

Desarrollo de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en carneros vacunados o infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*

JUAN J. SOLANET¹, ROSANA MALENA², SILVIA M. ESTEIN³, SILVIA ESTEVAO BELCHIOR⁴,
FERNANDO A. PAOLICCHI^{2, 5*}

¹Residencia Interna en Salud Animal, Departamento de Producción Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); ²Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Producción Animal, INTA Balcarce; ³Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil; ⁴Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut; ⁵Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina
*Correspondencia. E-mail: fpaolicchi@balcarce.inta.gov.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar un ELISA indirecto desarrollado para medir la respuesta inmune humoral en carneros vacunados contra la linfadenitis caseosa (LC) y/o desafiados con una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* homóloga. Se distribuyeron corderos de 4 meses clínicamente sanos en 4 grupos: grupo 1, corderos vacunados (G1, n = 5); grupo 2, corderos vacunados e inoculados (G2, n = 8); grupo 3, corderos inoculados (G3, n = 2); y grupo 4, control (G4, n = 2). Los animales del G1 y del G2 recibieron dos dosis de una bacterina experimental; los del G2 y del G3 fueron desafiados con una cepa de *C. pseudotuberculosis* cuatro semanas posvacunación. Se estudiaron por ELISA los títulos serológicos durante 7 meses y se efectuaron las necropsias en los grupos G2, G3 y G4. Se tomaron muestras de pulmón y linfonódulos para efectuar estudios bacteriológicos e histopatológicos. La cepa inoculada en los animales del G2 y del G3 reprodujo las lesiones macroscópicas y microscópicas típicas de la LC; ésta fue aislada del sitio de inoculación, de linfonódulos o de pulmón en 7/8 animales del G2 y en 2/2 animales del G3. La prueba de ELISA, con una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%, detectó diferencias significativas entre los serorreactores de los diferentes grupos experimentales y permitió establecer una relación con el tipo de tratamiento aplicado. Se concluye que el ELISA desarrollado puede ser una herramienta útil para identificar animales infectados y con clínica positiva a la LC.

Palabras clave: linfadenitis caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ELISA indirecto, ovinos

ABSTRACT

Development of an ELISA test to detect antibodies in vaccinated sheep or infected *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The aim of this study was to evaluate an indirect specific ELISA developed for the detection of humoral immune response in vaccinated sheep and/or challenged with a *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain. Healthy 4 month-old lambs were distributed into 4 groups: Group 1 immunized (G1, n = 5), Group 2 vaccinated/inoculated (G2, n = 8), Group 3 inoculated (G3, n = 2) and Group 4 control (G4, n = 2). Groups G1 and G2 received two doses of an experimental bacterin. Four weeks postvaccination, G2 and G3 groups were challenged with a *C. pseudotuberculosis* strain. Serological titers were studied by ELISA for 7 months and pathological studies were performed in groups G2, G3 and G4 by taking lung and lymph node samples for bacteriology and histopathology. The inoculated strain in G2 and G3 animals reproduced the macroscopic and microscopic lesions typical of caseous lymphadenitis (CL) and was isolated from the inoculation site, lymph nodes and/or lung in 7/8 animals from G2, and 2/2 animals of G3. The developed ELISA test had sensitivity and specificity of 98% and 100% respectively, detected significant differences between serological reactors of different experimental groups and allowed to establish a relationship with the type of treatment. We conclude that the developed ELISA may be a useful tool to identify infected animals with positive clinical CL.

Keywords: caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, indirect ELISA, sheep

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, las existencias de ganado ovino han disminuido en forma notable en las últimas décadas; se estima que actualmente hay alrededor de 15,3 millones de cabezas. Sin embargo, con el advenimiento de la Ley

Ovina Nacional N° 25 422 se ha incrementado el interés productivo orientado hacia los ovinos de lana fina y de carne (18). Para que ese sector se expanda, es necesario que las majadas presenten una salud productiva óptima y que sean erradicadas las enfermedades que limitan el comercio nacional e internacional.

La linfadenitis caseosa (LC) o pseudotuberculosis ovina es una enfermedad infectocontagiosa ocasionada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, una bacteria que se caracteriza por producir lesiones caseosas-purulentas en los linfonódulos y en otros tejidos, como el pulmón (2, 24). Esta bacteria infecta principalmente a las especies ovina y caprina, aunque puede producir alteraciones en los linfonódulos de otras especies animales y también en el hombre (10). La LC provoca cuantiosas pérdidas en la industria ovina mundial, ocasionadas por la reducción en la ganancia de peso, el menor peso del vellón y la disminución de la eficiencia reproductiva y de la producción de leche y lana, así como por el decomiso de las canales y la depreciación de las pieles. Estos hechos impactan en las exportaciones, pues disminuyen las posibilidades de comercialización y el valor de las reses ovinas (1, 19).

La LC es una enfermedad cosmopolita, ya que está presente en los cinco continentes y en casi todas las zonas geográficas definidas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) (24). En nuestro país se estima que existe una prevalencia cercana al 70% en áreas endémicas; asimismo, se han realizado algunos relevamientos parciales de la situación de LC en estudios de frigorífico (12, 15, 23). La transmisión de esta enfermedad se produce principalmente a través de las heridas provocadas durante la esquila con cuchillas contaminadas con el material purulento de los abscesos (13), aunque existe la posibilidad de infección a través del agua contaminada con el microorganismo en los baños antiparasitarios (25). La LC ha sido reconocida como una enfermedad zoonótica emergente y, aunque las infecciones en seres humanos son raras, pueden presentarse casos de LC adquirida por exposición ocupacional o a través de lesiones cutáneas por contacto con animales enfermos (10, 17, 20).

C. pseudotuberculosis es un cocobacilo gram-positivo, de 1-3 μm largo x 0,5-0,6 μm ancho, que desarrolla en agar sangre dentro de las 48 a 72 h de incubación a 37 °C formando colonias blancas, rodeadas por una tenue β -hemólisis (9, 12). Es un microorganismo intracelular facultativo (11, 12) que pertenece al filo Actinobacteria, orden Actinomycetales, suborden *Corynebacterineae* y a la familia *Corynebacteriaceae*.

Posee varios factores de virulencia, entre ellos se incluyen glucolípidos y ácidos micólicos de la pared celular y las exoenzimas fosfolipasa D y esfingomielinasa.

El análisis bacteriológico de la LC comprende la microscopía y la tinción de Gram y de Ziehl Neelsen y el cultivo de las muestras. La hemólisis sinérgica con *Rhodococcus equi* y la inhibición de la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* (CAMP y CAMP reversa) ponen en evidencia la producción de las exotoxinas de *C. pseudotuberculosis*.

Además de los estudios clínicos, anatomopatológicos y bacteriológicos, existen otros métodos diagnósticos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las pruebas serológicas (7, 14). Diversos autores han aplicado

estas últimas en el diagnóstico de LC en majadas, con resultados auspiciosos (3, 6). Para detectar la infección en ovinos por *C. pseudotuberculosis* mediante pruebas de ELISA se han empleado diferentes componentes antigénicos, tales como extractos de la pared celular y exotoxina purificada (fosfolipasa D) u obtenida de manera recombinante. En general, los métodos serológicos pueden presentar la desventaja de dar resultados falsos positivos por producirse reacciones cruzadas con otros microorganismos o cuando los animales han sido recientemente vacunados (12, 27). En Argentina no hemos registrado datos de relevamientos serológicos o de la aplicación de ELISA en el diagnóstico de LC en ovinos naturalmente infectados o desafiados con *C. pseudotuberculosis*.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar un ELISA indirecto utilizando un antígeno nativo para medir los anticuerpos generados por la infección con *C. pseudotuberculosis*. Para ello se desarrolló un modelo experimental de infección controlada con la cepa homóloga, con el fin de estudiar la cinética de anticuerpos generada por el desafío o por la aplicación de una bacterina. Además, se procesaron por el ELISA indirecto sueros de animales negativos o positivos con lesiones y aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de frigorífico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 17 carneros Corriedale de 4 meses, sanos, provenientes de una majada clínicamente libre de LC de la reserva ganadera N° 8 del INTA Balcarce, provincia de Buenos Aires. Los animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos experimentales de la siguiente manera: grupo 1, vacunado (G1; n = 5), grupo 2, vacunado y desafiado (G2; n = 8), grupo 3, desafiado (G3; n = 2), y grupo 4, control sano (G4; n = 2). Los animales del G1 y G2 recibieron dos dosis de un inmunógeno experimental (bacterina). A las 4 semanas posvacunación, los carneros del G2 y G3 fueron desafiados mediante inoculación en el rodete coronario con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*.

Reactivación de la cepa y prueba de patogenicidad

A) Reactivación de la cepa

La cepa indígena de *C. pseudotuberculosis* fue donada por el Centro Regional de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Pontificia San Juan Bosco (Comodoro Rivadavia, Argentina). Dicha cepa pertenece a la colección del banco de cepas con denominación *C. pseudotuberculosis* cepa 15, tipificada por pruebas bioquímicas, moleculares (PCR) y secuenciación del gen 16S rDNA, con un 99% de homología con secuencias alineadas con las cepas de referencia *C. pseudotuberculosis* CIP102968T y *C. pseudotuberculosis* NCTC 3450 del GenBank. La cepa fue reactivada mediante pasaje por un carnero Corriedale de 3 años, clínicamente sano, con el objetivo de reaislarla y emplearla como cepa desafío.

B) Pruebas de patogenicidad en carnero

Para probar la patogenicidad de la citada cepa una vez reactivada e identificar el sitio más apropiado para la reproducción experimental de la LC, se la inoculó en diferentes sitios en un carnero adulto clínicamente sano, según 3 protocolos de infección experimental: I) en el espacio subcutáneo detrás de la oreja derecha (29), II) en el pliegue inguinal de la pata izquierda por escarificación de la piel (29), y III) en el tejido subcutáneo de la

zona interdigital de la pata derecha (7). Como inóculo se utilizó una suspensión bacteriana en una solución de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2; la concentración se ajustó según trabajos previos (7) utilizando la escala de McFarland. El inóculo se transportó refrigerado y al abrigo de la luz hasta el lugar donde se lo utilizó. Para el protocolo I se aplicó 1 ml del inóculo con una concentración de $7,25 \times 10^8$ UFC/ml. Para el protocolo II se escarificó la piel y se aplicó un hisopo que contenía alrededor de 10 colonias de la cepa tomadas directamente de la placa de cultivo. Por último, para el protocolo III se aplicaron 3 ml del inóculo con una concentración de $7,25 \times 10^8$ UFC/ml. El cálculo final de la concentración bacteriana de los inóculos empleados se efectuó mediante el recuento de microorganismos viables sobre agar Columbia base. A las cuatro semanas de la inoculación se realizó la necropsia del carnero, según el protocolo tradicional empleado en INTA. Se revisaron los órganos y se tomaron muestras de los linfonódulos poplíteo y prefemoral, de pulmón, de hígado y del material purulento formado en el espacio interdigital, para realizar estudios bacteriológicos. De acuerdo con los hallazgos clínicos, patológicos macroscópicos y de aislamiento bacteriano, se seleccionó el tejido subcutáneo de la zona interdigital de la pata derecha como el sitio más adecuado para realizar el desafío experimental, en coincidencia con el utilizado en otros trabajos.

Inmunización de los animales

Los animales de los grupos G1 y G2 fueron inmunizados a fin de conocer los títulos serológicos desarrollados posvacunación, para lo cual se aplicaron dos dosis de 3 ml de una bacterina no comercial, separadas por un intervalo de 4 semanas. La bacterina, compuesta por la cepa 15 de *C. pseudotuberculosis* inactivada con 0,5% de formol tamponado a pH 7,2 y formulada en hidróxido de aluminio, contenía antígeno somático de la citada cepa en una concentración de 10 µg/ml.

Desafío de los animales

A las 8 semanas del inicio del ensayo, los animales de los grupos G2 y G3 fueron desafiados con la cepa 15 de *C. pseudotuberculosis*. El inóculo para el desafío tuvo una concentración de $7,75 \times 10^8$ UFC/ml y fue aplicado en el tejido subcutáneo de la zona interdigital de la pata derecha. A los animales del G4 se les inyectó en el mismo sitio 3 ml de PBS estéril pH 7,2.

Revisación clínica y toma de muestras

Todos los animales fueron revisados desde el comienzo del ensayo y cada 15 días por palpación externa de los linfonódulos preescapulares, poplíteos y prefemorales, así como por inspección del sitio de inoculación, para comprobar lesiones clínicas de LC. Para la determinación de anticuerpos, en el G1 se realizaron sangrías cada 15 días desde el comienzo del ensayo (día 0) hasta los 45 días posvacunación, mientras que en los grupos G2, G3 y G4 se realizaron muestreos adicionales a los 90 días, y luego en 4 oportunidades más hasta los 200 días, momento de finalización del ensayo.

Estudios bacteriológicos y patológicos

Se realizó la necropsia de los animales de los grupos G2, G3 y G4 a las 28 semanas de iniciado el ensayo. Los ovinos del grupo G1 no fueron sometidos a necropsia al momento de finalizar el ensayo; sin embargo, fueron enviados a frigorífico 6 meses después y sus carcasas y órganos fueron inspeccionados a fin de estudiar la presencia de lesiones o reacciones vacunales adversas. Las muestras seleccionadas de los grupos G2, G3 y G4 correspondieron a los linfonódulos poplíteo, prefemoral, preescapular, pulmón, sitio de inoculación y contenido de los abscesos en los animales que presentaron estas lesiones. Las muestras se cultivaron en agar sangre Columbia a 37 °C con atmósfera de 10% de CO₂ durante 48-72 h. Se observó la mor-

fología de las colonias desarrolladas; aquellas blanquecinas y puntiformes (0,5 mm), rodeadas de un halo tenue de β-hemólisis, se seleccionaron para efectuar la tinción de Gram y las siguientes pruebas bioquímicas: ureasa; catalasa; fermentación de glucosa, maltosa y ribosa; lactosa, manitol, sacarosa y xilosa; reducción de nitratos; hidrólisis de gelatina a 37 °C, movilidad; oxidasa y β-galactosidasa. Adicionalmente, se utilizaron las pruebas de hemólisis sinérgica a *Rhodococcus equi* (CAMP) y de inhibición de la β-hemolisina de *Staphylococcus aureus* para detectar la producción de fosfolipasa D (CAMP reversa) y así diferenciar a *C. pseudotuberculosis* de otras especies de *Corynebacterium* (11). Para efectuar los estudios patológicos, las muestras obtenidas de pulmón y linfonódulos se fijaron en formol tamponado al 10%, se incluyeron en parafina, se seccionaron (5 µm), se montaron en portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina y eosina, según las técnicas histológicas de rutina.

Serología por ELISA

El antígeno empleado para sensibilizar las placas de ELISA fue elaborado con la misma cepa que se usó para el desafío. Ésta fue cultivada en 500 ml de caldo tripticasa soya (Difco, EE.UU.) durante 72 h a 37 °C en agitador orbital a 50 rpm. El cultivo se centrifugó a 10 000 g durante 30 min y el *pellet* obtenido se resuspendió en 10 ml de PBS pH 7,2; este paso se repitió 2 veces más. Finalmente se resuspendió el *pellet* en PBS formolado al 0,5% y se disgregó mediante un sonicador semiautomático (Sonic Vibra Cell, Mod VCX130, EE.UU.) utilizando el siguiente protocolo: tiempo, 15 seg; pulsos, 15/05; amplitud, 1 50%; tiempo total, 1 min 30 seg. Luego se determinó la concentración proteica utilizando el kit BCA™ Protein Assay (Pierce, Reino Unido). El antígeno se almacenó en alícuotas de 0,5 ml a -20 °C. Para el desarrollo del ELISA, se adsorbieron placas de 96 pocillos (NUNC Polysorp F-96; BATCH 054480) con 100 µl del antígeno por pocillo, a una concentración de 4 µg/ml. El antígeno se preparó en buffer carbonato/bicarbonato (15 mM de carbonato de sodio y 35 mM de bicarbonato de sodio) pH 9,6; se incubó durante toda la noche a 4 °C. Luego se añadió por duplicado a cada pocillo 100 µl de los sueros en estudio diluidos 1:200. Se utilizaron en cada placa dos sueros controles positivos de animales con lesiones y con cultivo positivo de *C. pseudotuberculosis*, además de un suero control negativo proveniente de un carnero sano sin inocular ni vacunar y negativo al cultivo de Corinebacterias. Se incubaron las placas durante toda la noche a 4 °C y se agregó el conjugado (100 µl) a cada pocillo en una dilución 1:3000 (Proteína G conjugada a peroxidasa, BioRad, USA). Las placas se incubaron luego a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, en cada pocillo se agregó 100 µl de una solución de trabajo de sustrato/cromógeno ABTS (2,2'-azino-di [3-etil-benzotiazolín sulfonato (6)] SIGMA), H₂O₂ 30% y tampón citrato pH 4,5. Las placas se mantuvieron en agitación constante durante 10 minutos hasta el momento de lectura. La lectura de las placas se realizó en un espectrofotómetro (Multiskan, Labsystem, Finlandia) con un filtro de 405 nm, utilizando el programa ELISA 2.20. Para una mejor interpretación de la sensibilidad (Se) y especificidad (Es) del ELISA, los resultados, obtenidos en densidad óptica (DO), se expresaron como porcentaje de positividad (PP) aplicando la siguiente la fórmula:

$$PP = (\text{promedio DO suero problema} / \text{promedio DO control positivo}) \times 100$$

Para calcular la exactitud del ELISA se analizó la Se y la Es mediante el método de la curva ROC utilizando el programa MedCalc (Versión 4.1, 1995). El cálculo de la sensibilidad y la especificidad de la prueba se obtuvo tomando sueros positivos y negativos. El **grupo positivo verdadero** (A) estuvo representado por los sueros de los ovinos desafiados y enfermos de LC, con aislamiento de la cepa de *C. pseudotuberculosis* (G2 y G3) pasados los 30 días posdesafío (A1), y por los 48 sueros de ovinos con LC y aislamiento positivo de *C. pseudotuberculosis*

provenientes de un frigorífico localizado en un área endémica del sur del país (A2). El **grupo negativo verdadero** (B) estuvo integrado por los sueros de los ovinos no inoculados (G4) y por 60 sueros de ovinos jóvenes y 40 de ovinos adultos, todos ellos clínicamente negativos a la LC y provenientes de la reserva n° 8 del INTA, libre de la enfermedad (B1), y por 244 sueros de ovinos sanos, sin aislamiento de *C. pseudotuberculosis*, provenientes de áreas geográficas libres de la enfermedad (B2).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento Mixed de SAS. Para comparar las diferencias medias de los tratamientos entre grupos se aplicó el test de Tuckey y Kramer. Para la expresión de las densidades ópticas del ELISA se utilizó el logaritmo del resultado expresado en porcentaje de positividad (PP) del ELISA indirecto (SAS Institute Inc, SAS online DOC 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute Inc, 2002-2005).

RESULTADOS

Reactivación de la cepa y pruebas de patogenicidad

La cepa 15 de *C. pseudotuberculosis* reaislada se cultivó en agar sangre base Columbia (Oxoid). Al cabo de 72 h se obtuvieron colonias pequeñas de 1 mm de diámetro, de color blanco y consistencia seca, rodeadas de un halo tenue de β -hemólisis. Las colonias correspondían a bacilos gram-positivos pequeños, agrupados en empalizadas, lo que es característico de las corinebacterias. Para la identificación bioquímica se utilizó el sistema API®Coryne estandarizado para la identificación de bacterias corineformes (API®Coryne, bioMérieux® S.A.).

La cepa 15 de *C. pseudotuberculosis* inoculada en el carnero utilizado como preensayo produjo en los sitios de inoculación lesiones caseopurulentas características de LC a partir de la primera semana. Tres semanas posinoculación, el linfonódulo prefemoral derecho aumentó su tamaño 3 veces respecto del homólogo izquierdo,

mientras que a las 4 semanas fue afectado el linfonódulo poplíteo derecho. La necropsia realizada a las 10 semanas posinoculación reveló lesiones macroscópicas típicas de LC en los linfonódulos poplíteo y prefemoral derechos, con aumento del tamaño de hasta 5 veces comparado con el normal. En el sitio de inoculación detrás de la oreja derecha, la lesión inicial se resolvió por encapsulación fibrosa, sin afectar los linfonódulos regionales. De los linfonódulos con lesiones caseopurulentas se obtuvieron cultivos puros de *C. pseudotuberculosis*. La histología reveló linfonódulos reactivos con fibroplasia, que contenían macrófagos, áreas de necrosis y mineralización, neutrófilos, células epitelioides y gigantes multinucleadas, observaciones que corroboran la patogenicidad de la cepa inoculada.

Hallazgos clínico-patológicos posdesafío

Entre la segunda y la tercera semana posinoculación se detectó un incremento del tamaño en el linfonódulo poplíteo derecho en los animales de los grupos G2 y G3, pero no en los animales de los grupos G1 y G4. Se realizaron las necropsias de los animales de los grupos G2, G3 y G4 a las 28 semanas de iniciado el ensayo. En 7 de 8 animales del grupo G2 se detectó un agrandamiento de 2 a 3 veces en los linfonódulos poplíteo y prefemoral derechos, los que contenían material caseopurulento. Ambos carneros del grupo G3 presentaron en el linfonódulo poplíteo derecho abscesos con áreas caseopurulentas; uno de ellos presentó focos caseosos en el hígado. La histología reveló lesiones microscópicas típicas de LC similares a las descritas en otros trabajos (22).

Hallazgos bacteriológicos

En la Tabla 1 se describen los aislamientos bacteriológicos obtenidos de los animales de los grupos G2 y

Tabla 1. Aislamiento de *C. pseudotuberculosis* a partir de tejidos afectados en los animales de los grupos experimentales G2 (vacunado / inoculado), G3 (inoculado) y G4 (control)

Animal n° (grupo)	Linfonódulo poplíteo	Linfonódulo prefemoral	Linfonódulo preescapular	Sitio de inoculación	Pulmón	Abscesos
1 (G2)	+	-	-	-	-	+
3 (G2)	+	-	-	-	-	-
5 (G2)	+	-	+	+	+	-
7 (G2)	-	-	-	-	-	-
9 (G2)	-	-	-	-	-	+
11 (G2)	+	-	-	-	-	+
13 (G2)	+	-	-	-	-	+
15 (G2)	-	-	-	-	+	-
4 (G3)	+	-	-	-	-	-
8 (G3)	+	-	+	+	+	-
14 (G4)	-	-	-	-	-	-

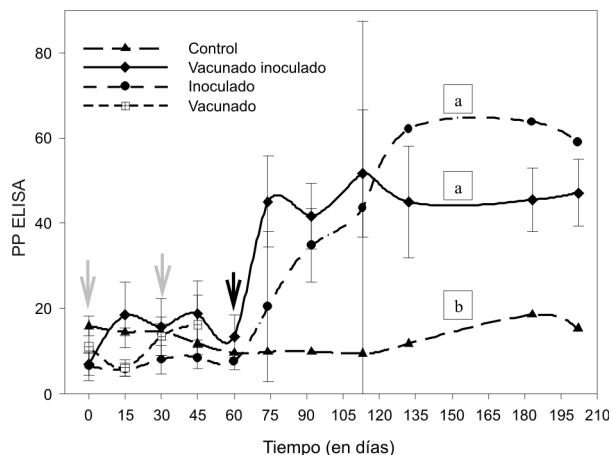


Figura 1. Curvas de los anticuerpos desarrollados por los animales de los distintos grupos experimentales, expresados como porcentaje de positividad (PP) del ELISA. Las flechas claras indican el momento de aplicación de la primera y la segunda dosis de la bacterina en los grupos G1 (vacunado) y G2 (vacunado / inoculado). La flecha oscura indica el momento de la inoculación (G2 y G3). El grupo G4 ofició como control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,001$).

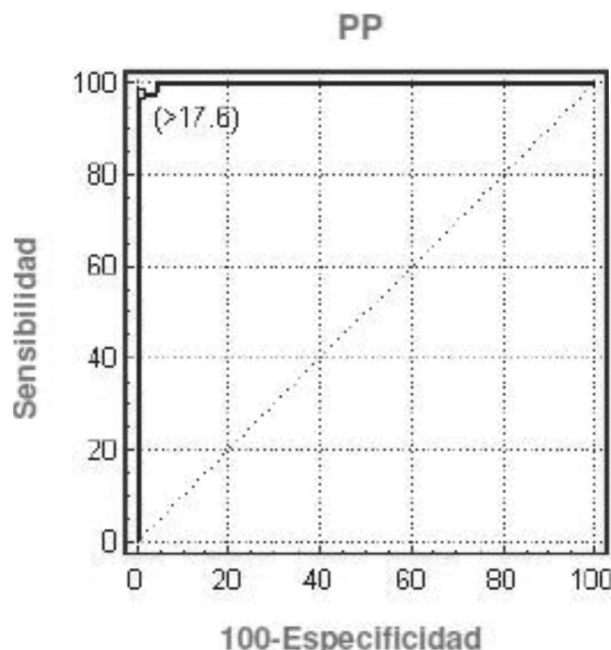


Figura 2. Área bajo la curva ROC del ELISA indirecto. El análisis arroja un valor de 0,999 (error estándar 0,004) que indica la sensibilidad y especificidad de la prueba y el porcentaje de positividad (PP) seleccionado como punto de corte ($\geq 17,6\%$) para diferenciar entre sueros ovinos positivos y negativos.

G3 a partir de las muestras tomadas de los linfonódulos afectados, del sitio de inoculación, del pulmón y de abscesos hallados en el área posterior de la pierna y en el hígado. Además, se detallan los resultados obtenidos en los mismos órganos de las muestras tomadas de un animal del grupo G4.

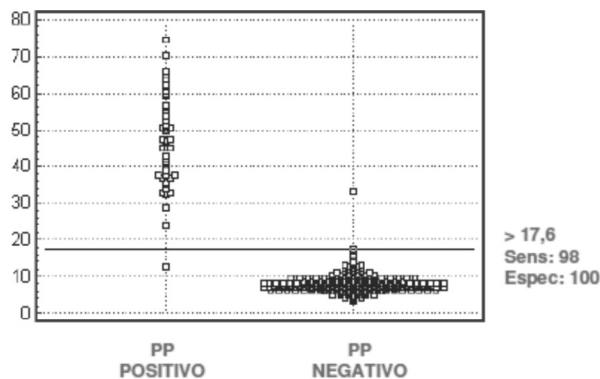


Figura 3. Diagrama de dispersión. Porcentajes de positividad (PP) de los sueros positivos verdaderos y de los negativos utilizando el ELISA indirecto.

Resultados serológicos. En la Figura 1 se muestran los resultados de los títulos de anticuerpos séricos de modo secuencial, cada 15 días, desde el día 0 hasta el día 200 (fin del ensayo) en los diferentes grupos de animales. El análisis mediante el programa Medcalc para la elaboración de la curva ROC y el punto de corte expresado en PP ajustó un valor de 17,6%, con un 98% de Se y un 100% de Es. En la Figura 2 (área bajo la curva ROC) y en la Figura 3 (diagrama de dispersión del PP de los sueros positivos y negativos) se observa la discriminación entre los animales serorreactores al ELISA (desafiados e infectados naturalmente con *C. pseudotuberculosis*) y los animales negativos verdaderos (controles y sanos), teniendo en cuenta la distribución del PP para ambas poblaciones. Los valores promedio del PP en los grupos G2 y G3 mostraron diferencias cuando se los comparó con los promedios en los animales controles negativos, con una media de 46,5% (desvío estándar 12,7) versus una media de 11,1% (desvío estándar 7,1) en la población de ovinos seropositiva y seronegativa, respectivamente. Los grupos G1, G2, G3 y G4 presentaron en promedio resultados por debajo del 17% al inicio del ensayo (día 0); sin embargo, al finalizar el ensayo (día de necropsia), el promedio en el PP de los animales del G2 y del G3 presentó un aumento de al menos 4 veces como resultado de la respuesta inmune humoral generada por el desafío con la cepa 15 de *C. pseudotuberculosis* (Tabla 3 y Figura 1). Se observó que en el grupo G1, dos animales presentaron un PP superior al punto de corte al finalizar el ensayo, quizá como producto residual del estímulo antigénico de la bacterina usada. En los animales del G2 se observó que 7 desarrollaron lesiones compatibles con LC y se aisló *C. pseudotuberculosis* de todos ellos; sin embargo, los 8 animales (100%) del grupo mostraron un PP mayor de 17,6% al final del ensayo. En los dos animales del G3 se encontraron lesiones de LC y aislamiento de *C. pseudotuberculosis*, y ambos presentaron un PP mayor de 17,6% que correspondió al máximo título alcanzado. Uno de los animales del grupo G4 murió durante el ensayo y fue excluido del

Tabla 2. Resumen de los hallazgos clínico-patológicos, bacteriológicos y serológicos en los distintos grupos experimentales al final del ensayo

Grupo (nº de animales) tratamiento	Número (y %) de animales con lesiones		Número (y %) de aislamientos obtenidos	Número de serorreactores por ELISA al final del ensayo	
	Macroscópicas	Microscópicas		PP < 17,6%	PP > 17,6%
G1 (n = 5) vacunado	--	--	--	3	2
G2 (n = 8) vacunado / inoculado	7 (87,5)	7 (87,5)	7 (87,5)	0	8
G3 (n = 2) inoculado	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0	2
G4 (n = 1) control	--	--	--	1	0

Tabla 3. Distribución de los animales de acuerdo con los títulos de los anticuerpos (obtenidos por ELISA indirecto y expresados en PP) al inicio del ensayo y a su finalización (día de la necropsia) en los distintos grupos experimentales

Grupo (tratamiento)	Número de animales al inicio del ensayo con PP		Número de animales al día de la necropsia con PP	
	< 17,6 (promedio PP)	> 17,6 (promedio PP)	< 17,6 (promedio PP)	> 17,6 (promedio PP)
G1 (vacunado)	5 (11,6)	0	3 (11,3)	2 (23,6)
G2 (vacunado/inoculado)	7 (9,91)	1 (20)	0	8 (51,1)
G3 (inoculado)	2 (5,75)	0	0	2 (45,95)
G4 (control)	1 (15,6)	0	1 (16,15)	0

análisis. El PP promedio para los sueros analizados de las poblaciones negativas (244 ovinos sanos, 60 sueros de ovinos jóvenes y 40 de ovinos adultos) fue de 9,73%, mientras que el de las poblaciones positivas (48 sueros de ovinos de frigorífico) fue de 48%.

En la Tabla 2 se detalla el número de animales en los diferentes grupos con lesiones macroscópicas y microscópicas y con aislamientos bacteriológicos. Asimismo, se indican los resultados por ELISA al finalizar el estudio, expresados como PP. En la Tabla 3 se detallan los promedios de PP en cada uno de los grupos de animales, tanto al inicio como al finalizar el ensayo.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo preliminar demuestran la utilidad de un ELISA indirecto, tanto para el diagnóstico de ovinos infectados por el agente causal de la LC como para medir la capacidad inmunogénica de bacterinas elaboradas con cepas de *C. pseudotuberculosis*. En otros países con diferentes niveles de prevalencia de LC se han adaptado pruebas de ELISA para la identificación

de serorreactores a *C. pseudotuberculosis*, con resultados promisorios para su uso en majadas en el marco de programas de erradicación de la enfermedad (6, 8).

La virulencia de la cepa indígena utilizada en este trabajo (Cepa 15 *C. pseudotuberculosis*) fue confirmada por el establecimiento de las lesiones patognomónicas de la enfermedad y por su progresión en la cadena linfática de drenaje del sitio de desafío seleccionado para la reproducción experimental. Los hallazgos clínico-patológicos y microscópicos en los tejidos afectados son coincidentes con hallazgos presentados por otros autores en casos clínicos de LC y en ensayos de desafío (4, 5, 21). Según la bibliografía consultada, en Argentina no existen registros de ensayos de reproducción experimental de la enfermedad mediante el desafío con *C. pseudotuberculosis* y posterior seguimiento de la respuesta inmunitaria humoral mediante ELISA, de modo que este es el primer reporte en nuestro país y podría constituir una base para futuros ensayos de protección vacunal y de inmunopatogenicidad en casos de LC.

El sitio de inoculación experimental seleccionado para nuestros grupos de ovinos fue el más representativo des-

de el punto de vista del desarrollo de la infección a través del sistema linfático y por las lesiones microscópicas y macroscópicas que produjo la inoculación de la cepa indígena. A su vez, permitió simular la infección natural mediante inoculación de *C. pseudotuberculosis* y establecer un grado de enfermedad subagudo/crónico, con desarrollo de lesiones típicas y cultivos positivos en linfonódulos u otros órganos, sitios frecuentes de aislamiento de *C. pseudotuberculosis* en casos clínicos (28). La reproducción experimental con este modelo de infección con *C. pseudotuberculosis* en ovinos nos permitió obtener sueros controles positivos verdaderos para realizar las pruebas preliminares de Se y Es del ELISA desarrollado, a la vez que demostró la utilidad del modelo experimental en estudios de patogenia y microbiológicos de LC.

En este ensayo se logró cultivar exitosamente *C. pseudotuberculosis* a partir de las muestras del sitio de inoculación y de los linfonódulos de los carneros, pero también de otros órganos como el pulmón, lo que ratifica la virulencia especie-específica de la cepa indígena. Una observación de interés fue que el cultivo de órganos de los grupos experimentales no presentó aislamientos de otros microorganismos productores de abscesos o lesiones similares a las de la LC, como se ha descrito en casos naturales con aislamiento de *Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia brasiliensis* o *Staphylococcus aureus*, entre los más importantes (6).

La dosis de desafío utilizada en nuestro trabajo fue adecuada para la reproducción experimental de la enfermedad y también para generar anticuerpos detectables por ELISA, tempranamente y durante los 6 meses del ensayo. Otros autores han usado dosis de desafío más bajas, del orden de $4,7 \times 10^5$ células viables de *C. pseudotuberculosis*, con refuerzos de desafío mediante dosis de $5,3 \times 10^8$ células viables, y obtuvieron resultados similares a los nuestros en la reproducción experimental de la LC (6). Usando dosis de desafío con 10^4 células viables, Fontaine y Baird (13) obtuvieron un modelo experimental de LC con establecimiento de lesiones y cultivos positivos en múltiples linfonódulos y en el pulmón.

El ELISA indirecto desarrollado y probado en este ensayo mostró una Se de 98% y una Es del 100%. Este resultado preliminar es comparable con los informados en pruebas de ELISA descritas en trabajos previos sobre diagnóstico de LC (3, 6, 26, 27).

Aplicando un sistema de extracción de antígeno similar al usado en nuestro trabajo, otros autores lograron desarrollar un ELISA para la detección de anticuerpos anti-*C. pseudotuberculosis* que, después de validado, resultó tener una Se del 83%, valor comparable con el obtenido con otras técnicas de ELISA indirecto desarrolladas para el diagnóstico de la LC (3). Se ha sugerido que el uso de exotoxina o de antígenos secretados en cultivos de *C. pseudotuberculosis* condujeron a los mejores resultados, en los que se alcanzó una Se de 72% y una Es de 67% frente a pruebas de ELISA con diferentes

tipos de antígenos para diagnóstico de LC (6). Utilizando la exotoxina purificada de *C. pseudotuberculosis*, nuestro grupo obtuvo recientemente resultados de Se y Es semejantes a los descritos en este trabajo cuando fue utilizado antígeno crudo enfrentado a los mismos sueros ovinos estudiados (datos no mostrados). Por estos resultados, es probable que el antígeno crudo utilizado en las pruebas de ELISA indirecto que describimos en este trabajo tuviera un porcentaje no conocido de exotoxina que haya contribuido a maximizar los resultados obtenidos con sueros de animales desafiados con *C. pseudotuberculosis*.

Dercksen *et al.* (8) desarrollaron un ELISA doble anticuerpo para la detección de la infección con *C. pseudotuberculosis* y lograron así mejorar la sensibilidad respecto de otras pruebas. Se alcanzó una Se de 94% y una Es de 98% con sueros de caprinos infectados, mientras que en las pruebas con sueros de ovinos, la Se y la Es alcanzadas fueron de 99% y 79%, respectivamente. Según los citados autores, estos ensayos sirvieron para establecer una prueba adecuada para ser empleada en programas de erradicación de áreas endémicas de LC.

En nuestro ensayo, luego del desafío los animales vacunados con la bacterina desarrollaron mayores niveles de anticuerpos y más precozmente que aquellos animales que sólo fueron desafiados. Esto sugiere que la memoria inmunológica de los vacunados permitió desarrollar una respuesta humoral secundaria más rápida y potente frente a los componentes bacterianos presentes en la cepa utilizada para el desafío, en coincidencia con los resultados obtenidos por otros autores (16). En otros trabajos en los que se aplicaron dosis repetidas para el desafío con *C. pseudotuberculosis*, se incrementó la respuesta serológica de los animales desafiados y mejoró así la detección de anticuerpos por los métodos inmunológicos (6).

Mediante el test de Tuckey y Kramer se logró identificar una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre los grupos experimentales; esto permite concluir que los resultados variaron a lo largo del tiempo por efecto del tratamiento y no debido al azar. Como se observa en la Figura 1, no se detectaron diferencias en los PP entre los grupos hasta el día 60 del ensayo. Sin embargo, a partir de la fecha de desafío se observó una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre el grupo control (G4) y los grupos G2 y G3, aunque entre estos dos últimos no hubo diferencia significativa hasta el final del ensayo. La técnica de ELISA permitió diferenciar animales positivos de negativos, ya que los resultados promedio en PP de los infectados estuvieron al menos 4 veces por encima de los valores correspondientes a los animales negativos.

De acuerdo con estos resultados, la técnica de ELISA indirecto desarrollada en este trabajo permitiría distinguir entre animales sanos y enfermos de LC, y sería un indicador de infección útil para analizar majadas en áreas endémicas de LC.

Si bien esta prueba de ELISA discriminó con una buena Se y Es entre poblaciones positivas y negativas dentro de un esquema de infección experimental con *C. pseudotuberculosis*, sería necesario continuar con los estudios aplicando el ELISA en poblaciones ovinas naturalmente infectadas con el microorganismo.

Otros autores sugirieron que los animales menores de 6 meses no desarrollarían títulos serológicos suficientemente altos para ser detectados por pruebas diagnósticas debido a una débil respuesta inmune a la infección con *C. pseudotuberculosis* (6). Utilizando un ELISA con exotoxina como antígeno, estos investigadores demostraron que los animales adultos mayores de 20 meses conformarían la categoría adecuada para analizar dentro de un programa de erradicación. Los resultados de nuestro trabajo experimental mostraron que una vez infectados, los animales jóvenes pueden desarrollar una rápida respuesta inmune, adecuada para ser medida por ELISA.

Un aspecto de importancia que cabe considerar en majadas ovinas es la presencia de otras enfermedades, como listeriosis o paratuberculosis, ya que éstas en circunstancias subclínicas podrían causar reacciones cruzadas que interferirían con el diagnóstico por ELISA de LC (8).

Actualmente estamos trabajando para validar la técnica de ELISA indirecta aquí descrita mediante la evaluación de un mayor número de animales provenientes de áreas endémicas afectadas de LC enviados a frigorífico. Dichos estudios serán completados con el análisis de sueros ovinos de establecimientos con diferente prevalencia clínica de LC. Futuros estudios en los que se evalúe la respuesta inmune celular podrían contribuir a completar los protocolos de diagnóstico de LC en ovinos.

Agradecimientos: Los autores agradecen a los Dres. Germán Cantón y Eduardo Sánchez y a los Sres. José Llamas, Sergio Dinino y Jorge Lali por la colaboración en el desarrollo del trabajo. A los Dres. Adolfo Casaro, Ernesto Spath y María Andrea Fiorentino y a la Sra. Adriana Cano por la colaboración en el análisis de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aleman M, Spiers S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in large animals. En: Smith P, editor. *Internal Medicine* 3rd ed. St Luis, Mosby Co, 2001 p. 1078-84.
- Ayer J. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: A review of diagnosis, pathogenesis and immunity. *J Am Vet Med Ass* 1977; 171: 1251-4.
- Binns S, Green L, Bailey M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet Microbiol* 2007; 123: 169-79.
- Brown C, Olander H. Caseous lymphadenitis of goats and sheep. *Review. Vet Bull* 1987; 57: 7445-8.
- Chaplin P, De Rose R, Boyle J, Mc Waters P, Elly J, Tennet J, Lew A, Scheerlinck J. Targeting improves the efficacy of DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Am Soc Microbiol* 1999; 67: 6434-8.
- Chirino-Zárraga C, Rey-Valeirón C, Scaramelli A, Carrero L. Diagnosis of caseous lymphadenitis by ELISA in naturally infected goats from Venezuela. *Small Ruminant Res* 2009; doi:10.1016/j.smallrumres.2009.09.031
- Çetinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, De Baere T, Vaneechoutte M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol* 2002; 88: 75-83.
- Dercksen D, Brinkhof J, Dekker-Nooren T, van Maanen K, Bode C, Baird G, Kamp E. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet Microbiol* 2000; 167-75.
- Dorella F, Pacheco L, Olivera S, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 2006; 37: 201-18.
- Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos M, Álvarez L, Núñez N, Guevara D, Jensen O. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revisión de casos. *REDVET* 2009; 10, Disp en URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009.html>
- Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos A, Díaz Y, Álvarez L, Callejo R, Prieto M, Jodor N, Jesen O. Diagnóstico de Pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. *Rev Arg Microbiol* 2007; 39: 44-6.
- Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Jensen O. Actualización sobre Linfadenitis Caseosa: El agente etiológico y la enfermedad. *Vet Arg* 2006; 23: 258-78.
- Fontaine M, Baird G. Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Res* 2008; 76: 42-8.
- García Vázquez S, Martínez Rodríguez H, Muñoz Guzmán M, Mendoza Saavedra M, Sánchez Pérez M, Urquiza Pérez M. Establecimiento de una prueba de ELISA para el diagnóstico de Linfadenitis Caseosa en Cabras. XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 2008, p 956. Guadalajara, México.
- González C, Jorge M, Zeballos H, West M, Mateos E, Yotti C. Actualización y estudio de situación de la Linfadenitis Caseosa de los lanares en el partido de Tandil. *Vet Arg* 1991; 8: 304-11.
- Hodgson L, Carter K, Tachedjian M, Krywult J, Cornel L, McColl M, Cameron A. Efficacy of ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine* 1999; 17: 802-8.
- Mills A, Mitchell R, Lim E. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. *Pathology* 1997; 29: 231-3.
- Mueller J. Producción ovina en Argentina, situación actual y perspectivas futuras. Boletín informativo INTA, 2001, EEA Bariloche, Argentina. Disp en: <http://www.inta.gov.ar/bariloche/ssd/nqn/data/genetica/Ct-392.pdf>
- Paton M, Mercy A, Wilkinson F, Gardner J, Sutherland S, Ellis T. The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. *Aust Vet J.* 1988; 65: 117-79.
- Peel M, Palmer G, Stacpoole A, Kerr T. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis.* 1997; 24: 185-91.
- Perea A, Arenas A, Maldonado A, Tarradas C, Gónzales Villamandos I, Sánchez P, Quezada M, Carrasco L. Patología de los pequeños rumiantes en imágenes. Enfermedades de los adultos (enfermedades infecciosas) Parte 2. *Rev Col Vet Prov Buenos Aires*, 2008; 38-48.
- Reyes K, Olivera M, Chirino Z, Reyes K. Alteraciones anatómicas en caprinos infectados experimentalmente con *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Resúmenes XXI*

- Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 2008. p. 894, Guadalajara, México.
23. Robles C, Olaechea F. Salud y enfermedades de las majadas. Ganadería Ovina Sustentable en la Patagonia Austral, Tecnología de Manejo Extensivo, INTA Regional Sur 2001; 225-43.
 24. Ruiz L, Jerónimo R, Barrera Valle M, Frías M. Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. Rev Electr Clín Vet 2007. Disp en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n080807.html>
 25. Ruiz L, Jerónimo R, Barrera Valle M, Frías, M. Linfadenitis Caseosa II: Diagnóstico, control y aspectos epizootiológicos. Rev Electr Clín Vet 2008. Disp en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n040408.html>
 26. Schreuder B, Ter Laak E, Dercksen D. Eradication of caseous lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed ELISA technique. Vet Rec 1994; 135: 174-6.
 27. Seyffert N, Guimarães A, Pacheco L, Portela R, Bastos B, Dorella F, Heinemann M, Lage A, Gouveia A, Meyer R, Miyoshi A, Azevedo V High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res Vet Sci. 2010; 50-5.
 28. Velazco D, Fernández B. Estudio Patológico de Casos de Linfadenitis Caseosa Ovina. 1er Congreso Virtual Veterinario de Diagnóstico por Imagen. 2007. Disp URL: <http://veterinaria.org/asociaciones/aevedi/00139CV.htm>
 29. Williams C. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goats. Vet Med Small An Clin. 1980; 75: 1165-9.