UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD MEDICINA VETERINARIA
E.A.P. DE VETERINARIA

Evaluación de la potencia de una vacuna contra Corynebacterium Pseudotuberculosis en ratones albinos.

TESIS Para optar el título profesional de MEDICO VETERINARIO

AUTOR
Giuliana Medrano Gallardo

LIMA – PERÚ 2002

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)

Facultad de Medicina Veterinaria

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral:

N.º 077-EAPMV/FMV-2002.

PRESIDENTE : .....
DRA. SONIA CALLE ESPINOZA

MIEMBROS : .....
DR. ARNALDO ALVARADO SÁNCHEZ

: .....
DR. ALBERTO MANCHEGO SAYÁN

: .....
DRA. NIEVES SANDOVAL CHAUPE

San Borja, 11 de Noviembre de 2002

Vº B.

.....
DR. JOSÉ A. BUSTAMANTE LAVERDE
Director de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

ggv.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADEMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **Lunes 11 de Noviembre de 2002**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **Nº077-EAPMV/FMV-2002**, integrado por los siguientes profesores:

DRA. SONIA CALLE ESPINOZA,	Presidente del Jurado
DR. ARNALDO ALVARADO SÁNCHEZ,	Director de la Tesis
DR. ALBERTO MANCHEGO SAYÁN,	Miembro del Jurado
DRA. NIEVES SANDOVAL CHAUPE,	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **MEDRANO GALLARDO, GIULIANA**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"EVALUACIÓN DE LA POTENCIA DE UNA VACUNA CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis* EN RATONES ALBINOS"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Director de Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Sonia Calle Espinoza, Blga., Prof. Asociado

Arnaldo Alvarado Sánchez. Bach.; MV. Prof. Asociado

Alberto Manchego Sayán. Bach.; MV.; Prof. Auxiliar

Nieves Sandoval Chaupe. MSc ; Prof. Auxiliar

GGV

Gracias a:

Dios, por mantener encendido en mi un deseo constante de superación que no me deja en paz.

A mis padres: Nelson y Linda, por su eterno amor y comprensión, pues sin su apoyo no lograría alcanzar mis metas.

A mi hermana: Elizabeth, por apoyarme en mis decisiones y para que se realicen todos sus sueños.

Al Doctor Hung, por su enseñanza y constante apoyo para la culminación de mi tesis y mi más grande admiración por sus éxitos logrados.

A los Doctores:

Arnaldo Alvarado
Olga Lee
Sonia Calle

A mis amigos de veterinaria

CONTENIDO

I INTRODUCCIÓN..... 1

II REVISIÓN DE LITERATURA..... 3

2.1 Características biológicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*..... 3

2.2 Resistencia a los agentes físicos y químicos..... 4

2.3 Características de cultivo e identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis*..... 4

2.3.1 Aislamiento..... 4

2.3.2 Características de cultivo..... 4

2.4 Técnicas moleculares..... 6

2.5 Genética..... 6

2.6 Modelos experimentales..... 6

2.7 Enfermedades causadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*..... 7

2.8 Factores de virulencia..... 8

2.8.1 La superficie lipídica de la pared celular..... 8

2.8.2 La producción de exotoxina fosfolipasa termolábil, Fosfolipasa D (PLD)..... 8

2.9 Aspectos de resistencia e inmunidad..... 9

2.10 Tratamiento..... 11

2.11 Control..... 12

2.13 *Corynebacterium pseudotuberculosis* en el Perú..... 12

III MATERIALES Y MÉTODOS..... 13

3.1 Desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección

de *Corynebacterium pseudotuberculosis*..... 13
3.1.1 Extracción del ADN de *C. pseudotuberculosis*..... 13
3.1.2 Protocolo PCR..... 14
3.1.3 Electroforesis..... 14
3.2 Extracción de proteínas de *C. pseudotuberculosis*..... 14
3.2.1 Condiciones de cultivo..... 15
3.2.2 Precipitación de proteínas..... 15
3.3 Demostración in vitro de la inhibición de la hemólisis de *Staphylococcus aureus* inducida por la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* mediante el Test de Camp..... 16
3.4 Preparación de la vacuna a partir de la exotoxina y preparación de la dosis infectante..... 16
3.4.1 Preparación de la vacuna..... 16
3.4.2 Preparación de la dosis infectante de *C. pseudotuberculosis*..... 17
3.5 Evaluación de la respuesta inmune..... 17
3.5.1 Tamaño muestral..... 18
3.5.2 Vacunación de los ratones..... 18
3.5.3 Infección experimental..... 18
3.5.4 Análisis de los resultados..... 19

IV RESULTADOS..... 21

V DISCUSIÓN..... 27

VI CONCLUSIONES..... 32

VII LITERATURA CITADA..... 34

VIII APÉNDICE..... 38

CUADROS

Cuadro 1. Variables en la ecuación

Cuadro 2. Número de lesiones en ratones después de la exposición experimental con *Corynebacterium pseudotuberculosis.*

FIGURAS

Figura 1. Gram de *C. pseudotuberculosis* con apariencia del alfabeto chino.

Figura 2. Colonias color crema de *C. pseudotuberculosis* en agar sangre.

Figura 3. Esquema del experimento: vacunación e infección.

Figura 4. PCR de *Corynebacterium pseudotuberculosis.* (1) Marcador, (2-9) PCR de muestras positivas, (10)C-, (11-12) extracción de ADN.

Figura 5. Curva de Kaplan Meyer. Análisis de la protección de la vacuna en el grupo "vacunado" y en el grupo "control".

Figura 6. Ratón del grupo control con absceso grande en riñon.

Figura 7. Hígado de ratón del grupo control con presencia de múltiples abscesos causados por *C. pseudotuberculosis.*

APÉNDICE

Figura 1. Presencia de beta-hemólisis de la sangre provocada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Figura 2. Animales criados individualmente y en las mismas condiciones de manejo.

Figura 3. Absceso subcutáneo visible externamente (ratón del grupo control).

Figura 4. Absceso grande subcutáneo en ratón del grupo control.

Figura 5. Abscesos múltiples en el hígado y riñón (ratón del grupo control).

Figura 6. Absceso grande en zona de órganos reproductivos.

RESUMEN

La linfadenitis granulomatosa es una enfermedad de significancia económica en alpacas, la cual es causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, una bacteria gram positiva cuyo principal factor de virulencia es la exotoxina que es una fosfolipasa D. El objetivo del presente trabajo fue probar la potencia de una vacuna elaborada a partir de precipitado proteico de *C. pseudotuberculosis*, conteniendo la exotoxina, en un grupo de 20 ratones (grupo vacunados) quienes recibieron la vacuna y el inóculo con *C. pseudotuberculosis* y compararlos con otro grupo de 20 ratones (grupo control) quienes recibieron placebo y el inóculo con *C. pseudotuberculosis*. La inmunización del grupo vacunado con 16µg del precipitado proteico de *C. pseudotuberculosis* indujo protección después de la inoculación intraperitoneal con 10^4 UFC de *C. pseudotuberculosis*. La vacuna disminuyó los efectos tóxicos del *C. pseudotuberculosis*, lo cual se observó con la disminución del número y tamaño de abscesos de los animales del grupo vacunado (40%) comparado con las lesiones severas y generalizadas encontradas en los animales del grupo control (95%) que no fueron vacunados. Como parte de la metodología se desarrollo la técnica de PCR para la detección de *C. pseudotuberculosis* en los animales con presencia de abscesos, en todos ellos salió positivo lo cual fue evidenciado con las bandas de DNA de 815bp demostrándose así a *C. pseudotuberculosis* como agente causal de la infección.

Palabras clave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, exotoxina, ratones, alpacas, PCR.

SUMMARY

The granulomatous lymphadenitis is an economically important disease in alpacas. This disease is caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, which is a gram positive bacterium which has an exotoxin (Phospholipase D), as its main virulence factor. The object of this Thesis was to test the potency of a vaccine, in a group of mice and compared with another group of mice which was the control group. The vaccine was prepared with protein extracts from *C. pseudotuberculosis*, which contained the exotoxin. The immunization of the group which was given the vaccine containing 16µg of protein extract confered protection after challenge intraperitoneally with 10^4UFC *C. pseudotuberculosis*. The vaccine aminorated the toxic effects of *C. pseudotuberculosis*, which was evidenced by the decrease of number and size of the abscess in the vaccinated group (40%); in contrast with the severe and systemic damages found in the control animals (95%). Furthermore, a PCR (polymerase chain reaction) methodology was set up in order to detect *C. pseudotuberculosis* in the experimental animal which showed abscess. All animals with abscess were positive, showing a band of 815bp, indicating that *C. pseudotuberculosis* was the pathogen agent causing the infections in mice.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, exotoxin, mice, alpacas, PCR.

I. INTRODUCCIÓN

La linfadenitis granulomatosa es una enfermedad infectocontagiosa de las alpacas, de curso generalmente crónico, enzoótica, causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* y caracterizada por la formación de abscesos en los nódulos linfáticos y órganos internos. En estudios microbiológicos efectuados en el Perú, se ha aislado el *C. pseudotuberculosis* de abscesos en ovinos (Mattos, 1962) y alpacas (Villena, 1985). En los últimos años, se ha observado un incremento de casos de alpacas con presencia de abscesos en la zona de la Raya-Cuzco. Se cree que la introducción de ovinos infectados con dicha bacteria en rebaños de alpacas, originó la infección en el camélido sudamericano. Esta enfermedad ha venido ocasionando considerables pérdidas económicas en el Perú, principalmente debido a la condenación de las carcasas por la formación de abscesos, disminución en la producción de la fibra, disminución en el peso y trastornos reproductivos; dificultando además la exportación de las alpacas; motivos por los cuales se hace necesario controlar y prevenir esta enfermedad (Braga, 1993).

El *C. pseudotuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa, cuyo principal factor de virulencia es una exotoxina, que es una Fosfolipasa D producida por la membrana celular de la bacteria, la cual es capaz de promover la diseminación bacterial por incremento de la permeabilidad vascular en cobayos y ratones (Hodgson, 1999). La vacunación empleando la exotoxina

como antígeno ha demostrado ser de gran utilidad al prevenir la infección inicial de la bacteria en ovinos (Eggleton, 1991).

El propósito del presente trabajo es elaborar una vacuna basada en la exotoxina Fosfolipasa D obtenida de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y demostrar, mediante vacunación e infección en ratones, la potencia de la vacuna. Los resultados de este experimento serán útiles para futuros trabajos orientados hacia la búsqueda de lograr la prevención y el control sanitario de la linfadenitis granulomatosa en alpacas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

El *Corynebacterium pseudotuberculosis*, género *Corynebacterium,* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y son parte del grupo CMN (*Corynebacteria, Mycobacteria* y *Nocardia*), las cuales se caracterizan por la presencia de ácido micólico en su pared celular. El *C. pseudotuberculosis* es un bacilo delgado muy pleomórfico, cocoide grampositivo, que no produce esporas, no encapsulado, inmóvil, no acidorresistente, de una longitud variable entre 1 y 3 µm, y 0.5 a 0.6 µm de diámetro. El género *Corynebacterium* está restringido a bacterias que contienen ácido mesodiaminopimélico en su pared celular, así como polímeros de arabino-galactan y cadenas cortas de 22 a 36 carbones de ácido micólico. Contienen además un ADN compuestos con un 51 - 56% de guanina y citosina. Cuando crecen en un medio sub-óptimo los gérmenes suelen tener forma de maza, y a veces puntiaguda; tienden a presentarse en acúmulos o estacadas dispuestas en forma angular. Cuando se tiñen con colorante azul alcalino de Loeffler o con azul de toluidina, los gránulos de polifosfatos polimerizados se colorean metacromáticamente, con un halo rojizo. Esto crea una imagen característica de rosario (Myrvick, 1991).

Como las corinebacterias, las micobacterias y las nocardias guardan estrecha relación, muchos de sus componentes estructurales son similares. También producen factores citotóxicos medulares similares. El *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* y *C. diphteriae*, se distinguen de las otras especies del género por la presencia de ureasa y Fosfolipasa D (PLD) y por la ausencia de pyranzinamidasa (Mirvick, 1991 y Muckle, 1982)

2.2 RESISTENCIA A LOS AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS

El *Corynebacterium*, por su resistencia a la mayor parte de agentes físicos y químicos, está en una situación "promedio". Se destruye fácilmente con desinfectantes comunes y por calor. El organismo resiste mucho la desecación y puede seguir con vida e infectante durante días o semanas en el polvo (Myrvick, 1991).

2.3 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *C. PSEDOTUBERCULOSIS*

2.3.1 Aislamiento:

Para el aislamiento de *C. pseudotuberculosis*, el material es sembrado en agar sangre e incubado aeróbicamente a 37°C. Después de la inoculación en placas, es transferido a tubos con medio semisólido infusión cerebro corazón, el cual es incubado a 37°C por un tiempo de 24-48h (Carter and Cole, 1990).

2.3.2 Características de cultivo:

Las diferencias morfológicas entre las diferentes especies no son significativas. A la tinción Gram (Fig. 1) de las colonias revela bacilos

pequeños, pleomórficos, gram positivos que se pueden formar en empalizadas y con apariencia del "alfabeto chino" (Carter and Cole, 1990).



Fig. 1 *C. pseudotuberculosis* con apariencia del "alfabeto chino"

En placa, el crecimiento es escaso inicialmente. Colonias pequeñas y translúcidas crecen en 3-4 días tornándose de crema a un color naranja, volviéndose opaco, seco y desmenuzable (Fig. 2), pudiendo producir beta-hemólisis. En caldo, es producido un sedimento grosero y granular (Carter and Cole, 1990).

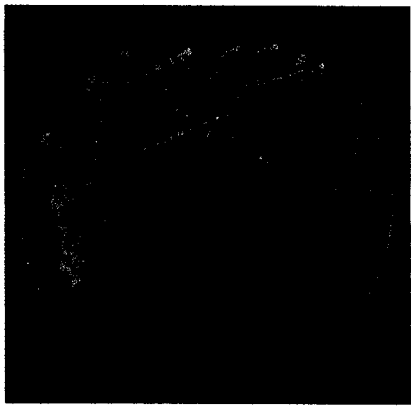

Fig. 2 Colonias color crema de *C. pseudotuberculosis* en agar sangre

2.4 TÉCNICAS MOLECULARES

En un reciente estudio se ha logrado la identificación de *C. pseudotuberculosis* aislados de ovejas y cabras mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), en el cual se resalta las ventajas de dicha técnica como una alternativa en el diagnóstico de la linfadenitis caseosa frente a los métodos convencionales debido a sus ventajas de gran especificidad y rapidez (Cetinkaya *et al*, 2002). Por otro lado, todavía no se ha aplicado esta técnica en el diagnóstico de la linfadenitis granulomatosa en alpacas.

2.5 GENÉTICA

La expresión del gen de *C. pseudotuberculosis* para la producción de PLD (gen pld) en *Escherichia.coli*, ha sido estudiada mediante análisis secuencial de ADN. Dicho análisis revela un cuadro de lectura abierto capaz de codificar una proteína con actividad de esfingomielinasa con 31kd de peso molecular (Carne *et al*, 1956).

2.6 MODELOS EXPERIMENTALES

En general, la enfermedad ha sido reproducida en ovinos, caprinos, conejillos de indias, conejos y ratones principalmente (Brogden *et al*, 1984), siendo estos últimos considerados un buen modelo experimental por que asemeja la infección en ovinos.

Los ratones son relativamente resistentes a la infección y como en ovinos, son capaces de contener la infección de *C. pseudotuberculosis* (Jolly,

1965a). Además, los fagocitos de los murinos interactúan con *C. pseudotuberculosis* de un modo similar a los fagocitos de los ovinos (Hard, 1972).

Estudios indican que la utilización de la vía endovenosa no refleja la fase invasiva de la infección, en la cual la bacteria necesita multiplicarse primero en nódulos linfáticos adyacentes, para luego infectar otros nódulos linfáticos u órganos y desarrollar la exotoxina. En caprinos, la aplicación vía intradermal de una dosis de 10^6 UFC/0.5 ml de una cepa de *C. pseudotuberculosis* aislada en cabras indujo la formación de abscesos en linfonódulos y pulmones. Por otro lado, la dosis de 10^6 UFC/0.25 ml de otra cepa aislada en equinos sólo produjo abscesos en el sitio de inoculación y linfonódulos regionales. En ratones se ha usado dosis de $7.2x10^4$UFC de *C. pseudotuberculosis* vía endovenosa al evaluar efectos de adjuvantes en una vacuna (Brogden *et al*, 1985).

2.7 ENFERMEDADES CAUSADAS POR *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

El *C. pseudotuberculosis* ha sido aislado en ovinos, cabras, caballos, vacas, venados, camellos, cerdos, alpacas, llamas, ratones y el hombre (Benham *et al*, 1962 y Batey *et al*, 1968).

En ovinos causa la linfadenitis caseosa, una enfermedad de amplia distribución mundial. El *C. pseudotuberculosis* produce la linfangitis ulcerosa, enfermedad poco contagiosa de equinos y bovinos caracterizada por linfangitis en la parte inferior de las extremidades. El *C. pseudotuberculosis* es también el causante del acné contagioso de los equinos caracterizada por la aparición de pústulas en la piel. En cabras la enfermedad ha obtenido mayor significancia,

conforme la producción de esta especie se ha intensificado, pudiendo ser más severa que en ovinos (Ashfaq and Campbell, 1979).

En alpacas y llamas la enfermedad se denomina linfadenitis granulomatosa y se ha encontrado abscesos localizados en ganglios linfáticos, glándula mamaria, hígado y con menor frecuencia en pulmones (Braga, 1994).

2.8 FACTORES DE VIRULENCIA (Batey, 1986)

La patogénesis comienza cuando el organismo ingresa al hospedero a través de heridas en la piel, multiplicándose y son fagocitados. Intracelularmente, la supervivencia en fagocitos es esencial para diseminarse y eventualmente formar abscesos. Este mecanismo es mediado por los dos principales factores de virulencia: La superficie lipídica de la pared celular y la producción de exotoxina: Fosfolipasa D .

2.8.1 La superficie lipídica de la pared celular.

Permite al organismo resistir la digestión por enzimas celulares y persistir como un parásito intracelular facultativo dentro del fagocito. El lípido es también citotóxico e induce caseificación dando al organismo un potencial patogénico. Los daños son localizados y resulta en la formación de abscesos.

2.8.2 La producción de exotoxina: Fosfolipasa D (PLD)

La PLD, producida por *C. pseudotuberculosis*, tiene un significativo potencial bioactivo. La producción de PLD en tempranas fases de infección tiene profundos efectos en la supervivencia y multiplicación del

organismo en el hospedero. Esto puede ser debido a los efectos en células fagocíticas (inhibición de la quimiotaxis, degranulación y letalidad en neutrófilos) u otros efectos.

La exotoxina PLD, funciona como un factor de permeabilidad actuando en los vasos sanguíneos y linfáticos locales. El resultante filtrado del plasma incrementa la circulación extravascular del fluido y por consiguiente la probabilidad de diseminar la infección, vía linfática, hacia los nódulos linfáticos tanto locales como regionales. Además la exotoxina actúa como una hemolisina parcial teniendo una limitada acción necrótica dentro de las lesiones y contribuye a la degradación de las membranas de los eritrocitos. El principal efecto de la fosfolipasa se relaciona al establecimiento de la infección y posibles efectos locales.

Por otro lado, la exotoxina actúa como un factor inhibitorio de la beta-hemólisis del *Staphylococcus*, causa dermonecrosis e incluso letalidad. Algunos estudios en ratones demostraron que la máxima actividad letal está asociada con la actividad dermonecrótica e inhibitoria de la beta-hemólisis.

2.9 ASPECTOS DE RESISTENCIA E INMUNIDAD

Jolly (1965b) a reportado inmunidad a la reinfección con ratones convalecientes mostrando pequeñas lesiones post infección y con capacidad de limitar la multiplicación de *C. pseudotuberculosis*. Hard (1969) también demostró resistencia en la cavidad peritoneal de ratones post-inmunización con cepas atenuadas. Posteriormente se a demostrado que ratones con previa infección en la piel son resistentes a la infección metastásica del bazo después del desafío intraperitoneal.

La inmunidad frente a la reinfección a sido demostrada en ovejas pero con desarrollo de lesiones secundarias. La inmunidad frente a *C. pseudotuberculosis* parece ser compleja y a sido atribuída tanto a mecanismos humorales como mediadas por células. Las evidencias de inmunidad mediada por células incluye el surgimiento de macrófagos activados durante la infección o reinfección (Jolly, 1965b) y la transferencia de inmunidad a través de células peritoneales (Hard, 1970).

Una vacuna toxoide comercial fue producido en Australia en 1983. El modo de acción consiste en la neutralización de la exotoxina en la diseminación de organismos del sitio primario de infección. Se ha demostrado que la vacuna tiene considerable efecto protectivo medido con la reducción de la prevalencia y el número de lesiones tanto en ovejas como en cabras. La reacción del hospedero puede ser por la presencia de cualquier antígeno bacterial pero algunos componentes de *C. pseudotuberculosis* pueden tener efectos muy específicos. Específicamente, exotoxinas simulan una intensa exudación de células polimorfonucleares (Jolly, 1965a) por otro lado, los lípidos externos son marcadamente citotóxicos. Es probable que varios de estos componentes tengan un efecto sumatorio al simular una intensa respuesta del hospedero frente a la infección, aunque ninguno de ellos solos podrían inducir inflamación. Sin embargo, los aspectos cualitativos de la respuesta del hospedero también determina la multiplicación bacterial la cual no es acentuada durante una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (Batey, 1986).

Estas observaciones sugieren un balance dinámico entre la habilidad del hospedero para eliminar el *C. pseudotuberculosis* y la habilidad de la bacteria para utilizar la respuesta del hospedero para facilitar el establecimiento en los tejidos. Sin embargo los eventos celulares probablemente dependen de la localización lo cual puede promover el desarrollo de lesiones. Los órganos reticuloendoteliales como el hígado y linfonódulos implicados con macrófagos

sinusoidales asociados se espera que difieran de infecciones en pulmones y riñones debido al arresto asociado con la invasión de células polimorfonucleares. Es probable que la infección por *C. pseudotuberculosis* involucre un mecanismo de patogénesis único. En resumen, la enfermedad causada por *C. pseudotuberculosis* depende más de los eventos de respuesta celulares que de la virulencia bacterial, en el cual existe una adaptación entre la invasión bacterial y la respuesta del hospedero (Batey, 1986a).

2.10 TRATAMIENTO

No existe una terapia antibiótica efectiva para las infecciones causadas por *C. pseudotuberculosis* por 3 principales razones: Primero, por la baja dosis de antibiótico que puede difundirse por el absceso (no hay irrigación en él). Segundo, demasiado material purulento podría neutralizar cualquier dosis de antibiótico por elevada que sea. Tercero, como la bacteria es intracelular, es difícil que llegue a estar en contacto con el antibiótico.

Por los motivos mencionados, el tratamiento de esta enfermedad debe ser acompañado con métodos de control para prevenir diseminar la bacteria a otros animales, los animales afectados deben ser aislados inmediatamente. Los abscesos deben ser abiertos y drenados diariamente, seguidamente enjuagado con una solución concentrada de yodo povidona; o el absceso entero puede ser extraído con cirugía y debe ser eliminado evitando contaminar el ambiente (Blood, 1976).

2.11 CONTROL

La vacunación parece ser la única opción viable para reducir el número de animales infectados en una infección endémica, el cual debe ir acompañado con un adecuado manejo de los animales tales como la mejora de la higiene y del esquileo, etc., los cuales no erradican la enfermedad pero pueden ayudar a controlarla, aunque no se conoce su repercusión (Blood and Henderson, 1976).

2.12 *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* EN EL PERÚ

En el Perú existen pocos trabajos de investigación sobre *C. pseudotuberculosis.* Así, se ha aislado *C. pseudotuberculosis* en ovinos mediante la inspección en el camal, y en caprinos a través de un estudio de seroprevalencia. En alpacas de la zona Sur del Perú se encontró un 68% de *C. pseudotuberculosis* en los aislamientos realizados de los abscesos de alpacas (Villena, 1985).

Otro estudio realizado durante la época de esquila, se encontró que alpacas y llamas presentaban abscesos superficiales ocasionados por *C. pseudotuberculosis* (Braga, 1993).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Se desarrolló la técnica de PCR para la detección de *C. pseudotuberculosis* con fines de obtener una identificación más precisa de la cepa usada en el experimento. Para tal fin se siguió el siguiente procedimiento:

3.1.1 Extracción del ADN de *C. pseudotuberculosis*

La extracción del ADN se realizó con el kit comercial WIZARD DNA Genomics (Promega, USA). La cepa de *C. pseudotuberculosis* fué tratada con un reactivo de extracción (buffer nuclei lysis), calentada a 80°C por 5 minutos, luego se adicionó un reactivo para la precipitación de proteínas (buffer protein precipitation), luego fue incubada en hielo y después centrifugada. El sobrenadante fué mezclado con isopropanol y el ADN fué lavado con etanol al 70% y rehidratado con reactivo Tris-EDTA.

3.1.2 Protocolo PCR

El PCR fué realizado con un volumen final de 50 µl conteniendo 5µl de PCR buffer 10X, 5 µl de MgCl2 (25mM), 250 µM de cada dNTP, 2 U de *Taq* polymerase (Promega, USA), 1 µM de cada primer y 5 µl de ADN de *C. pseudotuberculosis*. La amplificación fué obtenida con 30 ciclos siguiendo un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos. Cada ciclo consistió en 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos.

La secuencia de los primers son los mismos usados por Cetinkaya *et al* (2002), en donde el primer "forward" fue ACCGCACTTTAGTGTGTGTG (posición 183-203) y el primer "reverse" tuvo la secuencia TCTCTACGCCGATCTTGTAT (posición 1019-999). La especificidad de los primers fue comparado con todas las secuencias conocidas en el Banco de Genes.

3.1.3 Electroforesis

Los productos amplificados fueron detectados con tinción de bromuro de etidio (0.5µg/ml) después de la electroforesis a 100V por 30 minutos en gel de agarosa al 1.5%. Los productos de PCR con un peso molecular de 815pb fueron considerados indicativos de la presencia de *C. pseudotuberculosis.*

3.2 Extracción de proteínas de *C. pseudotuberculosis*:

La exotoxina constituye una parte importante de las proteínas ha extraer. Para la extracción de las proteínas se utilizó una cepa de *C. pseudotuberculosis* aislada de alpaca en el Sur del país e identificada por

su morfología al cultivo y por PCR. Para la extracción de la proteína, se efectuó el siguiente proceso:

3.2.1 Condiciones de cultivo

Mediante una asa de platino se traspasó varias colonias de *C. pseudotuberculosis* del medio sólido (agar sangre de ovino), a un frasco que contenía 1 litro de caldo de cultivo (Caldo Tripticasa Soya) y se cultivó a 37°C durante 60 horas en movimiento constante.

3.2.2 Precipitación de proteínas

Al término de la incubación, el caldo se sometió a refrigeración por 1 día. Posteriormente se realizó la centrifugación a 2,000xg por 10 minutos y se recolectó el sobrenadante. El sobrenadante fué filtrado a través de papel filtro de 150 mm de diámetro, después fue pasado a través de un filtro de 0.22 µm de diámetro durante toda la noche en refrigeración.

A 500 ml de caldo filtrado se adicionó 162g de sulfato de amonio (55%, 324g/Lt) poco a poco, con agitación constante y en refrigeración con el fin de precipitar la proteína. Después se dejó reposar toda la noche. Al día siguiente el caldo precipitado fué centrifugado a 14,000xg/10 minutos y se recolectó el precipitado.

Todo el precipitado proteico recolectado se resuspendió en 10 ml de agua destilada y se sometió a diálisis con 5 cambios de cloruro de sodio al 0.8%, monitoreado con cloruro de bario al 1%. Después se determinó la concentración de proteínas por el método colorimétrico de Bradford obteniéndose 0.024 µg/µl.

Se procedió a concentrar la proteína colocándolo dentro de una bolsa de diálisis y por la parte externa se colocó polietilenglicol, obteniéndose una concentración inicial de 40µg/ratón la cual fué disminuida por ocasionar efectos tóxico- letales en los ratones; finalmente se determinó que la dosis de 16µg/ratón no ocasionaba daños a los animales.

3.3 Demostración in vitro de la inhibición de la hemólisis de *Staphylococcus aureus*, inducida por la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* mediante el Test de CAMP

El Test de CAMP consiste en cortar dos piezas circulares de agar sangre de ovino, de 1 cm de diámetro cada una y a 1 cm de distancia una de la otra. Se sembró una estria de *Staphylococcus aureus* entre los hoyos; después, un hoyo fué llenado con la proteína extraída de *C. pseudotuberculosis* y el otro hoyo con agua destilada estéril, como control. La placa fué incubada a 37°C por 24 h y después a 4°C también por 24 horas. La finalidad de la prueba fué demostrar la inhibición de la actividad de la beta-toxina (Fosfolipasa C) de *Staphylococcus aureus*, provocada por la exotoxina (actividad Fosfolipasa D) de *C. pseudotuberculosis* presente en el precipitado de la proteína.

3.4 Preparación de la vacuna a partir de la exotoxina presente en las proteínas extraídas y preparación de la dosis infectante del *C. pseudotuberculosis.*

3.4.1 Preparación de la vacuna

Para la elaboración de la vacuna se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. La vacuna tuvo una concentración final de 16 µg/ratón de proteína extraída, en el cual está presente la exotoxina, fué precipitado con hidróxido de aluminio al 0.5% e inactivado con formaldehído al 0.5%, alcanzando un volumen final de 200 µl/dosis/ratón.

3.4.2 Preparación de la dosis infectante de *C. pseudotuberculosis*

Se preparó una suspensión, en suero fisiológico estéril, de varias colonias de *C. pseudotuberculosis,* sembrado en placa de agar sangre de ovino y mediante el método de Mc Farland, se hizo varias diluciones en suero fisiológico estéril hasta que se obtuvo una concentración final de 10^4 UFC por dosis de ratón. Posteriormente se realizó la siembra en placa de agar sangre de ovino para confirmar la dosis mediante el conteo de las colonias de *C. pseudotuberculosis.*

3.5 Evaluación de la respuesta inmune (Fig. 3)

Para la vacunación se designó 2 grupos experimentales de ratones albinos de la cepa Balb C, de 20g de peso y de buen estado de salud. Un grupo fué designado como grupo de estudio, los cuales fueron vacunados e infectados; y el otro grupo fué designado como grupo control los cuales recibieron un placebo y fueron infectados con *C. pseudotuberculosis.*

3.5.1 Tamaño Muestral

El tamaño de la muestra se determinó por el: "Tamaño Muestral para Estimar Diferencias entre Porcentajes", según la fórmula:

$$n = \left[\frac{z(a) + z(b)}{p_1 - p_2} \right] . \ (p_1.q_1 + p_2.q_2)$$

De donde:

- z(a): valor de la "t-student" para el nivel de confianza especificado.
- - z(b): valor de la "t-student" para la potencia especificada.
- - p_1: proporción en la población 1.
- - p_2: proporción en la población 2.
- - $p_1.q_1$: varianza de la proporción en la población 1.
- - $p_2.q_2$: varianza de la proporción en la población 2.

El tamaño de la muestra calculada sería de 20 ratones para el grupo de estudio y 20 ratones para el grupo control.

3.5.2 Vacunación de los ratones

La inoculación de la vacuna y del placebo se realizó por vía subcutánea en la parte ventral y al lado izquierdo de la línea media del abdomen de los ratones. Se colocó refuerzo de la vacuna 15 días después de la primera vacunación.

3.5.3 Infección experimental

Después de 15 días del refuerzo, los ratones fueron inoculados con una suspensión de 10^4 UFC de *C. pseudotuberculosis* por vía intraperitoneal.

Después de 46 días de la infección con *C. pseudotuberculosis* , se procedió a hacer la necropsia de todos los animales. Se tomaron muestras de abscesos de los diferentes órganos afectados y se procedió a realizar el PCR y el aislamiento de la bacteria por cultivo a fin de demostrar que el *C. pseudotuberculosis* es el agente causal de la infección (Postulado de Koch).

3.5.4 Análisis de los resultados:

Para los análisis de datos realizados con el paquete estadístico SPSS, se usaron las siguiente pruebas estadísticas:

- Supervivencia y/o el tiempo de aparición de lesiones se caracterizó empleando la curva de Kaplan Meyer.
- Las diferencias entre curvas y el ajuste de variables contundentes se realizó empleando regresiones del peligro proporcional de Cox.

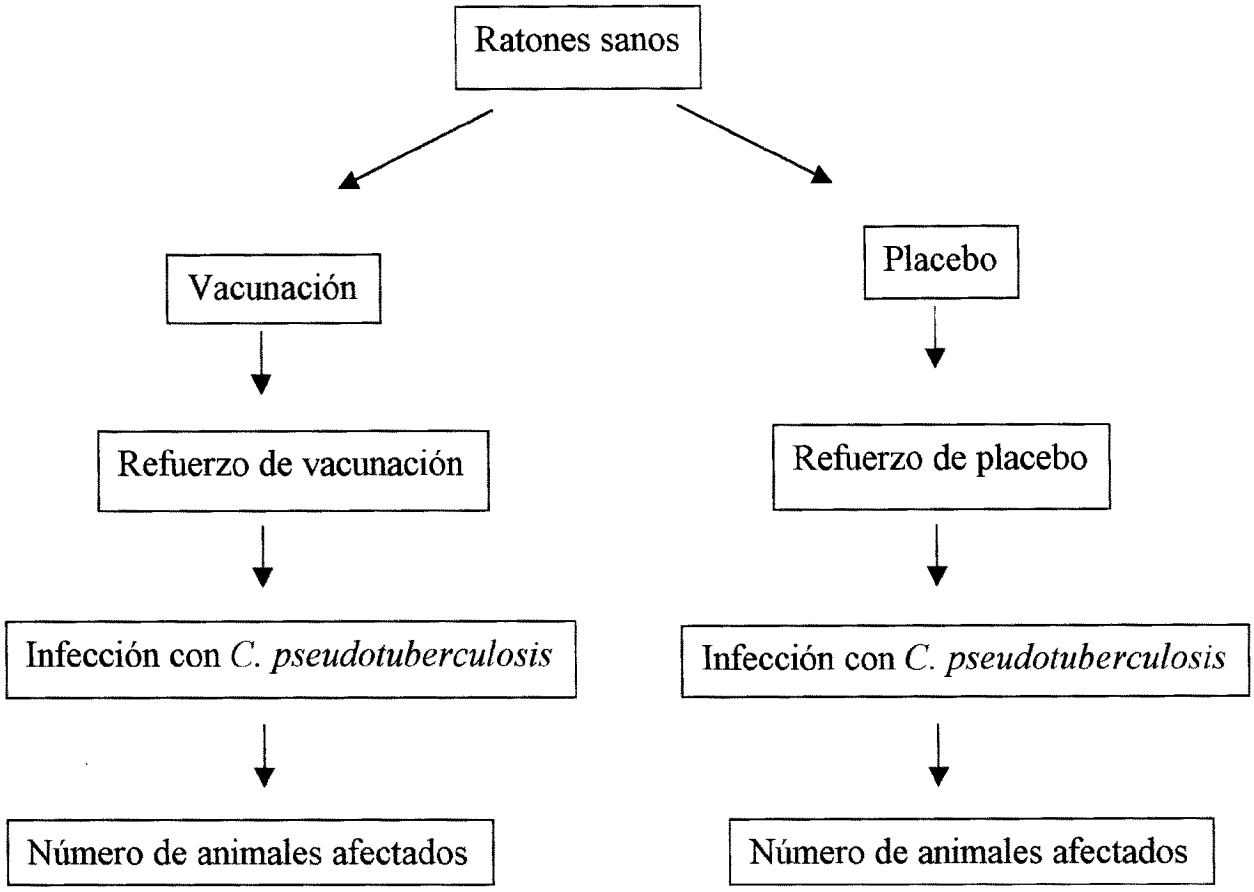

Fig. 3 Esquema del experimento: vacunación e infección

IV. RESULTADOS

Identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Para la identificación de la cepa aislada de alpaca se realizó la tinción Gram donde se observaron bacilos gram positivos irregulares, agrupados de manera irregular asemejando las letras del alfabeto chino.

Se realizó la siembra por agotamiento en agar sangre de ovino, de la cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* usada en la elaboración de la vacuna, en una atmósfera aeróbica, a 37°C, a las 48 horas se obtuvo un crecimiento de colonias pequeñas, de apariencia translúcida, de color blanco mate, de consistencia desmenuzable. Además se observó la presencia de una débil hemólisis las cuales son características típicas de *C. pseudotuberculosis*. A las 72 horas se apreció una hemólisis más intensa.

PCR

Al realizar el PCR de *C. pseudotuberculosis* se observó la banda de DNA de 815bp lo cual es indicativo de la presencia de dicha bacteria (Fig 4).

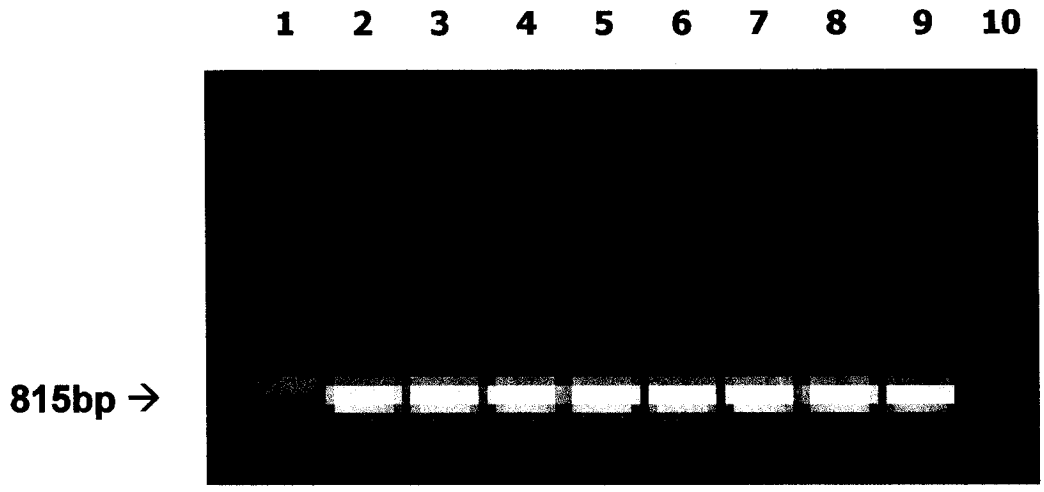

Fig. 4 ***PCR de Corynebacterium pseudotuberculosis***

(1) Marcador, (2)C+, (3-9)PCR, (10) C-

Test de CAMP

Al realizar el Test de CAMP se observó inhibición de la actividad de la beta-toxina (Fosfolipasa C) de *Staphylococcus aureus* debido a la acción de la exotoxina (Fosfolipasa D) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* resultando positivo al Test de CAMP, lo cual es característico de *C. pseudotuberculosis*.

Conteo Bacteriano

Al realizar el conteo en la placa de agar sangre ovino de las bacterias viables utilizadas en la inoculación de los animales control, el resultado confirmó la dosis de 10^4 UFC inoculada a cada ratón en el desafío.

Resultados de la evaluación de la respuesta inmune

En el análisis de los resultados se usó el programa estadístico SPSS. En el análisis de supervivencia empleando la curva de Kaplan Meyer (Fig. 5) se observa que los animales vacunados se encontraron más protegidos toda vez que hasta la fecha de seguimiento (día 46, momento en el que se sacrificaron los animales) el 60% de ellos no presentaron muestras de infección con *C. pseudotuberculosis*. A diferencia del grupo control, en los que al día 46, el 95% de los animales se encontraron infectados.

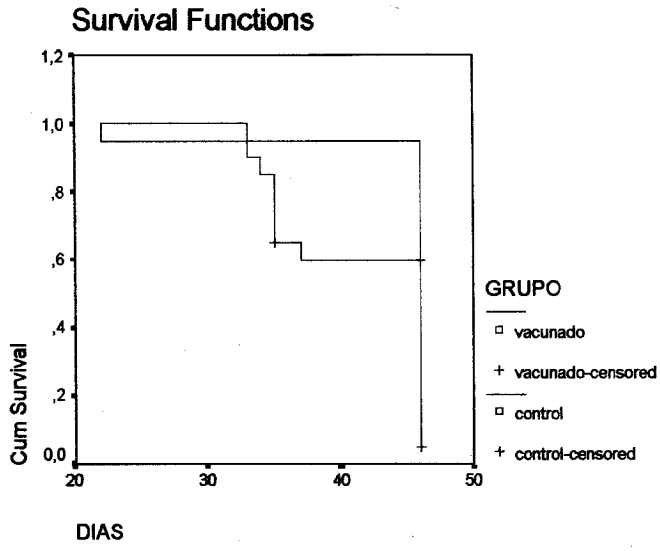

Fig. 5 Curva de Kaplan Meyer. Análisis de la protección de la vacuna en el grupo vacunado y en el grupo control

Cuando se evalúa la condición no vacunado como factor de riesgo se observa que los animales no vacunados presentan 1.65 veces más probabilidad de que se infecten que aquellos que son vacunados. Sin embargo, cuando se analiza los intervalos de confianza, se observa que éstos incluyen al valor 1 por lo que no se puede descartar que éstos tengan la misma proporción de infección que los no vacunados. Por tanto las diferencias observadas entre los grupos (control y vacunado) no son significativas (Cuadro 1).

Variables in the Equation

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
GRUPO	,479	,424	1,277	1	,258	1,615	,703	3,706

Cuadro 1 Variables en la ecuación

Todos los animales infectados del grupo vacunado mostraron una infección leve con abscesos localizados en la zona de inoculación y en número de dos como máximo, a diferencia de los animales infectados del grupo control que mostraron múltiples abscesos en riñón, hígado y a nivel subcutáneo y fueron abscesos de mayor tamaño (Fig. 6 y 7).



Fig. 6 Ratón del grupo control con absceso grande en riñón

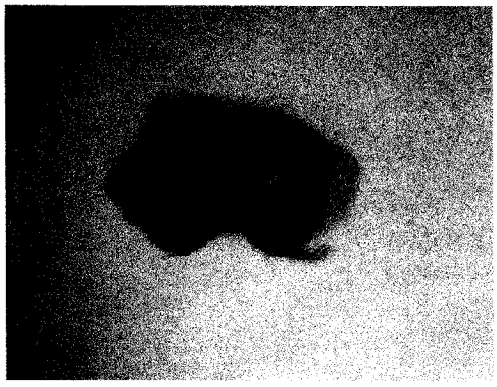

Fig. 7 Hígado de ratón del grupo control con presencia de múltiples abscesos

Un hallazgo importante fué la reducción de un promedio de 6.53 lesiones en controles infectados a 1.5 en animales vacunados infectados como se muestra en el Cuadro 2.

Grupo	Número de animales infectados	Porcentaje infectado	Total de lesiones en animales infectados	Promedio de lesiones por animal infectado
Vacunado	8/20	40%	12	1.5
Control	19/20	95%	124	6.53

Cuadro 2 Número de lesiones en ratones infectados después de la exposición experimental a *Corynebacterium pseudotuberculosis*

V. DISCUSIÓN

El desafío por inoculación intraperitoneal de 10^4UFC/ratón de *C. pseudotuberculosis* en los animales control y en los animales vacunados produjo abscesos en el 95% y 40% respectivamente. Se aisló la bacteria de los abscesos de los animales afectados y se confirmó por PCR la presencia de *C. pseudotuberculosis* como agente etiológico primario de la infección mediante la observación de una banda de DNA de 815bp.

La capacidad protectiva de la vacuna elaborada a base de exotoxina de *C. pseudotuberculosis* se demuestra por la reducción de la incidencia de animales susceptibles a la infección generalizada en el grupo vacunado (40%) cuando lo comparamos con un 95% de los animales no vacunados que desarrollaron abscesos. Según estos resultados, los animales vacunados se encontraron más protegidos ya que hasta la fecha de seguimiento (día 46) el 60% de ellos no presentaron muestras de infección con *C. pseudotuberculosis* a diferencia del grupo control, en los que en la misma fecha, el 95% se encontraban infectados. Sin embargo, cuando se analiza los intervalos de confianza, se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos control y vacunados, uno de los factores que podría haber influido en este resultado es el tamaño de la muestra, es probable que si el tamaño de la muestra hubiera sido más grande, se podría esperar diferencia entre los grupos (los intervalos de confianza serían más pequeños).

Los animales control mostraron un severo daño en los órganos internos y abscesos grandes a nivel subcutáneo, esto puede ser debido a la dosis del inóculo (10^4 UFC/ ratón) tal como se ha observado en otros casos de infecciones experimentales, en donde a mayor número de microorganismos viables se presentaban lesiones más severas, y éstas se localizaban en mayor número de órganos (Ashfaq and Campbell,1980).

Los tejidos y órganos más afectados después de una infección natural en alpacas son los abscesos a nivel subcutáneo (Villena, 1985), órgano reproductor, riñones e hígado (Braga, 1993). Estos hallazgos son similares a lo observado en el presente estudio, en donde en los ratones infectados experimentalmente, la presentación de abscesos purulentos fue más frecuente en el tejido subcutáneo, órgano reproductor, riñones e hígado. Por otro lado no se observaron abscesos en los pulmones ni en los nódulos linfáticos superficiales como sucede en ovinos y caprinos.

El *C. pseudotubeculosis* produce una exotoxina con actividad de Fosfolipasa D (PLD), cuya contribución como factor de virulencia puede ser debida en parte, a que facilita la invasión bacteriana incrementando la permeabilidad vascular. La PLD ataca la esfingomielina de la membrana de los eritrocitos y de las células vasculares endoteliales, dividiéndola en fosfato de ceramida y colina (Jolly, 1965b). La colina libre induce cambios extructurales en la superficie celular y en los constituyentes intercelulares, facilitando la permeabilidad. En un estudio de investigación en ratones realizado por Batey (1986) se demostró que la máxima actividad letal de *C. pseudotuberculosis* está asociada con la actividad dermonecrótica e inhibitoria de la beta-hemólisis. Este efecto dermonecrótico de la exotoxina fue observado en los ratones vacunados en nuestro experimento, en donde la inoculación subcutánea de 40 µg de proteína (incluído exotoxina) indujo la muerte a las 24 horas, con necrosis severa en la zona de inoculación observada en la necropsia. En ese sentido, se

procedió a disminuir la dosis vacunal hasta no observar los efectos letales mencionados. Se determinó finalmente, que la dosis 16 µg de proteína por ratón no producía efectos letales. Una de las posibles causas por la cual la vacuna haya podido inducir necrosis en los ratones puede haber sido por la exotoxina presente en la vacuna, la cual a pesar de haber sido inactivada con formaldehído, haya dejado un porcentaje de exotoxina activa, lo cual trae efectos tóxicos como lo ha descrito Eggleton (1991) en un trabajo en ovinos en el cual observó efectos tóxicos en 7 de 20 ovinos de su grupo de estudio.

Por otro lado, en estudios de investigación realizados por Hodgson *et al* (1992), el gen que codifica la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* fue eliminado por mutagénesis del sitio específico, creando así una cepa *C. pseudotuberculosis* denominada PLD-negativa, la cual no indujo la enfermedad experimental en ovinos, aún a doble dosis infectiva , comparada con la cepa de campo. Esto sugiere que la Fosfolipasa-D es uno de los mayores factores de virulencia.

Cameron and Minaar(1969) ha sugerido que el principal antígeno inmunizante está asociado con la superficie lipídica de pared celular. Posteriormente, en 1971, deja abierta la posibilidad de que la protección puede depender de una compleja configuración de antígenos los cuales incluyen a la toxina. Esto coincide con lo mencionado por Burrell (1978) quien sugirió un efecto protectivo de antitoxinas aunque otros antígenos puedan también estar involucrados. No todos los tipos de moléculas tienen la misma capacidad inmunogénica, las proteínas son las más inmunógenas, seguida de carbohidratos y luego de lípidos. Por tal motivo y a diferencia con lo mencionado por Cameron and Minaar (1969), es posible que la exotoxina, por ser una molécula proteica, tenga una ventaja sobre los lípidos de pared celular, como un buen estimulador de la respuesta inmune. Por otro lado, frente a la sugerencia de Burell (1978) y para demostrar qué componente del extracto proteico es el principal inmunógeno sería conveniente realizar un estudio

experimental con vacunas preparadas con las proteínas extraídas de *C. pseudotuberculosis* y purificarlas, de este modo se podría identificar el o los principales antígenos inmunizantes de *C. pseudotuberculosis.*

La capacidad de *C. pseudotuberculosis* para causar una infección primaria seguida de infección a sitios secundarios (órganos internos) involucra varios mecanismos de resistencia e inmunidad en los ratones, lo cual se opone a los factores de virulencia del organismo. La consecuencia de una infección primaria es el establecimiento de lesiones crónicas de la enfermedad, como se observó en el 95% de los ratones control a diferencia de los animales vacunados en los que se obtuvo sólo un 40% de ratones infectados. Esta reducción en el porcentaje puede deberse a múltiples factores, uno de ellos sería la presencia de anticuerpos circulantes (anti-toxina) al tiempo de exposición con *C. pseudotuberculosis*, lo cual permite la neutralización de la exotoxina secretada por dicha bacteria, inhibiendo la permeabilidad vascular inducida por la exotoxina y reduciendo la habilidad de la bacteria para invadir ganglios linfáticos locales y posteriormente a los órganos internos, hipótesis que sería necesaria demostrar mediante futuros trabajos de investigación.

La consecuencia de los ratones inmunizados y expuestos a la infección con *C. pseudotuberculosis* depende del balance de varios factores, incluyendo factores no específicos del hospedero, competencia inmunológica de cada individuo y del uso de una apropiada vacuna para la inmunización, lo cual termina, ya sea en la eliminación de la infección o en el establecimiento en el hospedero, en este caso hubo una eliminación de la infección del 60% en los ratones vacunados, sin embargo no se puede traspolar estos datos a las alpacas debido a diversos factores del propio hospedero y sobre todo por los pocos conocimientos en la funcionalidad del sistema inmune en alpacas, siendo recomendable realizar el experimento en esta especie.

La presencia de abscesos pequeños y localizados en el grupo vacunado, a diferencia de los animales del grupo control quienes mostraron una infección generalizada, indicaría que la proteína conteniendo la exotoxina de *C. pseudotuberculosis* aplicada como inmunizante ha logrado disminuir el progreso de la enfermedad en los animales que han recibido la vacuna. Así, un indicador de protección contra la infección fue la comparación del número de abscesos en animales vacunados infectados y en animales control (no vacunados) infectados. La reducción fue en cuanto al número de abscesos, de un promedio de 6.53 abscesos en controles infectados a 1.5 en animales vacunados infectados. Esto es importante económicamente ya que el animal, al tener menos abscesos, reduce la probabilidad de rechazo, recorte de órganos, carcasa y depreciación del producto en el camal. Por otro lado, la reducción del número de abscesos en animales vacunado también ofrece una gran reducción como fuente de infección para otros animales, lo cual es crucial para el control de la enfermedad.

La protección otorgada por la vacuna ha sido orientada a neutralizar la exotoxina Fosfolipasa D y disminuir sus efectos tóxicos, los cuales se han hecho evidentes con la reducción en número y tamaño de los abscesos encontrados en los animales vacunados a diferencia de los animales control quienes mostraron una infección mucho más severa y generalizada; resultados similares se reportaron con una vacuna comercial de elaborado en Australia en 1983, en el cual se obtuvo un considerable efecto protectivo medido con la reducción de la prevalencia y el número de lesiones tanto en ovejas como en cabras (Jolly, 1965a). En este sentido, la vacuna elaborada en el presente estudio no impidió la infección pero si la diseminación de *C. pseudotuberculosis* en ratones.

Es importante seguir ensayando vacunas más eficaces contra la enfermedad por *C. pseudotuberculosis* debido a que no existe una terapia antibiótica efectiva para las infecciones causadas por *C. pseudotuberculosis*.

VI. CONCLUSIONES

1. La vacuna otorgó protección contra *C. pseudotuberculosis* al 60% de los animales vacunados . En el grupo control, el 95% de los animales desarrolló abscesos.

2. Los animales no vacunados presentan 1.65 veces más probabilidad de infectarse que aquellos vacunados.

3. No hubo diferencia significativa entre los grupos vacunados y control con respecto a la protección.

4. Hubo disminución en el número y tamaño de las lesiones en los animales del grupo vacunado con respecto al grupo control.

5. La vacuna ha logrado disminuir los efectos tóxicos del *C. pseudotuberculosis* y por tanto ha logrado también evitar la diseminación de la enfermedad.

6. Los ratones son susceptibles a la infección de *C. pseudotuberculosis*, lo cual se demostró con la presencia del 95% de animales infectados del grupo control.

7. La protección otorgada por la vacunación se ha hecho evidente con la reducción de un promedio de 6.53 lesiones en controles infectados a 1.5 en animales vacunados infectados.

VII. LITERATURA CITADA

1. Ashfaq, M.K. and Campbell S.G. 1979. A survey of CLA and its ethiology in goats in the United States. *V M SAC* 74: 1161-1165

2. Ayers, J.L. 1977. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: A review of diagnosis, pathogenesis and immunity. *JAVAM* 171:1251-1254

3. Batey, Y.M., Tonge J.Y., Horsfall, W.R. and Mac Donald I.R. 1968. Human infection with *Corynebacterium ovis. Med J Aust* 2: 540-543

4. Batey, R.G. 1986. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust Vet J* 63: 269-272

5. Benham, C.I., Seaman, A. and Woodline, M.. 1962. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. Vet Bullet 32: 645-657

6. Blood, D.C. and Henderson, J.A. 1976. Medicina Veterinaria. 3a Ed., p 311-312. Interamericana Mc Graw-Hill.

7. Braga, L.W. 1993. Aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en alpacas y llamas adultas. *Rev.Inv.Pec.*IVITA Perú 6, 2: 128-131.

8. Braga, L.W. 1994. Comunicación personal sobre el estudio de investigación : *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in alpacas: pathogenesis and immune response. Final report IFS grant B/2083-1, 17p.

9. Brogden, K.A., Cutlip, R.C. and Lehmkuhl, H.D. 1984. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Am J Vet Res* 45: 1532-1534

10. Brogden, K.A., Cutlip, R.C. and Lehmkuhl,H.D.1985. Immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the effect of adjuvants in mice. *J Com Pathol* 2:167-173

11. Burrell, D.H. 1978. Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis. Res Vet Sci* 24: 269-276

12. Cameron, C.M. and Minaar, J.L. 1969. Immunization of mice against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *J Vet Res* 36: 207-210

13. Cameron, C.M. and Purdom, M.R. 1971. Immunological and chemical characteristics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cell walls and protoplasm. *J Vet Res* 38: 83-92

14. Carne, H.R., Wickman, N. and Kater, J.C. 1956. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis. Nature.* 178: 701-702

15. Carter, G. and Cole, R. 1990. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5a Ed., p620. Academic Press Inc.

16. Cetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R. De Baere, T. and Vaneechoutte, M. 2002. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Veterinary Microbiology 88: 75-83

17. Eggleton, D.G. 1991. Immunization against ovine caseus lymphadenitis: comparasion of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J* 68: 317-319

18. Hard, G.C. 1969. Electron microscopic examination of *Corynebacterium ovis. J Bacteriol* 97: 1480-1485

19. Hard, G.C. 1970. Adoptive transfer of immunity in experimental *Corynebacterium ovis* infection. *J Comp Pathol* 80: 329-334

20. Hard, G.C. 1972. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis.* J *Med Microbiol* 5: 483-491

21. Hodgson, A.L., Krywult, J., Corner, L.A., Rothel, J.S. and Radford, A.J. 1992. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential chessy vaccine and live delivery vehicle. *Infect Imm.* 60: 2900-2905

22. Hodgson, A. 1999. Efficacy of an ovine caseus lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D *Vaccine* 17: 802-808

23. Jolly, R.D. 1965a. Experimental infection on convalescent mice with *Corynebacterium ovis. N Z Vet J* 13: 148-153

24. Jolly, R.D. 1965b. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. *N Z Vet J* 13:141-147

25. Mattos R. 1962. Encuesta en el frigorífico Nacional del Callao. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima 30p.

26. Myrvick, Q.N. 1991. Bacteriología y Micología Médicas. 2ª Ed., p285. Interamericana Mc Graw-Hill.

27. Muckle, C. A. 1982. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Can J Comp Med* 46: 206-208.

28. Songer, J.G., Libby, S.J., Iandolo, J.J. and Cuevas W.A. 1990. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. *Infect Imm.* 58: 131-136.

29. Villena, S. C. 1985. Abscesos en alpacas: aspectos microbiológicos. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima 18p .

VIII. APENDICE

Figura 1. Presencia de beta-hemólisis de la sangre provocada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*

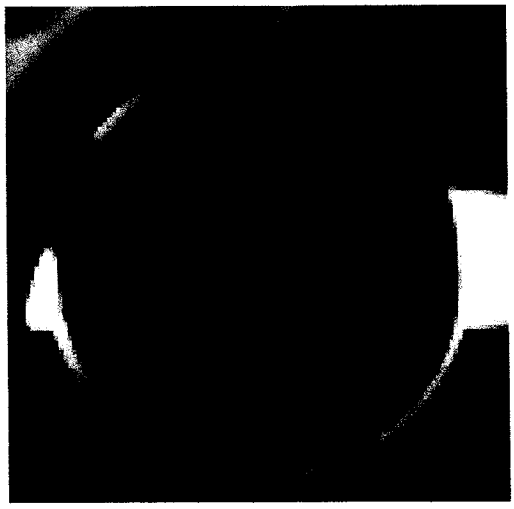

Figura 2. Animales criados individualmente y en las mismas condiciones de manejo.



Figura 3. Absceso subcutáneo visible externamente (ratón del grupo control)

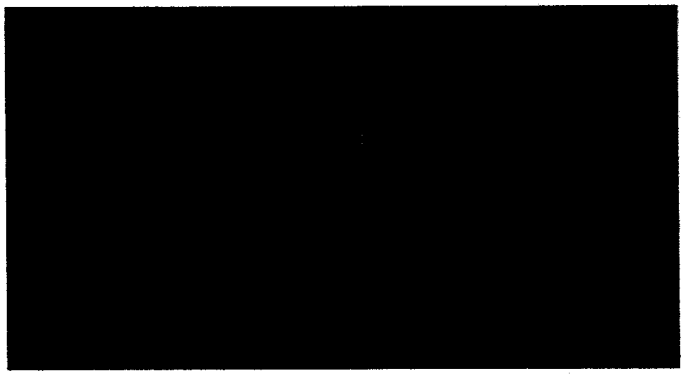

Figura 4. Absceso grande subcutáneo en ratón del grupo control



Figura 5. Abscesos múltiples en el hígado y riñón (ratón del grupo control)



Figura 6. Absceso grande en zona de ganglios reproductivos (ratón del grupo control)

