros aislamientos. En la cuadro 9, se muestra las variaciones y similitudes en las fenotípicas y genotípicas de los aislados candidatos para elaboración de la bacterina para LAC con respecto a la cepa control ATCC 43429.

Cuadro 9. Aislamientos *Corynebacterium pseudotuberculosis* resultado Bioquímicas tradicionales, Sistema Apy-Coryne, PCR y prestación clínicas aislamientos para formulación de las bacterinas

Identificación	Presentación clínica	Bioquímicas tradicionales	Apy coryne	PCR	Variabilidad Fenotípica / Genotípica
Referencia (ATCC 43924).	Sin dato	Normal	Normal	Normal	Sin variabilidad
H14x	5.1 a 10 cm	Normal	Variable	Normal	Fenotípica
1-2-2-l-j	<5 cm	Normal	Normal	Normal	Sin variabilidad
3540	<5 cm	Normal	Normal	Variable	Genotípica
4-4	<5 cm	Variable	Variable	Variable	Fenotípica/Genotípica
2-4	<5 cm	Normal	Normal	Variable	Genotípica

Conteo de UFC (Unidades formadoras de colonias).

Antes de inactivación de la bacteria, se estimó la cantidad de unidades formadoras de colonia en placa (UFC/ ml) todo este procedimiento está regido dentro normas oficiales mexicanas. (NOM-092-SSA1-1994.; NOM-110-SSA1-1994.; Mújgan I., et al 2010). En la figura 8 se puede observar colonias puntiformes de color blanca menor a 1 mm de diámetro distribuidos sobre toda película de la placa de agar infusión cerebro corazón (BHI), y se puede observar los medios control para la seguridad de la calidad del procedimiento está dentro de norma oficiales mexicanas.

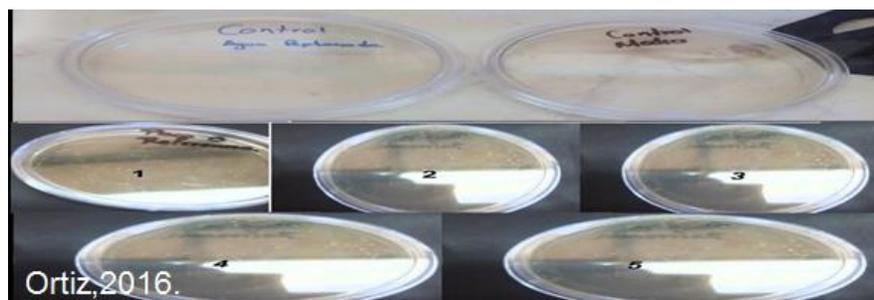


Figura 8. Conteo en placa *C. pseudotuberculosis* determinación microorganismos presentes de la bacterina ATCC 43429. Fuente Original (Ortiz, 2016).

En el cuadro 10 se observa la cantidad de microorganismos viables de *C. pseudotuberculosis* presentes de cada bacterina, antes de ser inactivadas.

Bacterinas	Duplicado	Diluciones					Resultados (UFC /ml).
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
Bacterina 1 (ATCC 43924)	1	>250	>250	>250	87	8	8×10 ⁻⁶
	2	>250	>250	>250	82	5	
Bacterina 2 (H14X)	1	>250	>250	>250	84	8	8×10 ⁻⁶
	2	>250	>250	>250	83	6	
Bacterina 3 (1-2-2-L-J)	1	>250	>250	>250	88	7	8×10 ⁻⁶
	2	>250	>250	>250	71	4	
Bacterina 4 (3540)	1	>250	>250	>250	54	7	6×10 ⁻⁶
	2	>250	>250	>250	62	6	
Bacterina 5 (4-4)	1	>250	>250	>250	53	4	6×10 ⁻⁶
	2	>250	>250	>250	68	5	
Bacterina 6 (2-4)	1	>250	>250	>250	56	5	6×10 ⁻⁶
	2	>250	>250	>250	59	7	

Producción de la Bacterina

Una vez terminada la estimación de unidades formadoras de colonia en placa (UFC/ml) presentes cada aislado de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se procedió a elaborar seis bacterinas, con el protocolo antes mencionado (Mújgan

I., et al 2010). En la figura 9 se puede observar las bacterinas fueron sometidas a pruebas de esterilidad.



Figura 9.- Bacterina y prueba esterilidad. Bacterina 4-4 (A), prueba de esterilidad placa gelosa sangre 8% (B), placa infusión cerebro corazón (BHI).

Corrimiento electroforético y visualización de patrones de bandas de proteínas de las bacterinas.

Para determinar el patrón de bandeo proteico presente de las bacterinas producidas, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condición desnaturante en sistema discontinuo (SDS-PAGE), donde cada pocillo fue cargado con 50 μg de proteína (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ muestra).

Se visualizaron los perfiles bandeo de proteínas presentes en el pellet y en el sobrenadante de las bacterinas. El corrimiento permitió observar 8 bandas teñidas por azul Coomassie con masa molecular de oscilaban entre 14 y 125 kDa.

En la figura 10 se observa en gel de poliacrilamida de los pellets, 3 bandas alto peso molecular 125,108 y 75 kDa. En el carril 2 y 3 se visualiza 3 bandas proteínas con alto peso molecular pertenecientes de la bacterina 1 (ATCC 43924) y la bacterina 3 (1-2-2-L-J). En el carril 5, 6 y 7 solo se visualizó dos 2 bandas de proteínas con alto peso molecular 125,108 kDa. Mientras que en el carril 4 se muestra la bacterina 4 (3540) no se visualizó ningún patrón de bandas de proteínas.

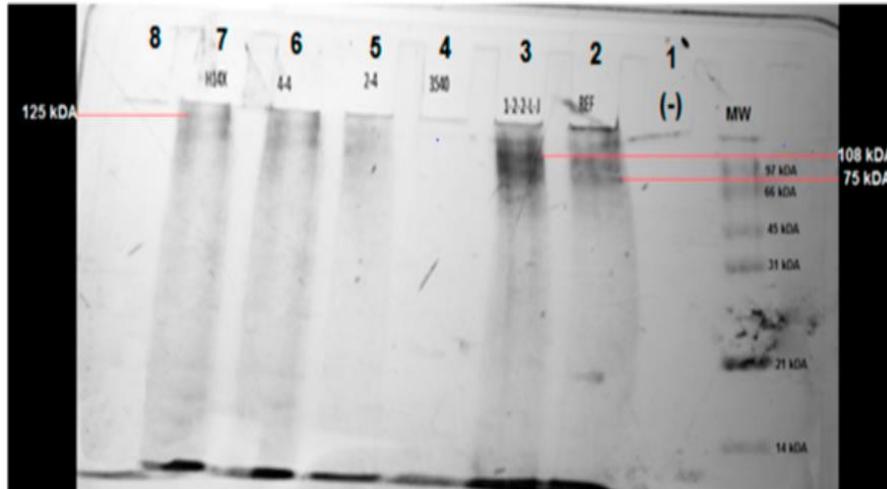


Figura 10. Visualización bandeado proteico en el pellet de las bacterinas. Electroforesis en gel poliacrilamida condición desnaturizante SDS-(PAGE) sistema discontinuo gel separación 12%; Gel concentrador 4%. (MW) Marcador de peso molecular Low Range SDS-PAGE Biorad 200 μ l # 1610304. **(Línea 1)** Muestra Blanco, **(Línea 2)** Bacterina de *C. pseudotuberculosis* ATCC 43924. **(Línea 3-7)** Bacterina de *C. pseudotuberculosis* aislados autóctonos, **(Línea 4)** Bacterina 4 "3540".

En la figura 11 se visualizan las proteínas del sobrenadante de cada una de las bacterinas, donde se observan 5 bandas de proteínas de bajo peso molecular entre 14 a 45 kDa.

En los carriles 1, 2 y 5 se identificaron 4 bandas de proteínas de bajo peso molecular de 14, 17, 20, 31 kDa. Mientras en los carriles 3 y 6 se observó además una quinta banda de bajo peso molecular de 28 kDa. De igual manera en el carril 4 en la bacterina 4 (3540) no se visualizó ningún patrón de bandeado. En el (cuadro 11) se muestran las variaciones y similitud en el perfil del bandeado proteico de cada bacterina en el excreción del sobrenadante y excreción somático.

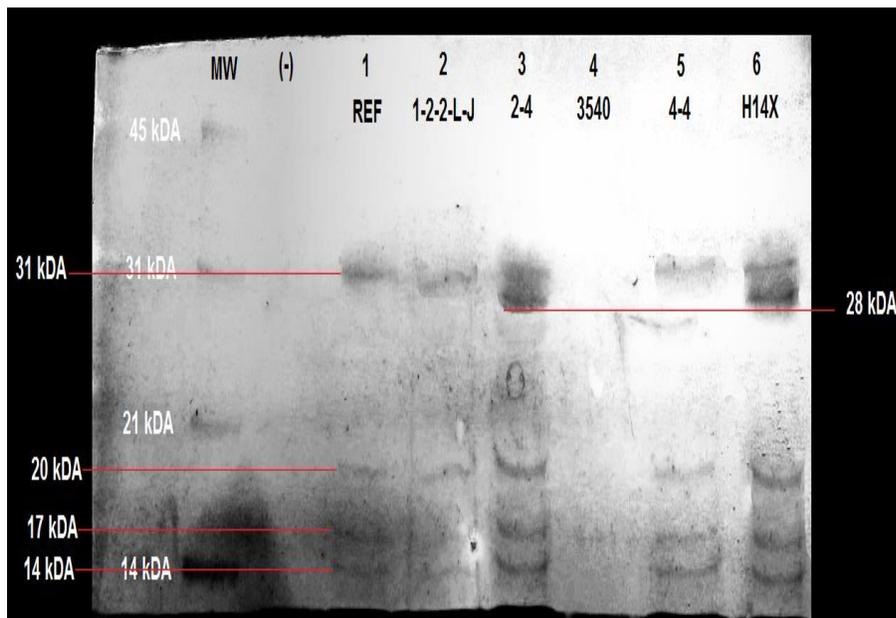


Figura 11. Visualización bandeo proteico de las bacterinas extracto sobrenadante. Electroforesis en gel poliacrilamida condición desnaturalizante SDS-(PAGE) sistema discontinuo gel separación 12%; gel concentrador 4%. (MW) Marcador de peso molecular Low Range SDS-PAGE Biorad 200 µl # 1610304. (Línea 1) Muestra Blanco, (Línea 2) Bacterina de *C. pseudotuberculosis* ATCC 43924. (Línea 3-7) Bacterina de *C. pseudotuberculosis* aislados autóctonos extracto sobrenadante, (Línea 5) Bacterina de *C. pseudotuberculosis* 3540.

Cuadro 11. Bando proteico de bacterinas *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Bacterina	Aislamiento	Extracto somático			Extracto sobrenadante				
		125	108	75	31	28	20	17	14
1	C. ATCC 43924	X	X	X	X		X	X	X
2	H14X	X	X		X	X	X	X	X
3	1-2-2-L-J	X	X	X	X		X	X	X
4	3540								
5	4-4	X	X		X	X	X	X	X
6	2-4	X	X		X		X	X	X

X. DISCUSIÓN

Referente a la situación actual de la enfermedad linfadenitis caseosa ovina (LAC), provocada por *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*, a nivel mundial, es considerada como un problema importante en las actividades de la ovinocultura y capricultura. Esta causa pérdidas económicas en muchos países, debido a la disminución en la producción de carne, leche y lana, y por las restricciones en la comercialización de sus productos en el mercado nacional e internacional, así como por el riesgo en salud pública, debido a que es un patógeno zoonótico (Estevao *et al.*, 2006). En los países afectados solo el 25% realizan algún tipo de tratamiento para el control de la enfermedad y solo en el 10.4% se aplica algún tipo de programa de vacunación. (Ruiz *et al.*, 2007).

En México los estudios de prevalencia de la enfermedad están localizados (Ochoa *et al.* 1996), pero no existen estudios nacionales, ya que es una enfermedad que no se considera de reporte obligatorio (OIE 2009). Dentro del territorio Mexicano, no hay referencia de datos publicados sobre la implementación de programas de vacunación, ni el desarrollo de vacunas o bacterinas, ya que médicos veterinarios solo realizan el control de la enfermedad por medio de tratamientos antimicrobianos y quirúrgicos sin poder controlar la enfermedad dentro de las producciones ovinas y caprinas. Por tal motivo es importante profundizar sobre esta enfermedad para implementar medidas de prevención y control.

En el trabajo realizado por González, (2014) se caracterizaron 60 aislados autóctonos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidos de exudados superficiales de ovinos y caprinos identificados por pruebas bioquímicas clásicas y sistema de identificación API-Coryne. Se obtuvieron diferentes perfiles bioquímicos, lo cual coincide con lo reportado Soto *et al.*, (1994), quienes mostraron variaciones en los perfiles bioquímicos y concluyen que el sistema es capaz de identificar correctamente a nivel género, pero requiere pruebas adicionales para la identificación de subespecie.

La identificación molecular realizada por Hernández, (2015) se basó en la identificación de tres genes; 16s ADN, rpoB y pld a partir de 60 aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, lo cual coincide con otros autores entre los que destaca Cetinkaya *et al.*, (2002) la importancia de incluir los genes *Pld* y *rpoB* en el PCR Multiplex y hacer la prueba más sensible y específica para diferenciación de especie *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*. Hernández, (2015) demostró 4 genes de virulencia Fag A,B,C,D presentes en aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, vinculados para la adquisición y transporte de hierro, lo cual está asociado con la virulencia, crecimiento y persistencia cuando se establece la infección.

Se identificaron en este estudio 8 bandas con pesos moleculares de 14 ,17 ,28 ,31 ,75 ,108 y 125 kDA, presentes 83.33% (5/6) de las bacterinas. En el caso de la bacterina 4 (3540) en la cual no se observó bandeo, esto puede ser debido a la degradación de las proteínas presentes en el pellet o en el sobrenadante, pudiéndose deber también a la técnica de extracción (Adrien *et al.*, 2004).

En este trabajo demostró, 3 bandas de proteínas con alto peso molecular de 125,108, 75 kDA, presente 83.33% (5/6) similar a lo reportado por otros autores en técnicas. (Ellis *et al.*, 1991; Muckle *et al.*, 1992; Braithwaite *et al.*, 1993; Vera *et al.*, 2003, Adrien *et al.*, 2004).

En corrimientos de bacterias enteras por la técnica de SDS-PAGE realizado por Adrien *et al.*, (2004) se demostraron demostró 16 bandas, de las cuales fueron reconocidas por sueros positivos las de 24, 31, 40, 41, 68, 75, 108 y 125 kDA, en este trabajo solo se realizó SDS-PAGE coincidiendo en las bandas de 125,108, 75 kDA que parecen ser altamente inmunogénicas.

El corrimiento de proteínas a través de electroforesis SDS-PAGE y la caracterización del perfil proteínas antigénicas por inmunoblot (Mucle *et al.*, 1992; Mohan *et al.*, 2001) de diferentes fracciones subcelulares de *Corynebacterium pseudotuberculosis* observaron bandas inmunogénicas de 22, 5, 43, 64, 31, 40, 68 y 120 kDA otros trabajos identifican proteínas inmunogénicas de 28, 38 y 40 kDA (Walker *et al.*,1994). En este caso no se realizaron pruebas de inmunoblot sin embargo constatamos la presencia de bandas similares a las inmunogénicas de estos trabajos.

El principal factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis* es una exoproteína de 31 kDa llamada fosfolipasa D (PLD). En este trabajo se encontró en 5 de las bacterinas producidas un banda de 31kDA que coincide con el peso molecular del PLD. (Hodgson *et al.*, 1999).

Los pesos moleculares de las proteínas presentes en el sobrenadante y en el pellet de las bacterinas de este estudio coinciden con las descritas como inmunodominantes por otros autores. Algunos trabajos previos han utilizado la fracción de proteínas de secreción presentes en el sobrenadante con fines de diagnóstico en técnicas de ELISA (Moura-Costa, 2002), además de ser un fuerte estimulador de la respuesta inmune celular en ovinos y caprinos (Regis, 2001).

XI. CONCLUSIÓN

La linfadenitis caseosa es una enfermedad que afecta gravemente a las explotaciones ovinas y caprinas en México, lo cual se requiere el conocimiento de las técnicas de diagnóstico para la identificación del agente casual, que permitirá establecer medidas preventivas y profilácticas a través del desarrollo y la utilización de un inmunógeno efectivo contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Este trabajo es de los primeros reportes sobre la caracterización y el desarrollo de una bacterina utilizando aislamientos autóctonos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y la determinación de los perfiles de proteínas presentes en las mismas. En este estudio se demostró la presencia de proteínas con pesos moleculares de 14,17, 28, 31, 75, 108 y 125 kDA en los aislamientos autóctonos que coinciden con lo descrito en trabajos realizados en otros países. Existe similitud entre los perfiles de proteínas presentes en los pellets y en los sobrenadantes de los aislamientos autóctonos con respecto a las cepas de otros países. Se deberían realizar estudios de inmunoblot para saber la verdadera inmunogenicidad de los bandeos obtenidos en este trabajo.

XII. SUGERENCIA.

Aún se desconoce el rol de la mayoría de estas proteínas presentes de *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*. Con este estudio se ha demostrado la presencia de proteínas de bajo y alto pesos moleculares presente las bacterinas elaboradas con cepas autóctonas, pero se desconoce aún si alguna de estas proteínas juegan un papel importante en la respuesta inmune, que puedan conferir un grado mayor de protección, pero es necesario realizar estudios más completos para mejorar y desarrollar bacterinas con fracciones proteicas más específicas que otorguen una protección más efectiva para dicha enfermedad.

Además el desarrollo de estas bacterinas, será el punto de partida de nuevos estudios, con el fin de conocer los resultados del grado de protección ofrecida por alguna de estas en desafíos controlados y de campo en el modelo ovino.

XIII. LITERATURA CITADA.

- Adrien Paule, Vasco A, Moura-Costa L. F., Menezes Freire L., Costa Vale V. L., Cerqueira Babia R., Carminati R., Nascimento I., Meyer R. (2004) SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* R. *Ci. Méd. Biol.*, Salvador, V. 3, N. 1, P. 44-52
- Aldama F.J. (2016). Identificación de Genes de Patogenicidad Que Participan En La Adquisición De Hierro Y La Persistencia De *Corynebacterium Pseudotuberculosis* En Aislados. Universidad Politécnica Del Valle De Toluca ,1-74.
- Aleman M, S.J. Spier, W.D. 'Wilson, M. Doherr., (1996). *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Infection In Horses: 538 Casos (1982-1993). *Y. Am. Vet. Med. Assoc.* 209:804-809.
- Aleman M, Spier S.J., (2001). *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Infection. In *Large Animal Internal Medicine* 3'd Ed. Edited By Smith P.B. St Luis: Mosby Co. Pp 1078-1084.
- Alves F., G. Carvalho L. Pacheco (2005) *Corynebacterium Pseudotuberculosis*: Microbiology, Biochemical Properties, Pathogenesis and Molecular Studies of Virulence. Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento De Biologia Geral, Instituto De Ciências Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais, Cp 486, Cep 31270-901, Belo Horizonte.
- Almuzara, MN., C, De Mier., CR, Rodríguez., AMR, Famiglietti., CA, Vay., (2006). Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la Identificación de Bacilos Gram-Positivos Diferoides de Importancia Clínica. *Revista Argentina de Microbiología.* 38, 197-201.
- Andrade, JSL., Azevedo, SS., Andreey, JAT., Higino, SSS., Azevedo, EO., (2012). Occurrence and risk factors associated with the *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and goats from the semiarid region of the Paraíba state, Northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira.* 32, 116-120
- Arsenault J.; Girard C., Dubreuil P., Daignault Jr. Galarneau, J Boisclair. C., Simard; D. Belanger., (2003). Prevalence of and Carcass Condemnation from Maedivisna, Paratuberculosis And Caseous Lymphadenitis In Culled Sheep From Québec Canada. *Prev. Vet. Med.* 30(59):67-81.

- Augustine J.L., Renshaw H.W. (1986), Survival of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* in Axenic Purulent Exudate on Common Barnyard Fomites, *Am. J. Vet. Res.* 47 (1986) 713–715.
- Barreiro C., Gonzalez-Lavado E., Patek M And Martin Jf., (2004). Transcriptional analysis of the *groEs-groEL1*, *groEL2*, and *dnak* Genes In *Corynebacterium Glutamicum*: Characterization of Heat Shock-Induced Promoters. *J. Bacteriol.* 186: 4813-4817.
- Bastos BI, Meyer R, Guimarães Je, Ayres Mcc, Guedes Mt, Et Al. (2011). Haptoglobin, Fibrinogen Concentrations And Leukocyte Counts In The Clínica Investigation Of Caseous Lymphadenitis In Sheep. *Vet Clin Pathol* 40: 496-503
- Bastos B.Lopes, Dias Portela Rw., Dorella F.A., Ribeiro D, Seyffert N., (2012). *Corynebacterium Pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunologic* S4:005. Doi:10.4172/2155-9899.S4-005 *J Clin Cell Immunol* ,1-15.
- Batey Rg., (1986). Pathogenesis of Caseous Lymphadenitis in Sheep and Goats. *Aust Vet J.* 63:269-272.
- Batey Rg., (1986). Frequency and Consequence of Caseous Lymphadenitis in Sheep and Lambs Slaughtered at Western Australian Abattoir. *American Journal Of Veterinary Research.*47: 482-485.
- Billington SJ., Esmay PA, Songer JG and Jost BH., (2002). Identification and Role in Virulence of Putative Iron Acquisition Genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 41-45.
- Bogdan Jr, Newlands-Monteith CF, Ellis JA., (1997). Nitric Oxide Production Following In Vitro Stimulation Of Ovine Pulmonary Alveolar Macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 56: 299-310.
- Braga WU., (2007). Protection In Alpacas Against *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Using Different Bacterial Components. *Vet Microbiol* 119: 297–303.
- Braga, W., Schul S, Nu A, Pezo D., Franco E., (2007). A Primary *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Low Dose Infection In Alpacas (*Lama Pacos*) Protects Against A Lethal Challenge Exposure. *Small Rumin Res* 72: 81-86.
- Braibant, M; Gilot, P and Content, J. 2000 "TheATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacteriumtuberculosis*," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 24, no. 4, pp. 449–467.
- Brogden KA., Cutlip RC., Lehmkuhl HD. (1984) Experimental *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Infection In Lambs. *Am J Vet Res* 45:1532-1534.

- Brown CC., Olander HJ., (1987). Caseous Lymphadenitis of Goats and Sheep: A Review *Vet Bull.*57: 7445-7448.
- Burrell D.H. (1980). Caseous Lymphadenitis In Goats. *Aust. Vet. J.* 57:105-110.
- Buxton A., Fraser G., (1977). *Corynebacterium* Animal Microbiology, *Blackwell Scientific Publications, Edinburgh*, Pp. 177–183.
- Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin R., De Baere, T., Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Isolates from Sheep and Goats By Pcr. *Vet. Microbiology.*88:75-83.
- Chaplin PJ, De Rose R, Boyle JS, Mcwaters P, Kelly J., (1999) Targeting Improves The Efficacy of A Dna Vaccine Against *Corynebacterium Pseudotuberculosis* in Sheep. *Infect Immunologic* 67: 6434-6438.
- Chirino C., Scaramelli, A., Rey C., (2005). Bacteriological Characterization of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* in Venezuelan Gota Flocks. *Small Rumin Res. In Press.* 317-319.
- Connor Km., Quirie, MM., Baird, G., Donachie, W., (2000).Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38:2633– 2637.
- Costa Mp., John, AM., Síntia Sa., Fernanda AD, Cristina, TF., Diana, MM, Maria, FST., Ewa, L., Barbara, L., Roberto M., Ricardo WP., Sérgio CO., Anderson, M and Vasco A., (2011). Molecular Characterization of the *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Hsp60-Hsp10 Operon, and Evaluation of the Immune Response And Protective Efficacy Induced By Hsp60 Dna Vaccination In Mice. *Bmc Research Notes*, 4:243.
- Coulter, S.N; Schwan, W.R; Ng, E.Y.W. *et al.*, 1998. "Staphylococcus aureus genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments," *Molecular Microbiology*, vol. 30, no. 2, pp. 393–404.
- Coyle M., Lipsky B., (1990). *Coryneforme* Bacteria in Infectious Diseases: Clínica and Laboratory Aspects. *Clin Microbio. Rev.*3:227-246.
- D'fonseca, V., Moraes PM., Dorella, FA., Pacheco, LCG., Meyer R., Portela Rw., Miyoshi A., Azevedo V., (2008). A Description of Genes Of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Useful In Diagnostics And Vaccine Applications. *7(1):*252-260.
- De Rose R., Tennent J., Mcwaters P., Chaplin PJ., Wood Pr., (2002). Efficacy of Dna Vaccination by Different Routes of Immunisation *in Sheep*. *Vet Immunol Immunopathol* 90: 55-63.

- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, Jp., Raoult, D.(2001). Sequence Analysis Of A Large Collection Of Environmental And Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J Clin Microbiol.*38: 3623-30.
- Eckersall PD, Lawson FP., Bence L., Waterston MM., Lang TL., (2007). Acute Phase Protein Response in an Experimental Model of Ovine Caseous Lymphadenitis. *Bmc Vet Res* 3:35.
- Egen, N.B., W.A. Cuevas, P.J. Mcnamara, Khamis A., D. Raoult And B. La Scola, (2005). Purification of PLD of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by Recycling Isoelectric Focusing. *Am. J. Vet. Res.*, 50: 1319-1322.
- Eggleton DG., Middleton HD., Doidge CV., Minty DW., (1991). Immunisation Against Ovine Caseous Lymphadenitis: Comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Vaccines with and without Bacterial Cells. *Aust Vet J* 68: 317-319.
- El-Enbaawy Mi, Saad MM, Selim SA., (2005). Humoral and Cellular Immun Responses of a Murine Model Against *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Antigens. *Egypt J Immunol* 12:13-19.
- ELLIS, J. A. (1991) Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v.28, p.289-301.
- Eom CY., Kim E., Ro YT, Kim SW., (2005). Cloning and Molecular Characterization of Groesl Heat-Shock Operon in Methylophilic Bacterium *Methylovorus* Sp. strain Ss1 Dsm 11726. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 695-702.
- Estevao SE., Gallardo A., Abalos A., Jodor N., Jensen O., (2006). Actualización sobre Linfadenitis Caseosa: El Agente Etiológico y la Enfermedad. Depto. Bioquímica, Fac. Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. Departamento de Zoonosis, Secretaría de Salud de la Provincia de Chubut, Sarmiento, Chubut, Argentina *Veterinaria Argentina*, 23(224):258-278.
- Fontaine MC., Baird G., Connor KM., Rudge K., Sales J., (2006). Vaccination Confers Significant Protection of Sheep Against Infection with a Virulent United Kingdom Strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine* 24: 59-86.
- Funke G., Von Graevenitz A., Clarridge JE., And Bernard KA., (1997). Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria. *Clin Microbio Rev.* 10:125-159.

- Hernández L.F., (2015) Caracterización Molecular De *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Aislados De Muestras De Casos Clínicos De Linfadenitis Caseosa En Ovinos Y Caprinos Universidad Autónoma Del Estado De México 2- 99
- Hodgson AL., Bird P., Nisbet LT., (1990). Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of the Phospholipase D Gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 172: 1256-1261.
- Hodgson ALM., Carter K, Tachedjian M., Krywult J., Corner LA., (1999) A Efficacy of an Ovine Caseous Lymphadenitis Vaccine Formulated Using a Genetically Inactive Form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D. *J Bacteriol* 17: 802-808.
- Hodgson ALM., Krywult J., Corner LA., Rothel JS, Radford AJ., (1992). Rational Attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential Cheesy Gland Vaccine and Live Delivery Vehicle. *Infect Immun* 60: 2900-2905.
- Hommeze J., Devriese LA., Vaneechoutte M., Riegel P., Butaye P., Haesebrouck F., (1999). Identification of Nonlipophilic Corynebacteria Isolated from Dairy Cows with Mastitis. *J. Clin. Microbiol.*37:954-957
- Khamis, A., Raoult, D. & La Scola, B. (2004). RpoB Gene Sequencing For Identification Of *Corynebacterium* Species. *J Clin Microbiol* 42, 3925–3931.
- Khamis, A., Raoult D. & La Scola B., (2005). Comparison Between RpoB And 16S Rrna Gene Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol* 43, 1934–1936.
- Kultz D., (2005). Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response. *Annu. Rev. Physiol* 67: 225-257.
- Laemmli UK., (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature, London*, V.227, P.680-685.
- Lan DTB., Makino S., Shirahata T., Yamada M., Nakane A., (1999). Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon are Required for the Development of Protective Immunity to Secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Mice. *J Vet Med Sci* 61: 1203-1208.
- Lark EA., Bosch J., Bijl CG., Schreuder BEC., (1992). Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunoblot Analysis Used for Control of Caseous Lymphadenitis in Goats and Sheep. *American Journal Of Veterinary Research*. 53(7):1125-1132.

- Leardini NM., Prieto C., Martínez, L. Aguerre, R. Loaysa, (2002). Infecciones por bacilos Gram Positivos Aeróbicos, Corinebacterias, Bacillus y Actinomycetes en Curso A.N.L.I.S. "Dr Carlos Malbrán. Departamento de Bacteriología, Servicio de Bacteriología Especial.
- León L., Garrido F., Gonzalez Candela., Cubero, M., Pablo MJ., (2002b). Anatomía Patológica De La Pseudotuberculosis. Rev. Ovis, [Http/ Www.Exopol.Com/Circulares/205.Html](http://www.exopol.com/circulares/205.html). Última Revisión 9 05 2014.
- Lipsky B.A, A.C. Goldberger, L.S. Tompkins, J.J. Plorde. (1982). Infections Caused By Nondiphtheria Corynebacteria. Rev. Infect. Dis. 4:1220-1235. Sitio Argentino De Producción Animal.
- Lomonte B. Vigliotti, (2007) Manual de Métodos Inmunológicos UNIVERSIDAD DE COSTA RICA Facultad de Microbiología Instituto Clodomiro Picado Cuarta Edición, 2007, 1-139.
- Norma Oficial Mexicana Nom-092-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Método Para La Cuenta De Bacterias Aerobias En Placa.
- Norma Oficial Mexicana Nom-110-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Preparación Y Dilución De Muestras De Alimentos Para Su Análisis Microbiológico.
- Manual Biorad (2016). A Guide to Polyacrilamide Gel Electrophoresis and Detection 1-47
- Meyer R., Carminati R., Bahia RC., Vale VL, Viegas S., (2002). Evaluation Microbiol 5: 156-160.
- Middleton MJ., Epstein VM., Gregory GG., (1991). Caseous Lymphadenitis on Flinder Island: Prevalence and Management Surveys. *Australian Veterinary Journal*. 68 (9):311-312.
- Moura-Costa LF., Paule BJA., Azevedo V, Freire SM., Nascimento I., (2002). Chemically Defined Synthetic Medium for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Culture. *Braz J Anim Health Prod* 3: 1-9.
- Nairn, ME., Robertson JP., Mcquade NC., (1977). The Control of Caseous Lymphadenitis in Sheep by Vaccination. Proceedings 54th Annual Conference Of The Australian Veterinary Association:159-161.
- Ochoa U.G., I.J. Deuces, L.P. Martínez B.M.R. Jiménez, R.M. Pérez, (1996). "Aislamiento de Agentes Bacterianos a partir de Exudados Nasales en Rebaños Ovinos Trashumantes de Xalatlaco México" Abstract De Libro Resúmenes Del Xv Congreso Panamericano De Ciencias Veterinarias. Brasil. Pn9 # 12909 Pág 230.

- OIE–World Organization for Animal Health. [2009]. http://www.oie.int/hs2/sit_mald_cont.asp?c_mald=156andc_cont=6andannee=2004. Mapa publicado en versión electrónica. Búsqueda en línea realizada el 2015/08/15
- Onon EO., (1978). Purification and Partial Characterization of the Exotoxin of *Corynebacterium Ovis*. *Biochem J* 177: 181-186.
- Pacheco LGC., Pena, RR., Thiago LP., Dorella, FA., Bahia RC., Marçilio MC., Frota, NL., Oliveira, SC., Meyer R., Alves, SF., 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. *Journal of Medical Microbiology*.56:480–486.
- 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.
- Paton MW., Rose IR., Hart RA., Sutherland SS., Mercy AR., Ellis TM., (1994). New Infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reduces Wool Production. *Aust Vet J* 1994. 71: 47-9.
- Paule BJA., Azevedo V., Regis LF, Carminati R., Bahia R., (2003) Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* Primary Infection in Goats: Kinetics of IgG and Interferon Production, IgG Avidity and Antigen Recognition by Western Blotting. *Vet Immunol Immunopathol* 96: 129-139.
- Peel MM., Palmer GG., Stacpoole AM, Kerr TG., (1997). Human Lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases From Australia and Review. *Clin Infect Dis.* 24:185–191.
- Pépin M, Pardon P, Lantier F, Marly J, Levieux D, Et Al. (1988) Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Lambs – Kinetics Of Bacterial *Veterinary Microbiology Volume 26, Issue 4, 15 February 1991, Pages 381–392.*
- Pépin M, Seow HF., Corner L., Rothel JS., Hodgson AL., (1997). Cytokine Gene Expression in Sheep Following Experimental Infection with Various Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Differing In Virulence. *Vet Res* 28: 149- 163.
- Pépin M, Pardon P., Marly J., Lantier F., (1988). *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Adult Ewes by Inoculation in External Ear. *American Journal of Veterinary Research.* 49 (4):459-463.

- Perez R. L. Isabel (1992) identificación de proteínas con actividad Gaseinolítica en un extracto celular de *Nogardia brasiliensis*. Universidad Autónoma de Nuevo Leon. Dept Inmunología 1-103.
- Pinho JMR, Dorella FA., Coelho S., Fonseca CT., Cardoso FC., (2009). Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, but Fails to Confer Protection Against Infection. *Open Vet Sci J* 3: 22-27.
- Piontkowski MD, Shivvers DW., (1998). Evaluation of a Commercially Available Vaccine Against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for Use in Sheep. *J Am Preliminares Sobre Uma Vacina Viva Contra A Linfadenite Caseosa. Pesq Agropecuario Brasil* 26: 461-465.
- Qamra R, Mande SC., Coates AR and Henderson B., (2005). The Unusual Chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 85: 385-394.
- Rebouças MF, Portela RW., Lima DD., Loureiro D., Bastos BL., (2011) *Corynebacterium pseudotuberculosis* Secreted Antigen-Induced Specific Gamma-Interferon Production by Peripheral Blood Leukocytes: Potential Diagnostic Marker for Caseous Lymphadenitis in Sheep and Goats. *J Vet Diag Invest* 23: 213-220.
- Renaud FN., Le Coustumier A., Wilhem N., Aubel D., Riegel P., Bollet C., Freney J., (2007). *Corynebacterium hansenii* sp. Nov., An H-Glucosidase–Negative Bacterium Related to *Corynebacterium xerosis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:1113-6.
- Ribeiro OC., Silva JAH., Oliveira SC., Meyer R., Fernandes GB., (1991). Datos Preliminares Sobre Uma Vacina Viva Contra A Linfadenite Caseosa. *Pesq Agrope Bras* 26: 461-465.
- Riet-Correa F. 2007. Linfadenite caseosa, In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A., Borges J.R. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria. pp.347-352
- Romanenko EE, Baturo AP., Mokronosova MA., Tarasova GG, Sergeev AV., (2003). Microflora Of The Nasal Mucosa In Allergic Perennial And Infectious Rhinitis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 3: 66-71.
- Ruiz JC., D'afonseca V., Silva A., Ali A., Pinto AC., Santos AR., Rocha AAM., Lopes DO., Dorella FA., Pacheco LGC.,(2011) Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. *Plos One* 6:E18551.

- Ruiz L., Jerónimo R., Valle BM., Frias MT., (2007). Linfadenitis Caseosa I: Aspectos Históricos, Etiológicos Y Clínicos (Caseous Lymphadenitis I : Historical, Etiological And Clinics Aspects)Universidad de Granma. Carretera De Manzanillo Km 17½. Peralejo Bayamogranma Cuba. Cp: 85100 Centro Nacional De Sanidad Agropecuaria.
- Sá Aquino MDC., Gisele VG, Carina D CKR., Menzies PI., Muckle CA., (2013). Distribution of PLD and Fag A, B, C, and D Genes in *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Isolates from Sheep and Goats with Caseous Lymphadenitis. Sociedade Brasileira De Genetica.Printed In Brazil *Vet. Genetics And Molecular Biology*. 53(3):265-268.
- Samen, U; Gottschalk, B; Eikmanns, B.J. and Reinscheid, D.J. 2004. "Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*," *Journal of Bacteriology*, vol. 186, no. 5, pp. 1398–1408.
- Sanchez Nieto Sobieda (2013)Material de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica experimental (0141) Facultad de Química Departamento de Bioquímica 1-44
- Simmons CP., Dunstan SJ., Tachedjian M., Krywult J., Hodgson ALM., (1998). Vaccine Potential of Attenuated Mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep. *Infect Immun* 66: 474-479.
- Simmons CP., Hodgson ALM., Strugnell RA., (1997). Attenuation and Vaccine Potential of Aroq Mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 65: 3048-3056.
- Songer JG., (1997). Bacteria Phospholipases And Their Role In Virulence. *Trends Microbiol*, 5:156-161.
- Songer JG., Beckenbach K., Marshall MM., Olson GB & Kelley L., (1988). Biochemical and Genetic Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 49, 223- 226.
- Soto, A., J, Zapardiel., F, Soriano., 1994. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. *J. Clin. Pathol.* 47, 756-759.
- Stanford K., Brogden KA., Mcclelland LA., Kozub GC., 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* 1: 38-43.

- Stefańska I., Gieryńska M., Rzewuska M., Binek M., (2010). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within Macrophages and Induction of Phagocytes Death. *Pol J Vet Sci* 13: 143-149.
- Vay CM., Almuzara, (2002). Actualización en Bacilos Gram Positivos, Taxonomía, Identificación e Importancia Clínica. En II Simposio de Infectología y Microbiología Clínica. *Vet Pathol.* 32:68-71.
- Vera Vale, Songeli Freire, Ribeiro Marcos., Regis Lia., Bahia Robson, Carminati Renato., Adrien P.B. Jean., Nascimento Ivana., Meyer Roberto. (2003) Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* R. *Ci. méd. biol.*, Salvador, v. 2, n. 2, p. 192-200
- Vera A., González G., Domínguez M., Bello H., (2013) Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Microbiología Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30 (4): 407-416.
- Von G., and Krech T., (1992). The Genus *Corynebacterium*- Medical. in "The Prokaryotes". Ballows a, Trüper H, Dworkin M, Harder W and Heinz Schleifer K, Eds. Handbook On The Biology Of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification Applications., Vol III, Springer-Verlag.
- Walker J., Jackson LHJ., Eggleton DG., Meeusen ENT., Wilson MJ., (1994) Identification of a Novel Antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that Protects Sheep Against Caseous Lymphadenitis. *Infect Immun* 62: 2562-2567.
- Williamson LH., (2001) Caseous Lymphadenitis in Small Ruminants, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17 359-371.
- Yeruham IS., Friedman DE., S. Perl., (2000). Association Between Milk Production, Somatic Cell Count and Bacteria Dermatoses in three dairy cattle herds. *Aust Vet. J.* 78:250-253.
- Zaki Mm., (1976). Relation Between the Toxogenicity and Pyogenicity of *Corynebacterium Ovis* in Experimentally Infected Mice. *Res Vet Sci* 20: 197-20.

“Producción de una bacterina para linfadenitis caseosa y la evaluación de su composición a través de electroforesis”

ANEXOS.

Anexo A. Aislamientos *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos y caprinos.

IDENTIFICACION	NOMENCLATURA	LOCALIDAD	MUNICIPIO	ESTADO	ESPECIE	IDENTIFICACION SEXO	RAZA	REGIÓN ANATOMICA	TAMAÑO	CONSISTENCIA	COLOR EXUDADO	TIPO DE EXUDADO	
REF 1	1							CEPA ATCC					
(2-4)	2	SANTA FÉ	ZAPOTLANEJO	JALISCO	CAPRINO	668478 (2-4)	HEMBRA	ALPINA	CABEZA	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
(9-19)	3	MATATLAN	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	(9-19)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	SUAVE	VERDE	CASEOSO
(031)	4	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	682064	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	5.1- 10 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
(045)	5	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	270	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	5.1- 10 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
(039)	6	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	978	HEMBRA	BLACK BELLY	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
(002)	7	COYOTES	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	671673	HEMBRA	PELIFOLK	CAUDAL	< 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
51AA	8												
(005)	9	EL TRAPICHE	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	848W2009	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA		CASEOSO
(005)	10	EL TRAPICHE	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	848W2009	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA		CASEOSO
(9-15)	11	MATATLAN	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	(9-15)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
728917	12	CAPILLA DE MILPITEPATITLAN		JALISCO	OVINO	728917	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
023b	13	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	8144	HEMBRA	PELIFOLK	CAUDAL	5.1- 10 CM	DURA	AMARILLO	PURULENTO
(004)	14	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	732612	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA	AMARILLO	SEROSO
(2-6)	15	SANTA FÉ	ZAPOTLANEJO	JALISCO	CAPRINO	558122 (2-6)	HEMBRA	ALPINA	CABEZA	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
(8-3)	16	ACATIC	ACATIC	JALISCO	OVINO	474 (8-3)	HEMBRA	PELUBUEY	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
(9-12)	17	MATATLAN	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	(9-12)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
3579	18	EL PESCADERO	TEPATITLAN	JALISCO	OVINO	3579	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
632935	19	LOMAS DE SAN JIL	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	632935	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
033b	20	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	635816	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
(024)	21	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	1116	MACHO	PELIFORK	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
52 (4-4)	22	TAUQUILLA	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	52 (4-4)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	SANGUINOLIENTO
3582	23	EL PESCADERO	TEPATITLAN	JALISCO	OVINO	3582	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
59 (1-6)	24	SANTA FÉ	ZAPOTLANEJO	JALISCO	CAPRINO	59 (1-6)	HEMBRA	SAANEN	INGUINAL	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
(5-8)	25	ZAPOTLANEJO	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	728402 (5-8)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	5.1- 10 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
(4-3)	26	TAUQUILLA	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	1134 (4-3)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
9575R	27	SANTA ANITA	TLATEPAQUE	JALISCO	OVINO	9575	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROSO
(027)	28	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	716187	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
3612PK	29	CAPILLA DE MILPITEPATITLAN		JALISCO	OVINO	3612	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	5.1- 10 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
651793	30	CAPILLA DE MILPITEPATITLAN		JALISCO	OVINO	651793	HEMBRA	DORPER	CABEZA	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
(6-4)	31	CAPILLA	TEPATITLAN	JALISCO	OVINO	S/N (6-4)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	5.1- 10 CM	DURA	AMARILLO	CASEOSO
00160R.	32	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	8351	HEMBRA	PELIFOLK	GLANDULA MAMARIA	< 5 CM	SUAVE	BLANCO	CASEOSO
H14X	33	CAPILLA DE MILPITEPATITLAN		JALISCO	OVINO	H14X	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	5.1- 10 CM	SUAVE	VERDE	PURULENTO
734503	34	LOMAS DE SAN JIL	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	734503	MACHO	BOER	CABEZA	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROSO
(026)	35	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	635669	MACHO	PELIFOLK	CABEZA Y CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
(030)	36	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	8150	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	5.1- 10 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
(019)	37	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	58540	HEMBRA	PELIFOLK	INGUINAL	5.1- 10 CM	DURA	AMARILLO	PURULENTO
(006)	38	EL TRAPICHE	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	534V	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA	AMARILLO	SANGUINOLIENTO
585790	39	CAPILLA DE MILPITEPATITLAN		JALISCO	OVINO	585790	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
694986PK	40	LOMAS DE SAN JIL	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	694986	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	SUAVE	VERDE	CASEOSO
4-2- 2L	41	TAUQUILLA	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	345929 (4-2)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	AMARILLO	SEROPURULENTO
5601PK	42												
4-5- 2L- J.	43	TAUQUILLA	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	7-0 (4-5)	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
694978	44	LOMAS DE SAN JIL	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	694978	MACHO	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
13AA	45												
701127	46												
728930	47	CAPILLA DE MILPITEPATITLAN		JALISCO	OVINO	728930	HEMBRA	BLACK BELLY	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
1322PK	48	LOMAS DE SAN JIL	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	1322	MACHO	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
691331PK	49												
(047)	50	LA MOJONERA	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	104W	HEMBRA	PELUBUEY	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
(028)	51	TESISTAN	ZAPOPAN	JALISCO	OVINO	T122V2008	HEMBRA		CUELLO	< 5 CM	DURA	BLANCO	SEROSO
3552	52	CAPILLA DE MILPITEPATITLAN		JALISCO	OVINO	3552	HEMBRA	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
632835	53												
(6-18)	54	CAPILLA	TEPATITLAN	JALISCO	OVINO	728919 (6-18)	HEMBRA	PELIFOLK	CAUDAL	5.1- 10 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
694977	55	LOMAS DE SAN JIL	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	694977	MACHO	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	SUAVE	VERDE	CASEOSO
728905	56	CAPILLA DE MILPITEPATITLAN		JALISCO	OVINO	728905	MACHO	PELIFOLK	CUELLO	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
3540	57	SANTA ANITA	TLATEPAQUE	JALISCO	OVINO	3540	HEMBRA	DORPER	CUELLO	< 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROSO
1-2- 2L	58	SANTA FÉ	ZAPOTLANEJO	JALISCO	CAPRINO	58 (1-2)	HEMBRA	SAANEN	INGUINAL	< 5 CM	SUAVE	AMARILLO	SEROPURULENTO
61 61 26	59	LOMAS DE SAN JIL	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	616126	MACHO	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
69 4992	60	LOMAS DE SAN JIL	ZAPOTLANEJO	JALISCO	OVINO	694992	HEMBRA	PELIFOLK	CABEZA	< 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO

Anexo B Protocolo de pruebas API-Coryne.

REF 20 900

078891 - es - 2009/10

api® Coryne

IVD

Sistema de identificación de bacterias corineformes

INTRODUCCIÓN Y OBJETO DEL ENSAYO

La galería API Coryne es un sistema estandarizado para la identificación en 24 horas de bacterias corineformes utilizando ensayos miniaturizados, así como una base de datos. La lista completa de las bacterias detectables por el sistema está indicada en la Tabla de Identificación al final de esta ficha técnica.

PRINCIPIO

El sistema API Coryne está compuesto por una galería de 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares.

Los ensayos enzimáticos se inoculan con una suspensión densa que rehidrata los sustratos enzimáticos. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen por cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos.

Las pruebas de fermentación se inoculan con un medio enriquecido (que contiene un indicador de pH) que rehidrata los sustratos azucarados. La fermentación de los carbohidratos produce una acidificación que se traduce en un cambio de color espontáneo del indicador de color.

Después de la incubación, la lectura de estas reacciones se lleva a cabo con la ayuda de la Tabla de Identificación, y el reconocimiento se realiza mediante el Catálogo Analítico o con la ayuda de un programa informático de identificación.

PRESENTACIÓN (envase de 12 ensayos)

- 12 galerías API Coryne
- 12 ampollas de API GP Medium
- 12 ampollas de API Suspension Medium, 3 ml
- 1 ampolla McFarland, punto 6
- 12 hojas de resultados
- 12 cámaras de incubación
- 1 ficha técnica

COMPOSICIÓN

Galería

La composición de la galería API Coryne puede verse en la Tabla de Identificación de la presente ficha técnica.

Medios

API GP Medium	L-cistina	0,5 g
	Triptona (origen bovino/porcino)	20 g
	Cloruro sódico	5 g
	Sulfito sódico	0,5 g
	Rojo fenol	0,17 g
	Agua desmineralizada	csp 1000 ml
	pH: 7,4 - 7,8	
API Suspension Medium 3 ml	Agua desmineralizada	
Patrón 6 de McFarland	BaSO ₄	2,88 · 10 ⁻⁴ mol/l

Las cantidades indicadas pueden ajustarse en función de los títulos de las materias primas.

REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Reactivos

- Reactivos : NIT 1 + NIT 2 (ref. 70 442)
- ZYM A (Ref. 70 494)
- ZYM B (ref. 70 493)
- PYZ (ref. 70 492)
- Aceite de parafina (ref. 70 100)
- Peróxido de hidrógeno (3 %)
- DENSI-MAT (ref. 99 234)
- Catálogo Analítico API Coryne (ref. 20 990) o programa informático de identificación **apiweb™** (Ref. 40 011) (consultar con bioMérieux)
- Agar Columbia con sangre con ANC (ref. 43 071) o sin ANC (ref. 43 041) o Trypcase Soja con sangre (ref. 43 001)

Material

- Pipetas o PSipettes
- Gradillas para ampollas
- Protege-ampolla
- Escobillones
- Equipo general de laboratorio de bacteriología

PRECAUCIONES DE UTILIZACIÓN

- Para diagnóstico *in vitro* y control microbiológico.
- Exclusivamente para uso profesional.
- Este envase contiene compuestos de origen animal. La falta de control sobre el origen y/o el estado sanitario de los animales, no nos permite garantizar de forma absoluta que estos productos no contengan algún agente patógeno transmisible, por lo que se recomienda manipularlos mediante las precauciones de utilización relativas a los productos potencialmente infecciosos: (no ingerir, ni inhalar).
- Todas las muestras, cultivos bacterianos y productos inoculados deben ser considerados como potencialmente infecciosos y ser manipulados de manera apropiada. Las técnicas asépticas y las precauciones habituales de manipulación para el grupo bacteriano estudiado deben ser respetadas durante todo el proceso de manipulación; consultar: "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Revisión en vigor*". Para información complementaria sobre las precauciones de manipulación, consultar: "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC/NIH - Última edición*", o la reglamentación vigente en el país de utilización.
- No emplear los reactivos después de su fecha de caducidad.
- Antes de su utilización, verificar la integridad del envase y de sus componentes.
- No utilizar galerías que hayan sufrido una alteración física: cúpula deformada, ...
- Se recomienda realizar un control de calidad antes de utilizar cada ampolla nueva de reactivo ZYM B.

- Abrir las ampollas con delicadeza del modo siguiente:
 - Introducir la ampolla en el proteje-ampolla.
 - Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
 - Presionar a fondo el tapón.
 - Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
 - Retirar la ampolla del proteje-ampolla y conservarlo para un próximo uso.
 - Retirar el tapón con cuidado.



- Las prestaciones indicadas han sido obtenidas mediante la metodología expresada en la presente ficha técnica. Toda desviación de dicha metodología puede alterar los resultados.
- La interpretación de los resultados del ensayo debe ser realizada teniendo en cuenta un contexto clínico o de otro tipo, el origen de las muestras, los aspectos macro y microscópicos de la cepa y, eventualmente, los resultados de otros ensayos, particularmente del antibiograma.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Las galerías y los medios se conservan a 2-8°C hasta la fecha límite de utilización indicada en el envase. Las ampollas de API Suspension Medium se conservan a 2-30°C hasta la fecha límite de utilización indicada en el envase.

MUESTRAS (TOMA Y PREPARACIÓN)

La galería API Coryne no debe ser utilizada directamente a partir de muestras de origen clínico o de otro tipo. En una primera fase, los microorganismos a identificar deben aislarse sobre un medio de cultivo adaptado según las técnicas usuales en bacteriología.

MODO OPERATORIO

Selección de las colonias

Después del aislamiento y verificación de la pertenencia de la cepa a identificar al grupo de los bacilos Gram positivos, no esporulados, aero-anaerobios facultativos:

- Anotar el tipo de hemólisis.
- Tomar una colonia bien aislada y ponerla en suspensión en 0,3 ml de agua estéril.
- Inundar la placa de agar (Agar Trypcase Soja + 5% sangre de cordero o Columbia + 5% sangre de cordero con o sin ANC) con esta suspensión (o pasar el escobillón estérilmente por toda la superficie del agar).
- Incubar la placa 24 - 48 horas a 37°C.

Preparación de la galería

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada [o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles de liberar gases (Ej. Cl₂, CO₂...)] en los alveólos para crear una atmósfera húmeda.
- Anotar la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No anotarla sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).
- Sacar una galería de su envase individual.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.

Preparación del inóculo

- Abrir una ampolla de API Suspension Medium como se indica en el párrafo “Precauciones de utilización”.
- Con la ayuda de un escobillón, recoger todo el cultivo previamente preparado. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (24-48 horas).

- Realizar una suspensión de turbidez superior al patrón **8 de McFarland**. Esta suspensión debe ser utilizada de inmediato después de su preparación.

Inoculación de la galería

- En las once primeras pruebas de la galería (pruebas desde NIT a [GEL]) repartir la suspensión precedente evitando la formación de burbujas (para ello, inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la punta de la pipeta o de la PSipette sobre el lateral de la cúpula):
 - para las pruebas desde NIT a ESC : unos 100-150 µl en cada cúpula.
 - para la prueba URE : llenar únicamente el tubo.
 - para la prueba [GEL] : llenar el tubo y la cúpula.
- En las nueve últimas pruebas de la galería (pruebas desde 0 a GLY[Ⓞ]):
 - abrir una ampolla de API GP Medium como se indica en el párrafo “Precauciones de utilización” y transferir el resto de la suspensión, unos 0,5 ml. Homogeneizar bien.
 - repartir esta nueva suspensión en los tubos únicamente.
- Llenar las cúpulas de las pruebas marcadas URE, 0 a GLY[Ⓞ] con aceite de parafina formando un menisco ligeramente convexo.
- Volver a cerrar la cámara de incubación.
- Incubar 24 horas (± 2 horas) a 36°C ± 2°C en aerobiosis.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

Lectura de la galería

Después de la incubación :

- Agregar los reactivos :
 - test NIT : 1 gota de NIT 1 y NIT 2
 - test PYZ : 1 gota de PYZ
 - tests PyrA, PAL, βGUR, βGAL, αGLU, βNAG : 1 gota de ZYM A y ZYM B (*).
- (*) Se recomienda controlar cada ampolla de reactivo ZYM B antes de la 1^{ra} utilización. Para ello, se recomienda utilizar la cepa ATCC[®] 27402 mencionada en el párrafo Control de Calidad con el fin de excluir los reactivos defectuosos.
- Esperar 10 minutos, y después leer todas las reacciones consultando la Tabla de Identificación. Si fuera necesario, exponer la galería bajo una lámpara potente (1000 W) durante 10 segundos para decolorar el exceso de reactivo en los tubos PyrA a βNAG.
- Realizar la prueba de CATALasa (utilizado como test nº 21) : agregar 1 gota de peróxido de hidrógeno al 3 % en la prueba ESC o [GEL]. Esperar 1 minuto. La aparición de burbujas corresponde a una reacción positiva.
- Anotar todas las reacciones en la hoja de resultados.

Interpretación

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico.

- Determinación del perfil numérico:
En la hoja de resultados, las pruebas están separadas en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 1, 2 ó 4. Sumando en el interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico a la reacción de la catalasa, que constituye el ensayo nº 21, le asignaremos el valor 4, cuando resulte positiva.

Anexo C. Curva de calibración de proteínas totales

Se preparó 10 ml albúmina sérica bovina a una concentración. (10 μ g / μ l). En una micro placa estéril por columna se utiliza el siguiente protocolo:

TABLA 4.- Curva calibración de proteínas totales en bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Muestra	Volumen utilizado BSA 10mg/ml (μ l)	Volumen utilizado bacterinas <i>C. pseudotuberculosis</i> . mg/ml (μ l)	Volumen utilizado agua destilada estéril (μ l)	Reactivo Bradford (mg/ μ l)	Volumen total
Blanco reactivo	0	0	50	150	200
Muestra problema	1	1	49	150	200
Muestra problema	2	2	48	150	200
Muestra problema	4	4	46	150	200
Muestra problema	6	6	44	150	200
Muestra problema	8	8	42	150	200
Muestra problema	10	10	40	150	200

Posteriormente se usa el espectrofotómetro, se midió la absorbancia 595 (nm), del blanco reactivo, de la muestra problema y de los estándares. (Sánchez S., 2013).

Anexo D. Preparación de soluciones.

Para la preparación de soluciones se prepararon de la siguiente manera. Acrilamida/ bisacrilamida (30:0.8). Se prepara disolviendo 29.2 g y 0.8 g de bisacrilamida en un volumen total de 100 ml de agua desionizada. Se filtra la solución a través de papel filtro Whatman No. 1 y se almacena a 4°C en una botella ámbar. La solución acrilamida/bisacrilamida dura 30 a 60 días.

Dodecil sulfato sódico (SDS) 10% w/v. Se prepara disolviendo 10 g de (SDS) en 100 ml de agua desionizada. La solución debe ser clara e incolora. Si la temperatura del agua es muy baja no todo el SDS se disuelve y será necesario calentar la solución. La solución es estable a temperatura ambiente.

Buffer del gel separador 1.5 M Tris HCl (pH.8.8). Disolver 18.15 g de (Tris(hydroxymetyl) aminometanol) en 80 ml de agua desionizada, agregar gota a gota una solución de 1.0 M HCl hasta alcanzar el pH deseado y ajustar a un volumen final de 100 ml. Una vez disuelta la solución se filtra a través de papel filtro Whatman No. 1 y se almacena a 4°C.

Buffer del gel concentrador 0.5 M Tris HCl (pH 6.8). Disolver 6.0 g de Tris Base en 60 ml de Agua desionizada, agregar gota a gota una solución de 1.0 M HCl hasta alcanzar el pH deseado y ajustar a un volumen final de 100 ml.

10 % Buffer de corrida 0.25 M Tris HCl 1.92 M Glicina 1 % SDS (pH8.3): Disolver 30.3 g Tris Base, 144 g glicina y 10.0 g SDS en un litro de agua desionizada. Esta solución esta 10 veces concentrada solución (10X) y se almacena a temperatura ambiente. Para preparar 1000 ml de buffer de corrida se toma 100 ml de la solución (10X) y se ajusta 900 agua desionizada.

Persulfato de amonio 10% w/v. Se disuelve 1.0 g de persulfato de amonio en 10 ml de agua desionizada. Esta sustancia es inestable y debe ser preparada justo antes de ser usada.

1.0% Azul Bromofenol 10 ml. Se disuelve 100 mg de azul Bromofenol en 10 ml de agua desionizada.

Buffer de muestra. Se prepara en una botella color ámbar agregando 5.5ml de agua desionizada, 1.25 ml de Buffer del gel concentrador 0.5 M Tris HCl (pH 6.8), 50 μ l 2-Mercapato, 3.0 ml de glicerol, 0.2 ml de 0.5% (w/v) Azul Bromofenol a volumen final 10 ml. Se conserva a temperatura ambiente. Se diluye la muestra 1:2 con buffer de muestra (Manual Biorad, 2016).

TEMED(N,N,N',N'-tetramethylenediamine). Se usa tal como se compra es estable cuando no se diluye. Se debe almacenar a 4°C en botella ámbar.

Anexo E. Preparación del Gel poliacrilamida.

Gel Separador. 12%

Gel Separador. 12%	
Reactivos	Preparación
Agua desionizada	3.4 ml
Buffer del gel separador 1.5 M Tris HCl (pH.8.8)	2.5ml
Dodecil sulfato sódico (SDS) 10% w/v).	0.1 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30:0.8).	4.0ml
Persulfato de amonio 10% w/v	50 µl
TEMED(N,N,N',N'-tetramethylenediamine)	10 µl
Volumen total	10.06 ml.

Gel Concentrador.4%

Gel Concentrador. 4%	
Reactivos	Preparación
Agua desionizada	6.2 ml
Buffer del gel concentrador 0.5 M Tris HCl (pH 6.8)	2.5 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30:0.8).	1.3 ml
Persulfato de amonio 10% w/v	50 µl
TEMED(N,N,N',N'-tetramethylenediamine)	10 µl
Volumen total	10.06 ml

(Manual Biorad, 2016)

Anexo F. Tinción de proteínas.

Posteriormente al corrimiento el gel de poliacrilamida se sumerge en solución colorante por 30 minutos en agitación.

Solución teñidora.	
Azul de comassie R 250	50 mg.
Metanol absoluto	25 ml
Ácido acético	50ml
Agua desionizada	500ml
Volumen total	575 ml.

A continuación se pasa en otro contenedor con la solución desteñidora y cambia cada 15 minutos hasta que solo queden visibles las bandas de proteínas. Se conserva el gel en ácido acético al 1%.

Solución desteñidora.	
Metanol absoluto	25 ml
Ácido acético	50ml
Agua desionizada	500ml
Volumen total	575 ml

(Manual Biorad, 2016)

Anexo G. Perfiles bioquímicos en el sistema API-Coryne. Aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidos de abscesos ovinos y caprinos.

																			PERFIL Bioquímico en sistema API			
NIT	PYZ	PyrA	PAL	B _{GUR}	B _{GAL}	a _{GLU}	B _{NAG}	ESC	URE	GEL	O	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG	CAT	No de aislados	%
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	16	23.2
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	9	13.0
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	6	8.7
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	6	8.7
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	5	7.2
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	5.8
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2	2.9
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2	2.9
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	2	2.9
(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	1	1.4
(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	1	1.4
(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1.4
1	3	0	52	1	1	84	0	10	100	7	0	99	97	6	23	55	1	16	1	100	69	100
Porcentaje de positividad																						

(Hernández F. 2015)

Anexo H. Perfiles bioquímicos clásicas. Aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidos de abscesos ovinos y caprino

IDENTIFICACION	NOMENCLATURA	OXIDASA	CATALASA	BIOQUIMICA TRADICIONAL			UREA	CALDO NITRI
				TSI	MIO	SIM		
REF 1	1	(-)	(+)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
(2-4)	2	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
(9-19)	3	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((031))	4	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((045))	5	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((039))	6	(-)	(+)	(+)(-)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((002))	7	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
51AA	8	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((005))	9	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((005))	10	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
(9-15)	11	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
728917	12	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
023B	13	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((044))	14	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
(2-6)	15	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
(8-3)	16	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
(9-12)	17	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
3579	18	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
632935	19	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
033b	20	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((024))	21	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
52 (4-4)	22	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
3582	23	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
59 (1-6)	24	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
(5-8.)	25	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
(4-3)	26	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
9575R	27	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((027))	28	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
3612PK	29	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
651793	30	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
(6-4)	31	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
0016DR.	32	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
H14X	33	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
734503	34	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((026))	35	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((030))	36	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((019))	37	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((006))	38	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
585790	39	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
694986PK	40	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
4-2. 2L	41	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
5601PK	42	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
4-5-2L-J.	43	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
694978	44	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
13AA	45	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
701127	46	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
728930	47	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
1322PK	48	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
691331PK	49	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((047))	50	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
((028))	51	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
3552	52	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
632835	53	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
((6-18))	54	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
694977	55	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
728905	56	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
3540	57	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
1-2-2LJ	58	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(-)
61 61 26	59	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)
69 4992	60	(-)	(+)	(+)(+)(-)	(-)(-)(-)	(-)(-)(-)	(+)	(+)

(González, 2014)

Anexo I. Identificación de Genes Virulencia y Genes Patogenicidad.

Identificación	Nomenclatura	Gen PLD	Gen RPOB	pen 16s RN	Gen Hsp60	Fag A	Fag B	Fag C	Fag D
REF 1	1	+	+	+		+	+	+	+
668478(2-4)	2	+	+	(-)		+	+	+	+
.9-19.	3	+	+	+		+	+	+	+
.031.	4	+	+	+		+	+	+	+
.045.	5	+	+	+		+	+	+	+
.039.	6	+	+	+		+	+	+	+
.002.	7	+	+	(-)		+	+	+	+
51AA	8	+	+	+		+	+	+	+
.005.	10	+	+	+		+	+	+	+
.9-15.	11	+	+	+		+	+	+	+
728917	12	+	+	(-)		+	+	+	+
.023B.	13	+	+	(-)		+	+	+	+
.044.	14	+	+	+		+	+	+	+
558122 (2-6)	15	+	+	+		+	+	+	+
.8-3.	16	+	+	+		+	+	+	+
((9-12))	17	+	+	(-)		+	+	+	+
3579	18	+	+	+		+	+	+	+
632935	19	+	+	+		+	+	+	+
.033b.	20	+	+	+		+	+	+	+
.024.	21	+	+	(-)		+	+	+	+
52 (4-4)	22	+	+	(-)		+	+	+	+
3582	23	+	+	+		+	+	+	+
59 1-6	24	+	+	+		+	+	+	+
.5-8.	25	+	+	+		+	+	+	+
.4-3.	26	+	+	+		+	+	+	+
9575R	27	+	+	+		+	+	+	+
.027.	28	+	+	+		+	+	+	+
3612PK	29	+	+	+		+	+	+	+
651793	30	+	+	+		+	+	+	+
.6-4.	31	+	+	+		+	+	+	+
.0016DR.	32	+	+	+		+	+	+	+
H14X	33	+	+	+		+	+	+	+
734503	34	+	+	+		+	+	+	+
.026.	35	+	+	+		+	+	+	+
.030.	36	+	+	+		+	+	+	+
.019.	37	+	+	+		+	+	+	+
.006.	38	+	+	+		+	+	+	+
585790	39	+	+	+		+	+	+	+
694986PK	40	+	+	+		+	+	+	+
.4-2. 2LJ	41	+	+	+		+	+	+	+
5601PK	42	+	+	+		+	+	+	+
.4-5-2L-J.	43	+	+	+		+	+	+	+
694978	44	+	+	+		+	+	+	+
13AA	45	+	+	+		+	+	+	+
701127	46	+	+	(-)		+	+	+	+
728930	47	+	+	+		+	+	+	+
1322PK	48	+	+	+		+	+	+	+
691331PK	49	+	+	+		+	+	+	+
.047.	50	+	+	+		+	+	+	+
.028.	51	(-)	+	(-)		(-)	(-)	(-)	(-)
3552	52	+	+	+		+	+	+	+
632835	53	+	+	+		+	+	+	+
.6-18.	54	+	+	+		+	+	+	+
694977	55	+	+	+		+	+	+	+
728905	56	+	+	+		+	+	+	+
3540	57	+	+	+		+	(-)	+	+
1-2-2LJ	58	+	+	+		+	+	+	+
61 61 26	59	+	+	+		+	+	+	+
69 4992	60	+	+	(-)		+	+	+	+

Anexo J. Gen virulencia Fag B. Aislado 3540 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

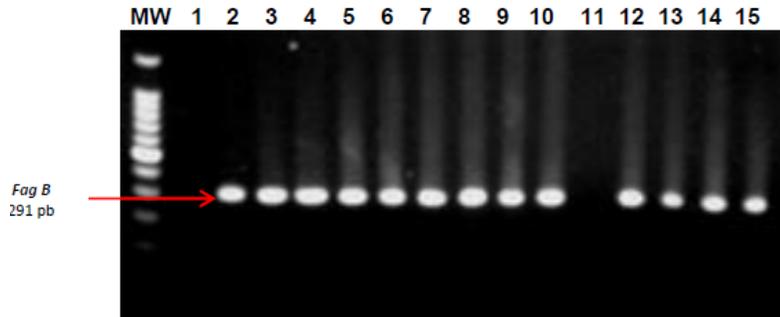


Figura 10 PCR sencillo. Gen de virulencia Fag B. Gel agarosa 2 %.
(MW) Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). **(Línea 1)** muestra blanco. **(Línea 2-15)** Aislados de *C. pseudotuberculosis*. **(Línea 11)** aislado 3540 que no amplifica dicho gen.

(Hernández, 2015)