

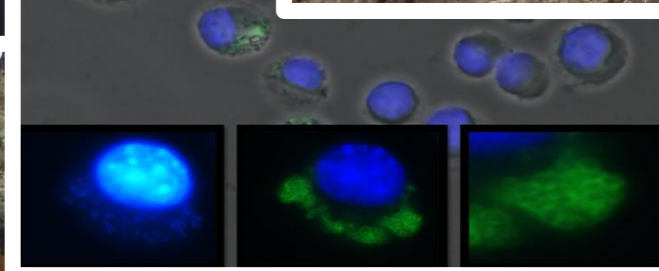
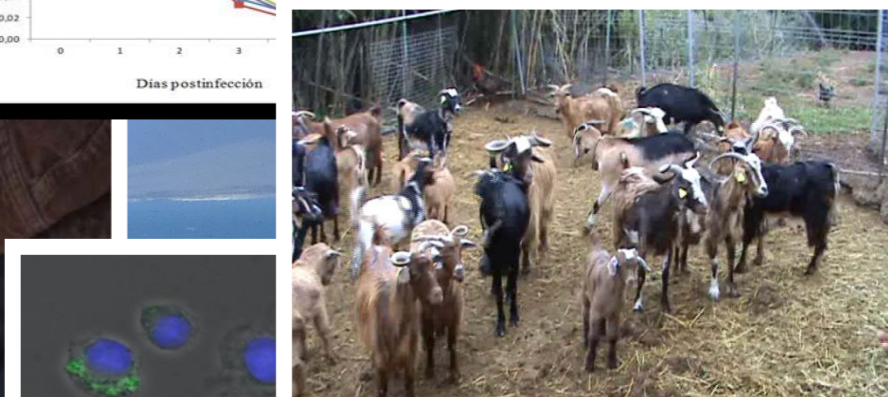
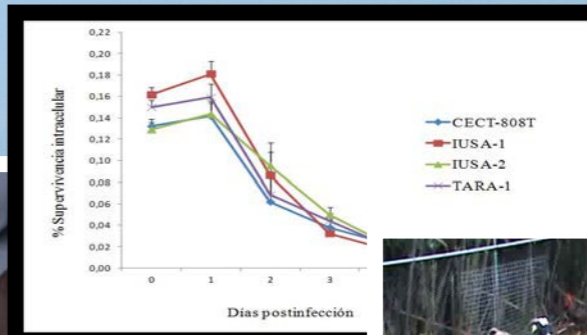
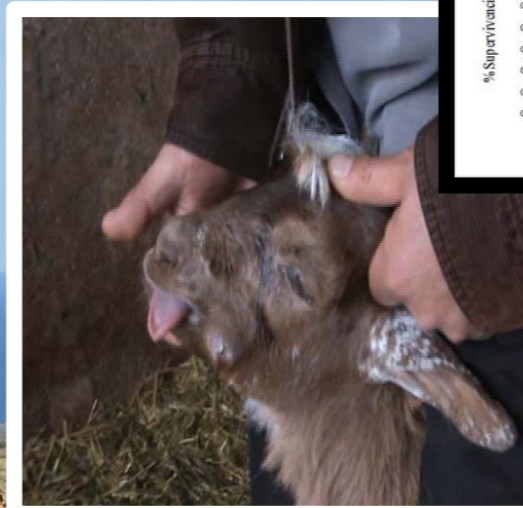
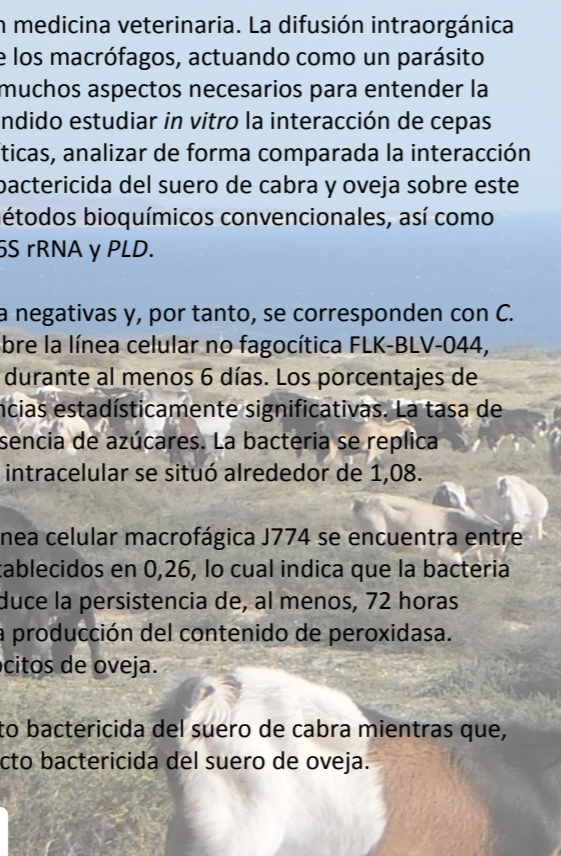


La infección por *C. pseudotuberculosis* tiene enorme trascendencia en medicina veterinaria. La difusión intraorgánica del agente causal se ve facilitada por la supervivencia en el interior de los macrófagos, actuando como un parásito intracelular facultativo. Pero de esta vida intracelular se desconocen muchos aspectos necesarios para entender la interacción parásito-hospedador. En el presente trabajo hemos pretendido estudiar *in vitro* la interacción de cepas clínicas y de referencia de *C. pseudotuberculosis* con células no fagocíticas, analizar de forma comparada la interacción de esta bacteria con fagocitos murinos, ovinos y caprinos y el efecto bactericida del suero de cabra y oveja sobre este patógeno. Todas las cepas utilizadas fueron identificadas mediante métodos bioquímicos convencionales, así como mediante una PCR-*multiplex* para regiones específicas de los genes 16S rRNA y *PLD*.

Todas las cepas utilizadas en el presente trabajo son nitrato reductasa negativas y, por tanto, se corresponden con *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. La invasión celular de esta bacteria sobre la línea celular no fagocítica FLK-BLV-044, replicándose ligeramente hasta las 24 horas y permaneciendo viable durante al menos 6 días. Los porcentajes de adherencia varían entre el 2 y el 1,5%, aunque no se observen diferencias estadísticamente significativas. La tasa de invasión disminuye de forma estadísticamente significativa por la presencia de azúcares. La bacteria se replica ligeramente hasta las 24 horas postinfección. La tasa de proliferación intracelular se situó alrededor de 1,08.

La tasa de fagocitosis de las cepas de *C. pseudotuberculosis* sobre la línea celular macrofágica J774 se encuentra entre 50,9 y el 66,6%. Los índices de proliferación intracelular quedaron establecidos en 0,26, lo cual indica que la bacteria no se replica activamente en el interior del macrófago, pero sí se produce la persistencia de, al menos, 72 horas postinfección. Ninguna de las cepas utilizadas produjo inhibición de la producción del contenido de peroxidasa. También se observó inhibición de la explosión respiratoria de los fagocitos de oveja.

Las cuatro cepas de *C. pseudotuberculosis* fueron susceptibles al efecto bactericida del suero de cabra mientras que, paralelamente, las mismas cepas analizadas fueron resistentes al efecto bactericida del suero de oveja.



VIDA INTRACELULAR DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

TESIS DOCTORAL
JUSTO VALDIVIA ZEVALLOS
2015

Justo D. Valdivia Zevallos (Tesis Doctoral 2015)



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Instituto Universitario de Sanidad Animal
y Seguridad Alimentaria

**D^a MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO
UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA
DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

CERTIFICA

Que el consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha de febrero de 2015 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: “**Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis***”, presentada por el doctorando D. Justo Darío Valdivia Zevallos, dirigida por el Catedrático D. Fernando Real Valcárcel y por los doctores D. Daniel Padilla Castillo y D^a Begoña Acosta Hernández.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 20 de febrero de dos mil quince.

Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA**

Título de la Tesis

“Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis*”

Tesis Doctoral presentada por D. Justo Darío Valdivia Zevallos

Dirigida por el Catedrático D. Fernando Real Valcárcel y los Doctores D. Daniel Padilla Castillo y D^a Begoña Acosta Hernández

El Director

El Director

La Directora

Fernando Real Valcárcel

Daniel Padilla Castillo

Begoña Acosta Hernández

El Doctorando

Justo Darío Valdivia Zevallos

Arucas, a 28 de Febrero de 2015

D. FERNANDO REAL VALCÁRCEL, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “**Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis***” realizada por D. Justo Darío Valdivia Zevallos, Licenciado en Veterinaria, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, a 28 de febrero de 2015.

Fdo. Fernando Real Valcárcel

D. DANIEL PADILLA CASTILLO, PROFESOR ASOCIADO LABORAL DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “**Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis***” realizada por D Justo Darío Valdivia Zevallos, Licenciado en Veterinaria, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, a 28 de febrero de 2012.

Fdo. Daniel Padilla Castillo

D^a. BEGOÑA ACOSTA HERNANDEZ, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “**Vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis***” realizada por D Justo Darío Valdivia Zevallos, Licenciado en Veterinaria, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, a 28 de febrero de 2012.

Fdo. Begoña Acosta Hernández

*A Amparo, Kimberlin y Arón, Amores que me acompañan y me dan
la fuerza para seguir adelante el día a día.*

A mis padres y Hermanos

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
I.-INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II.1.- La seudotuberculosis por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	4
II.1.1.- Etiopatogenia de la enfermedad	4
II.1.1.1.- Puerta de entrada del patógeno	5
II.1.1.2.- Localización de la infección	7
II.1.1.3.- Factores de virulencia de <i>C. pseudotuberculosis</i>	8
II.1.1.3.1.- Efecto de la exotoxina fosfolipasa D	8
II.1.1.3.2.- Ácidos micólicos	9
II.1.2.- Otros aspectos de la enfermedad	10
II.2.- Aplicaciones actuales del cultivo celular a la investigación biosanitaria	20
II.3.- Procesos de adherencia e invasión celular por las bacterias	23
II.3.1.- Adherencia celular	23
II.3.2.- Invasión celular	25
II.4.- Explosión respiratoria y contenido en peroxidasa	28
III.-MATERIAL Y MÉTODOS	29
III.1.- Cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> utilizadas	29
III.1.1.- Aislamiento e identificación de <i>C. pseudotuberculosis</i>	29
III.1.2.- Conservación de las cepas	31
III.1.3.- Perfil de resistencia antibiótica	31
III.2.- Estudio de la de adherencia e invasión celular de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en línea celular no fagocítica	32
III.2.1.- Línea celular	32
III.2.2.- Curva de crecimiento de <i>C. pseudotuberculosis</i>	32
III.2.3.- Determinación de las tasas de adherencia e invasión celular de <i>C. pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044	33

III.2.4.- Determinación del tiempo de infección en la invasión de <i>C. pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044	34
III.2.5.- Efecto de la concentración del inóculo en la invasión de <i>C. pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044	34
III.2.6.- Persistencia intracelular de <i>C. pseudotuberculosis</i> y tasa de replicación intracelular (Índice I _{PRO}) en la línea celular FLK-BLV-044	34
III.2.7.- Efecto de la preincubación con suero de conejo frente a <i>C. pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044	35
III.2.8.- Determinación del efecto de la incubación celular a 4°C en la invasión de <i>C. pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044	37
III.2.9.- Determinación del efecto de la presencia de azúcares en la invasión de <i>C. pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044	37
III.2.10.- Estudio de la adherencia e invasión de <i>C. pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044 Mediante inmunofluorescencia	38
III.2.11.- Determinación del mecanismo de invasión bacteriana	39
III.3.- Estudio de la fagocitosis, persistencia y replicación de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en macrófagos	40
III.3.1.- Células fagocíticas utilizadas	40
III.3.2.- Determinación de la tasa de fagocitosis de <i>C. pseudotuberculosis</i>	41
III.3.3.- Determinación del tiempo de fagocitosis en la infección por <i>C. pseudotuberculosis</i>	41
III.3.4.- Determinación de la resistencia a la fagocitosis y replicación intracelular de <i>C. pseudotuberculosis</i>	41
III.3.5.- Estudio de la adherencia e invasión de <i>C. pseudotuberculosis</i> en la línea celular macrofágica de ratón J774 mediante inmunofluorescencia	42

III.4.- Estudio del efecto inmunomodulador de los fagocitos de oveja, cabra y ratón sobre <i>C. pseudotuberculosis</i>	42
III.4.1.- Explosión respiratoria	43
III.4.2.- Contenido en peroxidasa en macrófagos de oveja, cabra y ratón	44
III.5.- Determinación del efecto bactericida del suero	44
 IV.-RESULTADOS	 46
IV.1.- Caracterización de las cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizadas en este estudio	46
IV.1.1.- Aspectos clínico-patológicos de los animales Muestreados	46
IV.1.2.- Identificación de <i>C. pseudotuberculosis</i>	46
IV.1.3.- Perfil de resistencia antibiótica	49
IV.2.- Adherencia e invasión de <i>C. pseudotuberculosis</i> en células no fagocíticas (línea celular FLK-BLV-044)	51
IV.2.1.- Establecimiento de las condiciones previas: curva de crecimiento y tiempo de infección	51
IV.2.2.- Porcentaje de adherencia e invasión	53
IV.2.3.- Efecto de la concentración del inóculo	55
IV.2.4.- Efecto de la incubación de las células a 4°C	56
IV.2.5.- Efecto de la preincubación con antisuero de conejo	57
IV.2.6.- Efecto de la presencia de determinados azúcares	58
IV.2.7.- Supervivencia y/o replicación intracelular	59
IV.2.8.- Adherencia e invasión intracelular mediante inmunofluorescencia	61
IV.3.- Interacción de <i>C. pseudotuberculosis</i> con fagocitos de ratón, cabra y oveja	62
IV.3.1.- Estandarización de las condiciones previas: tiempo de infección	62
IV.3.2.- Fagocitosis por la línea celular de ratón J774	63
IV.3.3.- Persistencia y/o replicación intracelular en La línea celular de ratón J774	64

IV.3.4.- Estudio de la fagocitosis por inmunofluorescencia	65
IV.3.5.- Explosión respiratoria y contenido de peroxidasa de leucocitos de ratón, oveja y cabra	66
IV.4.- Efecto bactericida del suero de cabra y oveja sobre <i>C. pseudotuberculosis</i>	69
V.-DISCUSIÓN	72
V.1.- Aspectos clínicos y microbiológicos de las cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i> objeto de estudio	72
V.2.- Papel de las células no fagocíticas en la permanencia de <i>C. pseudotuberculosis</i>	76
V.3.- Interacción de <i>C. pseudotuberculosis</i> con células Fagocíticas	82
VI.- CONCLUSIONES	87
VII- BIBLIOGRAFÍA	88
VIII.- RESUMEN	106
IX.- SUMMARY	107
X.- AGRADECIMIENTOS	108
XI.- PUBLICACIONES DE LA TESIS EN REVISTAS INDEXADAS	111

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los cebadores utilizados para la amplificación de regiones específicas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	31
Tabla 2. Datos principales de la procedencia de las cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> que fueron utilizadas en el trabajo de investigación	46
Tabla 3. Caracterización fenotípica de las cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i> obtenidas en Gran Canaria, y de la cepa de referencia CECT-808T, mediante el sistema APICoryne (API, bioMérieux)	48
Tabla 4. Perfil de resistencia antibiótica de las cepas clínicas de <i>C. pseudotuberculosis</i> aisladas, comparadas con la cepa de referencia CECT-808T	50
Tabla 5. Datos numéricos del efecto del tiempo de infección en la invasión de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044	52
Tabla 6. Datos numéricos de la adherencia e invasión de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044	54
Tabla 7. Datos numéricos de la multiplicidad de la infección (MOI) en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044	55
Tabla 8. Datos numéricos de la tasa de invasión bajo diferentes condiciones de cultivo en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044	59
Tabla 9. Datos numéricos de la replicación intracelular de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044, a partir de una MOI de $100 \approx 1$	60
Tabla 10. Datos numéricos del porcentaje de fagocitosis de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular J774 en función del tiempo de infección empleado (MOI $10 \approx 1$)	63
Tabla 11. Datos numéricos expresados en porcentaje de la fagocítica de la línea celular J774 sobre <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> , tras 120 minutos de incubación a una MOI $10 \approx 1$	64
Tabla 12.- Datos numéricos de la persistencia y replicación intracelular de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular fagocítica J774 inoculada a una MOI $10 \approx 1$	65

Tabla 13.- Datos numéricos del índice de la explosión respiratoria en leucocitos de ratón, oveja y cabra infectados con *C. pseudotuberculosis* 67

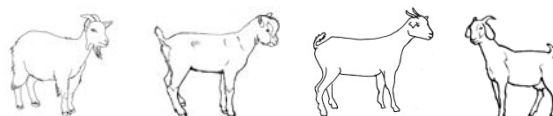
Tabla 14.- Datos numéricos del contenido de peroxidasa en leucocitos de ratón, oveja y cabra infectados con *C. pseudotuberculosis* expresados como índice de estimulación 68

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Resultados obtenidos mediante la PCR- <i>multiplex</i> de los genes 16S rRNA y PLD de las 4 cepas empleadas en nuestro estudio	49
Figura 2. Representación gráfica del crecimiento de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> a lo largo del tiempo	51
Figura 3.- Efecto del tiempo de infección en la invasión de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044	52
Figura 4. Adherencia de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044	53
Figura 5.- Invasión de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044	54
Figura 6.- Efecto de la multiplicidad de la infección (MOI) de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la invasión en la línea celular FLK-BLV-044	55
Figura 7.- Tasas de invasión de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044 a 4°C con una MOI inicial de 100≈1	56
Figura 8.- Efecto de la preincubación con suero anti- <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la invasión de la línea celular FLK-BLV-044, a partir de una MOI de 100≈1	57
Figura 9.- Efecto de la incubación de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> con glucosa y manosa al 1% en la invasión de la línea celular FLK-BLV-044, a partir de una MOI de 100≈1	58
Figura 10.- Replicación intracelular de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044, a partir de una MOI de 100≈1	60
Figura 11.- Invasión y adherencia de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular FLK-BLV-044, a una MOI de 100≈1, mediante inmunofluorescencia	61
Figura 12.- Porcentaje de fagocitosis de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular J774 en función del tiempo de infección empleado (MOI 10≈1)	62
Figura 13.- Actividad fagocítica de la línea celular J774 sobre <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> , tras 120 minutos de incubación a una MOI 10≈1	63
Figura 14.-Persistencia y replicación intracelular de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular fagocítica J774, que fue inoculada a una MOI 10≈1	65

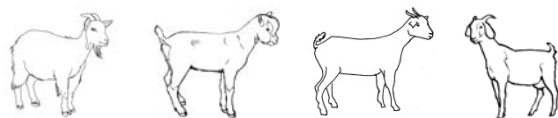
Figura 15.- Fagocitosis de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en la línea celular macrofágica J774 a una MOI de $10 \approx 1$ mediante inmunofluorescencia	66
Figura 16.- Índice de explosión respiratoria en macrófagos de ratón, oveja y cabra infectados con <i>C. pseudotuberculosis</i> , a una MOI $10 \approx 1$	67
Figura 17.- Contenido de peroxidasa en leucocitos de ratón, oveja y cabra infectados con <i>C. pseudotuberculosis</i>	68
Figura 18. Resistencia del efecto bactericida del suero de cabra de las cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i> estudiadas, expresada como porcentaje de viabilidad de cada cepa estudiadas, medida tras diferentes tiempos de incubación	70
Figura 19.- Resistencia del efecto bactericida del suero de oveja de las cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i> estudiadas, expresada como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación	71

I-INTRODUCCIÓN

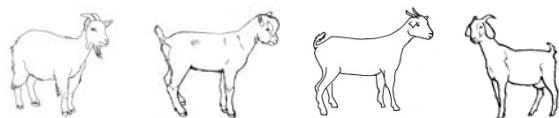


II-REVISIÓN

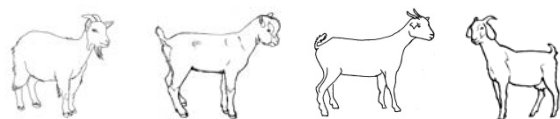
BIBLIOGRÁFICA



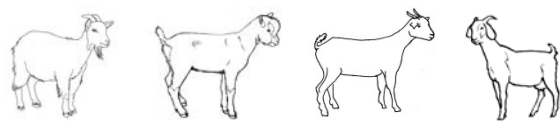
III-MATERIAL Y METODO



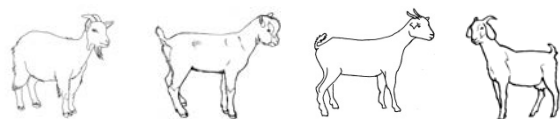
IV-RESULTADOS



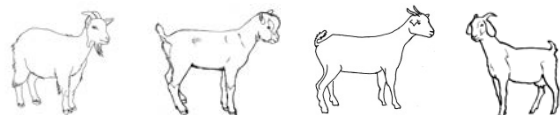
V-DISCUSIÓN



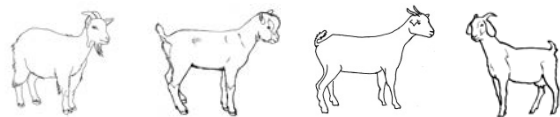
VI-CONCLUSIONES



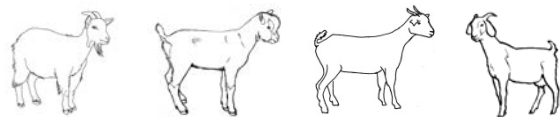
VII-BIBLIOGRAFÍA



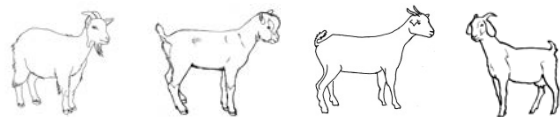
VIII-RESUMEN



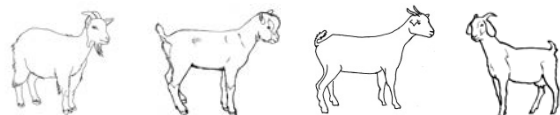
IX-SUMMARY



X-AGRADECIMIENTOS



**XI-PUBLICACIONES
DE LA TESIS EN
REVISTAS
INDEXADAS**



I.-INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La linfadenitis caseosa, también denominada seudotuberculosis o enfermedad de Preisz-Nocard, es una enfermedad infectocontagiosa muy prevalente en algunos países en donde los pequeños rumiantes constituyen una parte esencial de su ganadería. De ahí que se considere una de las enfermedades más importantes de cabras y ovejas en países como EEUU, Canadá o Australia, habiéndose cuantificado en este último país unas pérdidas asociadas a la producción de lana, de aproximadamente 17 millones de dólares anuales (Paton y cols., 1994).

El agente causal de la enfermedad, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, es un microorganismo cosmopolita con una importante significación clínica (Fontaine y Baird, 2008), a pesar de no producir grandes pérdidas directas por mortalidad de animales, pero sí por disminución en la productividad de carne, lana y leche (Paton y cols., 1994; Aleman y Spier, 2001).

La enfermedad produce una infección bacteriana supurativa de carácter crónico, que afecta a ganado ovino, caprino, bovino, equino, y otros animales domésticos y silvestres (Aleman y cols., 1996), así como a la especie humana, tras el contacto con animales infectados (Peel y cols., 1997), siendo considerada como una zoonosis menor. La infección se produce a través de alimento e inhalación de polvo contaminado, así como a través de heridas abiertas. Las lesiones más características se traducen en la presentación de abscesos en ganglios linfáticos de diferentes regiones anatómicas.

No obstante, la enfermedad puede manifestar diferentes formas clínicas, que frecuentemente se asocian a tres síndromes principales: linfadenitis piógena, respiratorio posterior y caquectizante (León y cols., 2002c). Pero además y, aunque con una baja prevalencia, acontecen una amplia variedad de formas clínicas, algunas de ellas típicas como es el caso de la anemia hemolítica neonatal, y otras más difíciles de asociar con la seudotuberculosis (mortalidad perinatal, mamitis, poliartritis, etc.).

Para que aparezca la enfermedad es imprescindible conjugar varios factores, por un lado, el papel que juega la exotoxina que produce el agente causal, que afecta a la permeabilidad vascular, lo que facilitaría la diseminación de la bacteria de los vasos sanguíneos a la vía linfática (Muckle y Gyles, 1983; Yozwiak y Songer, 1993). Pero además, *C. pseudotuberculosis* presenta una capa ácida micólica cerosa en la superficie de su pared celular que presenta propiedades citotóxicas, desempeñando un papel muy importante en la patogenicidad (Hard, 1972). A ambos factores habría que sumar un hecho trascendente en el curso de la infección: “el agente causal se encuadra en el grupo de patógenos que pueden comportarse como parásitos intracelulares facultativos, capaces de sobrevivir en el interior de los macrófagos de su hospedador”.

Pero de esta vida intracelular, se desconocen muchos aspectos que son necesarios analizar en profundidad a la hora de entender mejor la interacción parásito-hospedador. Resolver muchas de estas incógnitas permitirá conocer con detalle los mecanismos de agresión y supervivencia de este agente causal de enfermedad y, a la vez, mejorar la eficacia de los métodos de control que se aplican actualmente. Además, de forma espontánea, surge también el planteamiento de si las células no fagocíticas podrían jugar algún papel en el mantenimiento y en la difusión de la infección dentro del hospedador.

Por otra parte, los cultivos celulares permiten un control preciso en el laboratorio del medio ambiente intracelular, la caracterización y homogeneidad de la muestra y economizan el uso de reactivos, evitando a la vez el sacrificio de miles de animales de experimentación. De ahí que estos estudios han sido ampliamente utilizados para profundizar en el conocimiento de la patogenia de algunos parásitos intracelulares. Por otro lado, la capacidad de ciertas bacterias de invadir células no fagocíticas es considerada como un importante factor de virulencia de varias bacterias patógenas humanas y animales, como *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* (Galán, 1994; Zierler y Galán, 1995), entre otras.

Aprovechando la experiencia previa del grupo de investigación a la hora de analizar la interacción de diferentes patógenos de interés para la sanidad animal como: *Hafnia alvei* (Padilla y cols., 2008; 2010), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

(Acosta y cols, 2009) o *Streptococcus iniae* (El Aamri y cols., 2012) con células de distintos orígenes, nos hemos marcado como finalidad de este trabajo “profundizar en el conocimiento de la vida intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, en células fagocíticas y no fagocíticas”.

De esta manera, y con todo lo expuesto anteriormente, los objetivos específicos que nos hemos planteado en el desarrollo del presente trabajo de investigación son los siguientes:

Primero.- Obtener cepas clínicas de campo recientes de la infección ovina o caprina por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a partir de casos de indudable diagnóstico, con el fin de evitar que las cepas hayan tenido un mantenimiento prolongado en el laboratorio.

Segundo.- Estudiar la adherencia e invasión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en células no fagocíticas, ante distintas condiciones de cultivo.

Tercero.- Analizar la capacidad de supervivencia y replicación intracelular del patógeno citado en células no fagocíticas.

Cuarto.- Estudiar de forma comparada, la posible interacción entre fagocitos murinos, ovinos y caprinos con *Corynebacterium pseudotuberculosis*, analizando los mecanismos de persistencia y replicación intracelular.

Quinto.- Estudiar de forma comparada, la respuesta inmune de base celular, de los leucocitos murinos, ovinos y caprinos frente a la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mediante las técnicas de explosión respiratoria y contenido de peroxidasa.

Sexto.- Estudiar comparativamente el efecto bactericida del suero de cabra y oveja frente a *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.- LA SEUDOTUBERCULOSIS POR *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*.

II.1.1. ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

El agente causal de linfadenitis caseosa es *Corynebacterium pseudotuberculosis*, patógeno bacteriano intracelular facultativo (Funke y cols., 1997; Aleman y Spier 2001). *Corynebacterium pseudotuberculosis* es una bacteria Gram positiva, de morfología cocobacilar pleomórfica de 1-3 μm de largo por 0,5 -0,6 μm de ancho, inmóvil y que forma colonias blanco-amarillentas cuando son sembradas en el medio agar sangre, donde produce beta hemólisis tras una incubación de 48 a 72 h a 37°C. A su vez, es un organismo no esporulado, anaerobio facultativo (Hommez y cols., 1999). En medios sólidos, las colonias bacterianas son pálidas, secas y de consistencia friable (Quinn y cols., 1994). Tras una incubación de 24 h, las colonias son pequeñas de color blanco amarillentas, aumentando hasta un diámetro de 1-2 milímetros tras 48 h de incubación (Coyle y cols., 1985). El crecimiento de *C. pseudotuberculosis* se ve favorecido tras la adición de suero o sangre entera a los medios de cultivo. Cuando se cultiva *C. pseudotuberculosis* en medios de cultivo líquidos o en suspensión acuosa, *C. pseudotuberculosis* tiende a formar agregados y precipitados (Aleman y Spier, 2001; Baird y Fontaine, 2007).

La aplicación de técnicas de análisis de secuencias del gen ribosómico 16S rRNA y estudios de hibridación, han demostrado que dentro del Género *Corynebacterium* existen tres especies diferentes, *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis*. Estas tres especies comparten, entre otras características, la producción de una fosfolipasa D con idénticas características (Lipsky y cols., 1982; Wong y Groman, 1984; Funke y cols., 1997; Leardini y cols., 2002).

Estudios filogenéticos indican que el Género *Corynebacterium* se halla íntimamente relacionado con los Géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*,

conformando el grupo denominado CNMR (Coyle y Lipsky, 1990; Von Graevenitz y Krech, 1992; Clarridge y Spiegel, 1995; Koneman y cols., 1999).

Cepas de distintos orígenes de esta especie presentan variabilidad bioquímica. En base a ello, se han propuesto dos biotipos por su capacidad de producir la enzima nitrato reductasa, denominándose biovariedad *equi* para los aislamientos que reducen los nitratos y la biovariedad *ovis* para aquellas cepas que no presentan dicha capacidad (Songer y cols., 1988; Leardini y cols., 2002; Vay y Almuzara, 2002). De forma genérica, las cepas aisladas a partir de pequeños rumiantes y vacunos son nitrato negativo, mientras que las cepas nitrato positivas son las aisladas a partir de équidos y vacunos, no habiéndose registrado la transmisión natural entre las diferentes especies (Aleman y Spier, 2001).

II.1.1.1.- Puerta de entrada del patógeno

La inducción de la infección experimental por *C. pseudotuberculosis* se ha llevado a cabo por diferentes rutas en pequeños rumiantes, como son la vía intradérmica, subcutánea, intravenosa, intratraqueal, intravaginal e intralinfática. Por todas las vías se logró reproducir la enfermedad experimentalmente (Nagy, 1976; Burrell, 1978; Pepin y cols., 1994b; Fontaine y cols., 2006). En infecciones naturales la principal ruta de entrada de la bacteria es a través de piel (Batey, 1986b; Brown y Olander, 1987; Davis, 1990; Collett y cols., 1994). La infección se facilita por pequeñas heridas y abrasiones cutáneas como las causadas en el esquilado (Paton y cols., 1988). El número de bacterias viables en la descarga purulenta de un absceso se han estimado entre 10^6 y 10^7 unidades formadoras de colonia por gramo de pus (Brown y Olander, 1987). Por tanto, la ruptura de los abscesos superficiales libera grandes cantidades de bacterias viables a la piel adyacente y al vellón, pudiendo contaminar el entorno adyacente muy fácilmente. Lesiones por heridas en mucosa bucal debido al pastoreo son un importante factor de riesgo (Brown y Olander, 1987; Robles y Olaechea, 2001). Las heridas causadas durante la castración, el corte del rabo de las ovejas y el ombligo en animales neonatos se han sugerido como puerta ocasional de entrada de *C. pseudotuberculosis* en el animal (Valli y Parry, 1993).

También se ha descrito la vía respiratoria como puerta de entrada de la infección (Stoops y cols., 1984), a partir de la observación de que algunas ovejas infectadas de forma natural sólo presentaban lesiones pulmonares, y un número pequeño de estas lesiones estaban situadas en el interior de las paredes de las vías respiratorias. Por otra parte, Brown y Olander (1987) describieron la producción de abscesos pulmonares diseminados inyectando por vía intravenosa *C. pseudotuberculosis* pero otros estudios indican que tales lesiones pulmonares pueden producirse a partir de una infección sistémica iniciada en otra localización. Así, tras la inoculación intravenosa en corderos con *C. pseudotuberculosis*, la mayoría de las lesiones internas aparecen en los pulmones asociados a ganglios linfáticos torácicos (Brogden y cols., 1984). También se ha observado que en infecciones naturales en ovinos, los patrones de distribución de las lesiones pulmonares son coherentes con la propagación hematógena o linfática, en lugar de la extensión vía aerógena (Nairn y Robertson, 1974), por lo que la vía aerógena es de poca importancia.

La aparición de la enfermedad en un rebaño serológicamente negativo se produce tras la introducción de un animal infectado clínica o sub-clínicamente (Ayers, 1977). También se ha descrito la transmisión de la infección a través de los trabajadores agrícolas y sus equipos. En rebaños con una alta prevalencia, los esquiladores y su equipo inevitablemente están expuestos a las descargas purulentas de las lesiones superficiales, por lo que si las medidas posteriores de desinfección son insuficientes, es posible que el equipo de esquila, la ropa y otros equipos de inmovilización, puedan actuar como vectores mecánicos de la infección a otros rebaños.

En rebaños de ovejas con linfadenitis caseosa, los animales con lesiones pulmonares representan una importante fuente de infección para otros animales (Pepin y cols., 1994a; Williamson, 2001), ya que se ha observado el aumento en la seroprevalencia de la enfermedad en grupos de ovejas en ausencia de lesiones superficiales (Ellis y cols., 1987; Paton y cols., 1988). Además, *C. pseudotuberculosis* ha sido aislado a partir de tráquea de ovejas con abscesos pulmonares, confirmando que, efectivamente, se produce la descarga de las lesiones pulmonares hacia las vías respiratorias altas (Stoops y cols., 1984; Pepin y cols., 1994a), pudiéndose crear aerosoles con material infeccioso. En condiciones de estrecho contacto y flujo de aire

reducido, como en un cobertizo cubierto, el aerosol producido podría ser capaz de infectar a un gran número de animales en un corto período de tiempo (Paton y cols., 1996).

II.1.1.2.- Localización de la infección

Tras la entrada del patógeno, el organismo se propaga rápidamente al ganglio linfático más cercano donde se desarrollan múltiples piogranulomas microscópicos que aumentan de tamaño y terminan uniéndose formando abscesos de mayor tamaño. Este proceso es seguido a veces por la diseminación de la bacteria por vía sanguínea o el sistema linfático, provocando lesiones similares en otros órganos. La naturaleza de estas lesiones son significativas ya que se cronifican y con frecuencia permanecen en el animal de por vida. Bacterias viables pueden ser recuperadas de abscesos varios años después de la infección inicial. También se ha descrito la reactivación de la enfermedad con el desarrollo de abscesos en nuevas localizaciones tras un período de inactividad aparente del patógeno (Aleman y Spier, 2001; Baird y Fontaine, 2007).

Una vez en el interior del ganglio linfático, *C. pseudotuberculosis* es fagocitado por macrófagos (Aleman y Spier, 2001). Mediante métodos histoquímicos se ha descrito la unión entre fagosomas y lisosomas, pero el patógeno resiste el ataque enzimático permitiendo la permanencia en el interior celular como parásito intracelular facultativo. Una vez desarrollado el absceso, parte de las bacterias de su interior entran a los capilares y forman colonias que ocluyen y trombosan los vasos produciendo isquemia localizada, que junto a las toxinas producidas por *C. pseudotuberculosis*, destruyen células de la parte sana del absceso, adicionándose una nueva capa a la masa necrótica. Si se produce la salida de bacterias del absceso, se produce la diseminación de *C. pseudotuberculosis* a través de los vasos linfáticos, penetrando en otros ganglios y eventualmente en vasos sanguíneos, pudiendo llegar a diferentes órganos donde se reproduce la formación de abscesos. A su vez, el tejido conectivo de los abscesos puede romperse liberándose líquido purulento (Bofill y cols., 1998).

Entre los mecanismos por los cuales *C. pseudotuberculosis* se propaga desde el punto de la entrada de la infección, es de crucial importancia la supervivencia y la replicación de *C. pseudotuberculosis*. Esta habilidad del patógeno de sobrevivir en el

interior de este nicho intracelular está relacionada con la composición lipídica de su pared celular, principalmente por los ácidos corinomicólicos, existiendo una correlación positiva entre el contenido de estos lípidos y la habilidad de producir lesiones en los ganglios. Los lípidos de la pared celular constituyen un factor piógeno, relacionándose con la infiltración masiva con leucocitos polimorfonucleares que transportan las bacterias a los nódulos linfáticos y con el efecto citotóxico que destruye a los fagocitos (Brown y Olander, 1987; Aleman y Spier, 2001).

II.1.1.3.- Factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis*

Los principales factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* están representados por la producción de la exotoxina fosfolipasa D y la presencia de ácidos micólicos.

II.1.1.3.1.- Efecto de la exotoxina fosfolipasa D

Corynebacterium pseudotuberculosis produce una fosfolipasa D (PLD) que actúa sobre la esfingomielina y la lisofosfatidilcolina. Inoculaciones experimentales realizadas en oveja con un mutante no productor de PLD han demostrado la ausencia de lesiones macroscópicas en los animales inoculados, aun siendo inoculados con una dosis 100 veces mayor que aquellos inoculados con una cepa salvaje que sí desencadenó la formación de los clásicos abscesos pseudotuberculosos (Hodgson y cols., 1992). Por tanto, la producción de PLD parece ser un factor de virulencia esencial en la patogénesis de *C. pseudotuberculosis*. Su mecanismo de acción podría estar relacionado con el hecho de que la PLD afecta a la permeabilidad vascular, lo que facilitaría la diseminación de la bacteria de los vasos sanguíneos a la vía linfática (Muckle y Gyles, 1983; Yozwiak y cols., 1993). La PLD produce el aumento de la permeabilidad de la membrana endotelial vascular por la hidrólisis de esfingomielina. Este aumento de la permeabilidad provoca la liberación de plasma de los vasos sanguíneos hacia los tejidos y desde allí al sistema linfático (Carne y Onon, 1978). Asimismo, se sabe que la PLD activa la vía complementaria del sistema inmune, agotando el complemento en la zona que rodea las bacterias protegiéndolas de la opsonización (Yozwiak y Songer, 1993). A su vez, inhibe la quimiotaxis de neutrófilos y provoca la degranulación de células fagocíticas ocasionando necrosis y trombosis en vasos linfáticos, favoreciendo la

supervivencia y multiplicación del microorganismo (Aleman y Spier, 2001) al disminuir la fagocitosis en los pasos iniciales de la infección (Yozwiak y Songer, 1993).

Varios géneros bacterianos liberan fosfolipasas, y en la mayoría de los casos, ha demostrado desempeñar un papel importante en la virulencia (Schmiel y Miller, 1999). La PLD fue caracterizada por primera vez por Carne en 1940, quien determinó que era una fosfatidilcolina fosfalido hidrolasa, más conocida como fosfolipasa D, y desde entonces ha sido detectada en todos los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* (Songer y cols., 1988). Esta enzima funciona como una esfingomielinasa específica que cataliza la disociación de la esfingomielina, importante fosfolípido que forma parte constitutiva de la pared celular (Bernheimer y cols., 1980).

Se han descrito diversas actividades biológicas para la PLD, incluyendo dermonecrosis (Carne, 1940; Muckle y Gyles, 1986), letalidad, lisis sinérgica de eritrocitos en presencia de un factor extracelular de *Rhodococcus equi* (Fraser, 1961) e inhibición del síndrome estafilocócico (lisis inducida por lisis de eritrocitos) (Zaki, 1976).

II.1.1.3.2. Ácidos micólicos

El segundo factor de virulencia más importante para el desarrollo de la enfermedad es la presencia de los ácidos micólicos. *Corynebacterium pseudotuberculosis* no produce cápsula protectora, pero en su lugar presenta una capa ácida micólica cerosa en la superficie de su pared celular. Esta capa micólica presenta una serie de propiedades citotóxicas que desempeñan un papel muy importante en la patogenicidad de este patógeno (Hard, 1972; Muckle y Giles, 1983; Tashjian y Campbel, 1983).

La inoculación experimental por vía subcutánea de ácido micólico extraído a partir de *C. pseudotuberculosis* en ratones, produce inflamación localizada con congestión y un área central de necrosis hemorrágica. Además, el ácido micólico induce cambios degenerativos y muerte de leucocitos (Carne y cols., 1956). Sin embargo, y a diferencia del efecto letal de la inoculación de moléculas similares extraídas de las micobacterias, el efecto citotóxico del ácido micólico de *C. pseudotuberculosis* se limita al lugar de la inoculación (Hard, 1975). Algunos autores han sugerido que la capa

del ácido micólico permite a *C. pseudotuberculosis* sobrevivir durante largos períodos en el entorno, una característica común a otros miembros de la Familia *Actinomycetaceae*, y de hecho, *C. pseudotuberculosis* es relativamente resistente a las condiciones ambientales (West y cols., 2002). Batey (1986b) describe que en condiciones frías y húmedas, el organismo puede permanecer viable durante más de 6 meses, y en suelo contaminado experimentalmente con pus se han podido cultivar bacterias viables 8 meses más tarde (Brown y Olander, 1987)

En infecciones naturales, la capa de ácidos micólicos proporciona al organismo una protección mecánica y posiblemente bioquímica, contra las enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas. A su vez, esto permite a la bacteria resistir la fagocitosis y permanecer en el hospedador como un parásito intracelular facultativo (Williamson, 2001). Esta capacidad es probable que sea esencial para la diseminación del organismo desde la entrada inicial. Además, la naturaleza tóxica del ácido micólico parece contribuir a la formación de abscesos. En infecciones experimentales en ratones, se demostró la relación directa entre la cantidad de lípidos de la pared celular de diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* con la capacidad para producir abscedación crónica (Muckle y Gyles, 1983).

II.1.2.- OTROS ASPECTOS DE LA ENFERMEDAD

La pseudotuberculosis fue descrita por primera vez en 1888 por el bacteriólogo francés Edward Nocard, que aisló un organismo inusual a partir de un caso de linfangitis en una vaca. Años más tarde, el bacteriólogo búlgaro Hugo Von Preisz identificó una bacteria similar en cultivos de un absceso renal en una oveja. Como consecuencia de estos descubrimientos relacionados, al microorganismo se le conoció como el bacilo de “Preisz-Nocard”.

Posteriormente hacia el final del siglo XIX la bacteria fue descrita por los bacteriólogos alemanes Lehmann y Neumann, quienes lo denominaron *Bacilo pseudotuberculosis* por la semejanza clínica de los nódulos caseosos producidos en la tuberculosis por *Mycobacterium tuberculosis*. Posteriormente, el organismo fue aislado

a partir de infecciones purulentas y linfangitis ulcerativa de otros mamíferos como cabras, caballos y seres humanos.

En 1948, en la VI edición del Manual de Bergey este patógeno adquiere su denominación actual, *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Euzeby, 1997). La etimología de la palabra "*Corynebacterium*" es de origen griego y hace referencia a la morfología y agrupación de la bacteria, mientras que "*pseudotuberculosis*" es derivado de "*pseudo*", que literalmente significa falso, y de "*tubérculo*", por la semejanza de la lesión con el nódulo que se forma en la tuberculosis (Brown y Olander, 1987).

La linfadenitis caseosa es una enfermedad cosmopolita, puesto que está presente en los cinco continentes y en casi en todas las zonas geográficas definidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Robins, 1991; Paton y cols., 2005; Baird y Fontaine, 2007; Ruiz y cols., 2007). El origen de la enfermedad parece provenir de Europa, y la expansión de *C. pseudotuberculosis* alrededor del mundo pudo deberse a la exportación de ovejas por los colonizadores del siglo XVIII a través de la raza ovina merino, de origen español, que fue exportada a Sudáfrica, Australia y al continente Americano (Paton, 2000).

Corynebacterium pseudotuberculosis es un microorganismo cosmopolita y la pseudotuberculosis una enfermedad de importancia a nivel mundial debido a su elevada prevalencia y originar grandes pérdidas económicas en las ganaderías ovina y caprina. Es una enfermedad muy difundida pero poco descrita por la comunidad científica (Abrigo, 1984; Çetinkaya y cols., 2002), por lo que la prevalencia en pequeños rumiantes es muchas veces subestimada debido a la falta de información existente en muchos países (Çetinkaya y cols., 2002). La linfadenitis caseosa se ha descrito en casi todos los países que presentan ganadería de pequeños rumiantes, habiéndose descrito en Canadá, Australia, Francia, Holanda, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Brasil, Suiza, Argentina, Uruguay, Venezuela, Turquía, Dinamarca, Cuba y España, entre otros (Songer y cols., 1988; Pepin y cols., 1989; Dercksen y cols., 1996; Literak y cols., 1999; Paton y cols., 1994; Ruiz y cols., 1995; Moller y cols., 2000; Williamson, 2001; Arsenault y cols., 2003, Chirino-Zarraga y cols., 2005). *Corynebacterium pseudotuberculosis* es capaz de sobrevivir en una gran variedad de regiones del mundo

(Chirrin-Zarraga y cols., 2005), no existiendo asociación entre el aislamiento del patógeno en función de la región climática.

La frecuencia de presentación en cada región o país depende de la densidad animal, del sistema de explotación y del método de diagnóstico empleado (inmunológico, palpación u observación post mortem). En estudios inmunológicos masivos suelen detectarse altas prevalencias superiores al 50%, y así se han detectado prevalencias en caprinos del 100% en la República Checa y del 77% en Brasil, mientras que en ovinos se describen prevalencias del 94% en Canadá y del 45% en España (Cubero y cols., 2002a).

El microorganismo se aísla de abscesos y otros procesos supurativos en una variedad de especies animales (Cubero y cols., 2002a). La infección clásica de *C. pseudotuberculosis* en pequeños rumiantes se asocian a la formación de piogranulomas (Valli y Parry, 1993). La enfermedad presenta dos formas clínicas bien diferenciadas, una típica, con producción de abscesos de localización cutánea y/o visceral, y una atípica como toxemia neonatal, artrosinovitis, endometritis, epididimitis, mastitis y orquitis (León y cols., 2002a), pudiendo coexistir ambas formas dentro del mismo animal.

La forma típica de localización cutánea se caracteriza por la abscedación de ganglios linfáticos, pudiendo ser palpados externamente. Los ganglios linfáticos superficiales afectados dependen del punto de entrada del organismo. Las lesiones pueden aparecer como abscesos organizados, con hinchazón, encapsulación fibrosa, pérdida de pelo sobrepuesto y ruptura eventual, dando por resultado la descarga de pus y necrosis de los ganglios linfáticos (Radostis y cols., 2000; León y cols., 2002a).

La forma típica de localización visceral se asocia a abscesos en los ganglios linfáticos internos y otros órganos. En ovejas y cabras, la principal localización de estas lesiones internas se localizan es los ganglios linfáticos del parénquima y del mediastino. Las lesiones también se pueden encontrar en hígado, riñones, ubre, y más raramente en corazón, testículos, escroto, útero, cerebro o médula espinal, causando deterioro en la condición orgánica del animal y pudiendo evolucionar hacia estados caquéticos de

curso crónico (Ponce de León y Gomes, 1983; Valli y Parry, 1993; Euzéby, 1997; Yeruham y cols., 2000; León y cols., 2002a).

Las formas atípicas son poco frecuentes, y las lesiones macroscópicas no se corresponden con nódulos caseosos, describiéndose la toxemia neonatal o icterohemoglobinuria de recién nacidos y las formas localizadas en las que la lesión es de naturaleza piógena (artrosinovitis, endometritis, epididimitis, mamitis y orquitis) (León y cols., 2002a).

El período de incubación es muy variable y prolongado. Tanto en ovejas como en cabras se han observado periodos de incubación de varios meses (4-6 meses) e incluso años (León y cols., 2002a). La enfermedad se instaura de modo insidioso y adopta un curso crónico, evolucionando hacia la recuperación cuando el contenido purulento escapa al exterior, al contrario de lo que ocurre en las formas viscerales graves donde se causa el deterioro de la condición orgánica del animal. La prevalencia es mayor en cabras y ovejas adultas mayores de 1 año, existiendo correlación directa entre la edad y la prevalencia de la enfermedad (Chirino-Zarraga y cols., 2005).

La enfermedad presenta una serie de diferencias en función de la especie afectada, y así, la distribución de las lesiones es diferente entre ovejas y cabras. En cabras los ganglios mandibulares o parotídeos están frecuentemente afectados, seguidos por el preescapular y los cervicales superficiales y subilíacos (Chirino-Zarraga y cols., 2005), mientras que los localizados en la zona perianal no se encuentran afectados (Brown y Olander, 1987). En ovejas, las lesiones en cabeza y cuello son relativamente raras, siendo los ganglios preescapulares y precurales los más afectados seguidos de otros de la superficie corporal. Esta diferencia podría ser un reflejo de las diferentes vías de transmisión del microorganismo. Durante la esquila de las ovejas se producen cortes que son una puerta de entrada para el microorganismo y por ello se encuentran afectados los nódulos superficiales. En cabras es más factible la transmisión directa por contacto entre heridas en la piel, por ingestión del microorganismo o a través de la mucosa bucal (Aleman y Spier, 2001; Chirino-Zarraga y cols., 2005). Otra diferencia observada es la morfología de los abscesos, y así, en ovinos la apariencia morfológica de los nódulos abscedados es la característica de capa de cebolla al presentar una distribución en láminas concéntricas fibrosas separadas por material caseoso. Por el

contrario, en cabras los nódulos no presentan esta configuración sino que el exudado es usualmente una pasta uniforme más bien seca. Esta diferencia podría deberse a la naturaleza de las enzimas fagocíticas, siendo en las cabras más licuefactivas que en el caso de las ovejas (Brown y Olander, 1987; Aleman y Spier, 2001).

Además de los abscesos de diferente localización, los animales afectados pueden presentar disminución del peso corporal, pérdidas en la producción de lana, retraso en la maduración sexual y abortos, ya que la infección por *C. pseudotuberculosis* se puede transmitir verticalmente provocando desórdenes reproductivos como abortos, mortalidad neonatal y reducción de la tasa de crecimiento de los corderos afectados, provocando la persistencia de la enfermedad dentro del rebaño (Alonso y cols., 1992).

Otras lesiones descritas en la linfadenitis caseosa, aunque mucho menos frecuentes son la artritis y la mamitis. La presentación de la artritis se produce de manera brusca, pero los animales se restablecen espontáneamente (Jubb y cols., 1993). La presencia de mastitis se ha observado ocasionalmente en ovejas, siendo más frecuente en las cabras, describiéndose como causa importante de mamitis bovina (Yeruham y cols., 1996). Además, se describen escasos casos de mortalidad causadas por este patógeno, debido a la formación de grandes abscesos pleuropulmonares (Jubb y cols., 1993).

De manera general, el curso clínico de la enfermedad es eminentemente crónico (Renshaw y cols., 1979), pero según el estudio de Ruiz y cols. (2003), tras la inoculación experimental del patógeno se produce fiebre efímera en los primeros días postinoculación, seguido de adenitis transitoria que se transforma en adenitis persistente, siendo los ganglios linfáticos más afectados los preescapulares (83,3%) y los submaxilares (50%), observándose dolor en los abscesos, que fluctúan en piel y tejido subcutáneo, reabsorbiéndose o evolucionando a la fistulización expulsando un material purulento característico. En este estudio, uno de los animales inoculados evolucionó hacia la forma visceral, no presentando abscesos externos pero sí una sintomatología general como erizamiento y caída del pelo, inapetencia, adelgazamiento, decaimiento, etc. También se observaron síntomas respiratorios en dos animales y reacción inflamatoria aguda en el punto de inoculación en todos los casos.

Aparte de los pequeños rumiantes como la oveja y la cabra, la infección por *C. pseudotuberculosis* también se describe en otras especies. En equinos se distinguen tres formas típicas, una con producción de abscesos superficiales en áreas pectorales y ventrales (91% de los casos), otra con producción de abscesos internos (8% de los casos), y una última forma con formación de linfangitis ulcerativa (1% de los casos) (Aleman y Spier, 2001). En ocasiones los nódulos linfáticos regionales (cervical superficial y axilar) desarrollan linfadenitis purulenta (León y cols., 2002a). Las formas atípicas de la enfermedad en equinos se asocian a abortos y mastitis. La enfermedad también se ha descrito en camélidos sudamericanos como llamas y alpacas (Braga y cols., 2006 y 2007), búfalos (Ali y Zaitoun, 1999) y camellos (Tejedor y cols., 2009).

En ganado vacuno la infección se presenta con una incidencia esporádica, manifestándose con abscesos cutáneos y linfangitis ulcerativas, mastitis y bronconeumonía necróticopurulenta (Yeruham y cols., 1996 y 1997; León y cols., 2002a). En rumiantes silvestres, la enfermedad ha sido descrita en ciervo, carnero salvaje, muflón y gamo, presentando las mismas localizaciones que las descritas anteriormente en ovinos (Cubero y cols., 2002a).

En el análisis histopatológico de los abscesos se observa en general un centro amorfo y eosinófilo de necrosis rodeado por una delgada capa de linfocitos, células plasmáticas, algunas células epitelioides y neutrófilos, rodeado por una red de fibroblastos (León y cols., 2002a; Baird y Fontaine, 2007).

El diagnóstico presuntivo de la infección por *C. pseudotuberculosis* en el animal se basa en la palpación de ganglios superficiales aumentados de tamaño, las características macroscópicas de los exudados, asociado a signos clínicos como fiebre y/o pérdida de peso, y datos epidemiológicos como la prevalencia de la enfermedad en la región y edad del animal infectado.

El diagnóstico definitivo se establece a través técnicas microbiológicas por cultivo del microorganismo a partir de abscesos obtenidos por necropsia o procedimientos quirúrgicos, técnicas serológicas y técnicas moleculares. El diagnóstico por técnicas microbiológicas incluye el cultivo de las muestras, tinción, pruebas

microbiológicas básicas en placa y tubo (morfología, movilidad, hemólisis, oxidasa, catalasa), y sistemas miniaturizados de galerías de identificación como API Coryne.

Corynebacterium pseudotuberculosis crece bien en agar sangre en 48 horas, observándose el desarrollo de colonias pequeñas, blancas, secas y rodeadas de una β -hemólisis parcial. Con la tinción de Gram, se observan cocobacilos cortos Gram positivos, normalmente agrupados en empalizada.

Se han evaluado diferentes sistemas miniaturizados para la identificación de este patógeno, como son los sistemas API Coryne (*bioMérieux*), API 20 Strep (Morrison y Tillotson, 1988) y Minitek identification system (BBL Microbiology Systems). Estos sistemas incluyen test enzimáticos y de fermentación de azúcares, siendo métodos de identificación rápidos pero que muchas veces requieren pruebas adicionales para confirmar una identificación definitiva (Lipsky y cols., 1982; Coyle y Lipsky, 1990, Funke y cols., 1997; Hommez y cols., 1999; Baird y Fontaine, 2007).

El diagnóstico por métodos serológicos se basa fundamentalmente en el uso de la técnica de ELISA desde que Shen y cols. (1982) describieran la primera aplicación de esta técnica para detectar anticuerpos contra un antígeno de la pared celular de *C. pseudotuberculosis*. A partir de entonces, la técnica ELISA ha demostrado ser una herramienta muy útil en el diagnóstico de la linfadenitis caseosa (Maki y cols., 1985; Sutherland y cols., 1987; Chikamatsu y cols., 1989; Kuria y Holtad, 1989; Laak y Schreuder, 1991; Laak y cols., 1992; Schreuder y cols., 1994), siendo una técnica muy empleada en los programas de erradicación de la enfermedad en zonas endémicas (Songer y cols., 1990; Menzies y cols., 1994; Dercksen y cols., 2000).

Otras técnicas serológicas descritas para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa incluyen la inmunofluorescencia indirecta (Simón y cols., 1987), microaglutinación, inmunodifusión (Menzies y Muckle, 1989), inhibición de la hemólisis sinérgica (Ruíz y cols., 1995), dot blot, western blotting (Ter Laak y cols., 1992), fijación de complemento (Shigidi, 1978) y la inhibición de hemólisis sinérgica (Real y León, 1990).

Finalmente, técnicas de biología molecular como la secuenciación del 16S rDNA y la técnica de la PCR han perfeccionado el diagnóstico de la enfermedad, al ser técnicas muy sensibles y específicas, pero más caras que las anteriormente descritas, si bien la diferenciación entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* puede ofrecer reacciones cruzadas, al ser dos especies genéticamente muy relacionadas, por lo que hay que recurrir a PCR múltiples en la correcta diferenciación entre estas dos especies del Género *Corynebacterium* (Çetinkaya y cols., 2002). Pacheco y cols. (2007) desarrollaron una PCR multiplex (mPCR) identificando tres genes diferentes presentes en *C. pseudotuberculosis*, el gen 16S rDNA, el gen *rpoB* y el gen *pld*, que codifica la exotoxina PLD, una esfingomielinasa implicada en la virulencia de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* (McNamara y cols., 1995).

El diagnóstico diferencial de la linfadenitis caseosa se realiza frente a otras enfermedades que desencadenan abscesos de características similares, entre las que destacan las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Actinomyces* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, así como traumatismos, cuerpos extraños, reacciones de sensibilidad a inyectables y tumores (Burrel, 1980; Aleman y Spier, 2001; León y cols., 2002b).

La vacunación en zonas donde la prevalencia es alta se presenta como el mejor método para la prevención, control y erradicación de la enfermedad, siendo el campo más investigado actualmente desde que Cameron (1972) utilizara una suspensión de *C. pseudotuberculosis* inactivada por formalina para la vacunación de ovejas merino, consiguiendo protección frente a la muerte aguda o subaguda, pero no frente al desarrollo de abscesos.

Años más tarde, Nairn y cols. (1977) analizaron el efecto protector del toxoide mediante la exotoxina cruda concentrada y formalinizada en un grupo de 24 ovejas, obteniendo la reducción significativa de la formación de abscesos entre el grupo control y el grupo de ovejas inoculadas con el toxoide, demostrando el importante papel de la exotoxina en el desarrollo de la enfermedad, hecho confirmado unos años después en el estudio de Anderson y Nairn (1984).

A partir de estos años, se han realizado multitud de estudios analizando la eficacia de diferentes vacunas, como la asociación de una bacterina inactivada con

formalina asociada a hidróxido de aluminio como adyuvante (LeaMaster y cols., 1987), células enteras con el adyuvante muramil dipéptido (Brogden y cols., 1990), el bacilo de Calmette y Guerin por su probada actividad frente al *Micobacterium bovis* (Real y León, 1990), células enteras asociadas a toxoide (Eggleton y cols., 1991a) y toxoide purificado por métodos cromatográficos (Eggleton y cols., 1991 a-b). El inicio de las vacunas con técnicas de biología molecular e ingeniería genética se produce a partir de los trabajos de Hodgson y cols. (1992) con la delección del gen de la fosfolipasa D, disminuyendo así la virulencia de la cepa de *C. pseudotuberculosis* modificada. Un año después, se describieron sitios específicos del gen que codificaban para la toxina PLD, y que al ser alterados producían la inactivación de la toxina secretada (Tachedjian y cols., 1995). El uso de autovacunas específicas también ha ofrecido buenos resultados en la inmunización de rebaño (León y cols., 2002a).

En el año 2003, investigadores peruanos analizaron la eficacia de una vacuna elaborada a partir de precipitado proteico de *C. pseudotuberculosis* con las exotoxinas en ratones albinos inoculados con *C. pseudotuberculosis*, observando una disminución de las lesiones producidas, así como la disminución del número y tamaño de los abscesos en el grupo de animales vacunados (Medrano y cols., 2003).

Junto a la vacunación, unas buenas medidas de manejo, higiene y desinfección son fundamentales para el control de la enfermedad en el rebaño. La mayoría de los desinfectantes comunes, como lejía, glutaraldehido, formaldehido y yodóforos son muy eficaces en la eliminación del microorganismo, pero la presencia de materia orgánica dificulta su actividad, facilitando su diseminación (Ismail y Hamid, 1972) como ocurre en los exudados purulentos (Nairn y Robertson, 1974).

Un correcto manejo del colectivo es fundamental para disminuir la incidencia de presentación de esta enfermedad, destacando el esquila y baño de animales infectados de forma separada, el control de moscas, mantener unas buenas prácticas de higiene y desinfección durante el esquila, así como la limpieza y desinfección de instrumentos y ambientes donde se ha producido la ruptura de los abscesos (Paton y cols., 1994; Aleman y Spier, 2001). Además, otros investigadores recomiendan la eliminación de todo animal positivo, presente o no síntomas (Cubero y cols., 2002b).

La mayoría de los antibióticos de amplio espectro son muy eficaces en el control *in vitro* del crecimiento y multiplicación de este patógeno (Muckle y Gyles, 1982; Coyle y Lipsky, 1990; Judson y Songer, 1991; Von Graevenitz y Krech, 1992; Aleman y Spier, 2001). Sin embargo, *in vivo*, el agente causal de la linfadenitis caseosa generalmente es refractario a la terapia antibiótica, debido a su encapsulación en los abscesos (Aleman y Spier, 2001; Williamson, 2001) y a la naturaleza intracelular del microorganismo durante el ciclo de la enfermedad, por lo que el tratamiento quirúrgico de lesiones externas se ha sugerido como una alternativa válida (Davis, 1990; Aleman y Spier, 2001). Si bien es cierto que en estudios recientes usando la combinación de rifampicina (antibiótico con actividad intracelular) y oxitetraciclina se produjo la disminución del tamaño de las lesiones de los nódulos linfáticos externos de ovejas tratadas (Senturk y Temizel, 2006), pero el estudio no reflejó si el colectivo llegó a declararse libre de la enfermedad, por lo que se hacen necesarios nuevos trabajos que confirmen que este tratamiento se convierta en una alternativa viable y efectiva en el control de la linfadenitis caseosa (Baird y Fontaine, 2007).

En la eliminación quirúrgica del absceso, tras el drenaje se recomienda una limpieza diaria con antisépticos como soluciones yodadas, así como la aplicación de un tratamiento antibiótico parenteral durante 4-6 semanas para evitar la reaparición de las lesiones, aunque esta técnica presenta detractores que abogan por la eliminación completa del ganglio afectado (Gezon y cols., 1991; Rizvi y cols., 1997; Alemán y Spier, 2001; Baird y Fontaine, 2007).

A día de hoy, la discusión sobre los mejores métodos de control de la linfadenitis caseosa continúa. Muchos abogan por el uso de la vacunación, y la describen como la principal estrategia en el control de la enfermedad en zonas endémicas, pero la inexistencia de políticas de obligatoriedad en la vacunación frente a la linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes facilita la diseminación de la infección. Sin embargo, investigaciones recientes indican que las vacunas actualmente en uso no están ofreciendo los resultados esperados para una eficaz prevención de la enfermedad (Fontaine y cols., 2006), por lo que el sector está demandando el desarrollo de nuevas vacunas que proporcionen una protección más completa y clarificar los mecanismos por los que *C. pseudotuberculosis* persiste en el hospedador (Fontaine y Baird, 2008; Baird y Malone, 2010).

La infección por *C. pseudotuberculosis* en el hombre ha sido reconocida como una enfermedad ocupacional en países productores de pequeños rumiantes (Prospert y cols., 1991; Bartolomé y cols., 1995; Peel y cols., 1997; Romero y cols., 2004; Liu y cols., 2005; Join-Lambert y cols., 2006), siendo considerado un patógeno oportunista (Coyle y Lipsky, 1990) en personas inmunodeprimidas (Lipsky y cols., 1982; Funke y cols., 1997) con desarrollo de adenopatías en diferentes localizaciones en función de la zona de entrada del patógeno, con presencia de fatiga, mialgias, hepatomegalia, fiebre, falta de apetito, pérdida de peso, dolores musculares y articulares, aunque también se ha descrito un episodio grave de neumonía eosinofílica (Goldberger y cols., 1981).

II. 2. APLICACIONES ACTUALES DEL CULTIVO CELULAR A LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA

El cultivo celular engloba un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, conservando sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Las aplicaciones que presenta el cultivo celular abarcan un gran número de disciplinas.

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX, cuando Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El primer investigador que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, fue Harrison en cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios, pero rápidamente el interés se centró en el cultivo de células de animales homeotermos, especialmente humanas, por su gran interés médico. En la actualidad, los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas:

- Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, etc.

- Flujo intracelular. Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ejemplo ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del RNA, etc.

- Ecología celular. Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación, de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular, etc.

- Interacciones celulares. Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.

Como ejemplo de áreas de investigación que usan técnicas de cultivo celular podemos citar las siguientes:

- Virología: establecimiento de condiciones de cultivo de virus, estudio de la interacción del virus con su huésped, producción de vacunas antivirales, etc.

- Bacteriología: Estudios de adherencia e invasión bacteriana.

- Investigación del Cáncer.

- Inmunología. Gracias especialmente a la introducción de las técnicas de fusión celular en la producción de anticuerpos monoclonales, así como en el análisis de la genética de la célula somática.

- Ingeniería de proteínas. Por la producción de proteínas en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento,...

- Estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo. Comprende el estudio de los receptores y de las vías de translocación de la señal.

- Aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad,...

- Aplicaciones médicas: mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.

- Aplicaciones industriales y agronómicas: producción por reproducción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial.

Los cultivos celulares permiten un control preciso y fino del medio ambiente intracelular, la caracterización y homogeneidad de la muestra, una economía en el uso de reactivos, evitando a su vez el sacrificio de miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo *in vivo* pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Como desventajas en el uso de los cultivos celulares, destacar la fácil contaminación del cultivo por hongos, bacterias y micoplasmas, su elevado coste, la inestabilidad de muchas líneas celulares continuas, y su extrapolación al modelo *in vivo*. Las células de mamíferos se cultivan y mantienen como norma general a una temperatura 37°C con un 5% de CO₂, pero estas condiciones de cultivo pueden variar para cada tipo celular, afectándose la expresión de diferentes fenotipos en función de las condiciones de cultivo.

En general, al ser un procedimiento donde se tienen controlados todos los pasos, en los últimos años se ha atribuido como método de referencia para dilucidar las distintas etapas que se producen en la colonización y difusión de los tejidos por parte de distintos patógenos. De ahí que estos estudios han sido ampliamente utilizados para profundizar en el conocimiento de la patogenia de algunos parásitos intracelulares, como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (Galán, 1994; Zierler y Galán, 1995); *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexineri* (Cossart y Lecuit, 2000).

II.3.- PROCESOS DE ADHERENCIA E INVASIÓN CELULAR POR LAS BACTERIAS

En el establecimiento de la infección de bacterias patógenas se requiere de la adhesión a células del hospedador, colonización de los tejidos, y en determinados casos, la invasión celular seguida de la multiplicación intracelular, diseminación a otros tejidos o persistencia (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006).

II.3.1.- ADHERENCIA CELULAR

La interacción entre bacterias y los tejidos del huésped o proteínas solubles es crucial en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades infecciosas, tanto para la adhesión primaria y la colonización tejido-específica como para la invasión del patógeno en los diferentes tejidos de su huésped. La adherencia bacteriana ocurre entre moléculas de superficie del microorganismo que pueden ser fimbriales o afimbriales y receptores del huésped generalmente constituidos por glicolípidos o glicoproteínas.

En el inicio de la infección, una vez que la bacteria atraviesa la puerta de entrada del organismo, intentará adherirse a la superficie celular adyacente, siendo este hecho sumamente importante en regiones anatómicas tales como la boca, intestino delgado y el tracto urinario, ya que las mucosas implicadas están afectadas por diversos fluidos que arrastran con facilidad microorganismos no adheridos, así como el peristaltismo, movimiento ciliar o el recambio de células del epitelio y de la capa mucosa (Hultren y cols., 1993; Preissner y Shingh, 2000). Sin embargo, aún en zonas relativamente estancadas, tales como el colon y el tracto vaginal, el movimiento Browniano puede separar de la superficie tisular a las bacterias que no han logrado fijarse con firmeza a las células del hospedador. A este respecto, es oportuno tener en cuenta que la mayoría de los patógenos se pueden unir de manera más o menos estable a los tejidos (Heithoff y cols., 1997; Dalton y March, 1998). Debido a todo esto, las bacterias no adherentes son rápidamente eliminadas por estos mecanismos inespecíficos de defensa del hospedador.

La unión a la célula puede conducir a alteraciones estructurales y/o funcionales de las proteínas del huésped y a la activación de mecanismos celulares que incluyen a la invasión del patógeno a células y tejidos, facilitando no solo la entrada de patógenos a

las células del huésped, sino que así también éstos puedan escapar de la acción de ciertos antibióticos y de la respuesta inmune (Preissner y Shingh, 2000; Tran Van y Sansonetti, 2000).

Entre las estrategias usadas por las bacterias patógenas para adherirse a células no fagocíticas destacamos las siguientes:

- Adhesinas: Las adhesinas son componentes de la superficie celular o apéndices bacterianos que facilitan la adhesión. En bacterias Gram negativas, la gran mayoría de sus fimbrias funcionan como adhesinas, pero en muchos casos la verdadera adhesina es una proteína de una subunidad menor en la punta de la fimbria. Por el contrario, en bacterias Gram positivas, proteínas de superficie o polisacáridos actúan como adhesinas específicas. Diversas adhesinas microbianas pueden mediar la unión a los tejidos, al inicio de la infección, pudiendo unirse a células no fagocíticas o a la matriz extracelular y muchos microorganismos invasivos entran a la célula del huésped después de unirse a estructuras de superficie. Existen una gran cantidad de adhesinas bacterianas, incluyendo componentes de la matriz extracelular como colágeno, lamininas, elastina, proteoglicanos e hialuronos.

- Pili o fimbrias: El mecanismo más conocido de adherencia bacteriana involucra la formación de enlaces mediados por proteínas fibrilares denominadas pili o fimbrias. Un pilus se constituye básicamente por una secuencia ordenada de subunidades proteicas de pilina que forman una estructura cilíndrica. Los pili son largos, flexibles y se extienden hacia el exterior de la superficie bacteriana para interactuar con la célula hospedadora. La punta de los pili media en la adherencia bacteriana uniéndose a ciertas moléculas ubicadas sobre la superficie de las células de los tejidos. Por lo general, estos receptores de las adhesinas fimbriales corresponden a carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos, cuya función primaria consiste en mantener unidas a las células de los tejidos. La unión de los pili a su célula diana es tan específica, que los receptores presentes en los tejidos del hospedador determinan el tipo de bacterias que colonizan la zona implicada. En algunos casos, la unión “específica” entre el carbohidrato superficial de la célula hospedadora y el extremo distal del pilus depende de otras proteínas localizadas precisamente en la punta de la fibrilla. No obstante, numerosas reacciones de adhesión

se basan en la participación directa de la pilina (Deitsch y cols., 1997; Finlay y Falkow, 1997; Hacker y cols., 1997).

- Adhesinas no fimbriales: Algunas bacterias poseen proteínas superficiales cuya estructura y proceso de ensamblaje difieren de los observados en los pili, aunque también funcionan eficazmente como determinantes de adherencia. Dichas sustancias reciben genéricamente el nombre de “adhesinas no fimbriales” y su participación suele ser independiente de la ausencia o presencia de pili. Además, buena parte de ellas reconocen como sus receptores a ciertas proteínas superficiales de tejidos diana en lugar de unirse a carbohidratos (Hacker y cols., 1997; Edwards y Puente, 1998). Dado que prácticamente todos los estudios asociados a los pili se han realizado en bacterias Gram negativas, aún persisten diversas dudas acerca de estas estructuras de adherencia en las bacterias Gram positivas.

II.3.2.- INVASIÓN CELULAR

De acuerdo con numerosos autores, las dos propiedades que confieren patogenicidad a las bacterias son la toxigenicidad y la invasividad. En cuanto a la toxigenicidad, se define como la capacidad para producir toxinas, mientras que la invasividad se refiere a la facultad para penetrar, establecerse, reproducirse y diseminarse en los tejidos del hospedador (Heithoff y cols., 1997; Quinn y cols., 1997; Smith, 1998). Algunas bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten ingresar a las células hospedadoras, incluidos los fagocitos profesionales (neutrófilos y macrófagos). Para lograr lo anterior, se adhieren íntimamente a dichas células y provocan cambios significativos en su citoesqueleto, que derivan en el englobamiento del microorganismo, a través de un proceso similar al de la fagocitosis macrofágica, en el que tiene lugar la polimerización y despolimerización de la actina, para dar lugar a los pseudópodos “fagocitarios”. En este sentido, las proteínas bacterianas que estimulan el fenómeno suelen denominarse “invasinas” o “factores de invasión” (Lee, 1996; Keisari, y cols., 1997; Quinn y cols., 1997; Casadevall, 1998).

Esta clase de ingreso o internalización en las células hospedadoras diferentes de los fagocitos profesionales puede o no involucrar la formación de estructuras análogas a

los fagosomas. En el primer caso, la bacteria pasa directamente al citoplasma de la célula invadida y, en el segundo, requiere de la síntesis de alguna exoproteína que destruye la membrana que la envuelve o forma poros en ella (Pollard, 1995; Ojcius y cols., 1996; Kotwal, 1997). En todo caso, un microorganismo capaz de sobrevivir y reproducirse en el interior de las células hospedadoras obtiene importantes beneficios, tales como el de contar con alta concentración de nutrientes y estar protegido contra la acción de los anticuerpos, el complemento y diversos antibióticos al situarse en un nicho protegido, así como, en algunos casos, conferirle la capacidad de pasar a través de las barreras epiteliales (Ireton y Cossart, 1998).

Cabe subrayar que, al liberarse de los fagosomas de los fagocitos profesionales, el agente invasor también evade los efectos antimicrobianos del contenido lisosomal, el cual se vierte sobre dichos fagosomas después de que ocurre la fusión fagolisosomal (Keisari y cols., 1997). El estudio de la fagocitosis forzada por bacterias no puede llevarse a cabo en órganos o animales de experimentación, requiriendo el uso de cultivo celulares provenientes de mamíferos.

Como hemos comentado anteriormente, la fagocitosis por fagocitos profesionales y la invasión bacteriana son mecánicamente similares, ya que ambas son iniciadas por interacción ligando-receptor que activa una serie de señalizaciones en la célula huésped, permitiendo que el citoesqueleto de actina proporcione la fuerza necesaria para internalizar la partícula dentro de una vacuola. Así, las bacterias con capacidad invasiva han desarrollado dos mecanismos principales de internalización, el “*zipper*” y el “*trigger*”. La internalización tipo “*zipper*” involucra el contacto directo entre ligando bacteriano y receptores celulares que circundan al microorganismo, mientras que en la internalización tipo “*trigger*” la bacteria envía señales a la célula para inducir protrusiones membranosas y reorganización del citoesqueleto que conducen a la macropinocitosis y a una virtual entrada pasiva de la bacteria. Estos dos mecanismos de invasión han sido ampliamente estudiados en patógenos intracelulares facultativos, como *Yersinia pseudotuberculosis* y *Listeria monocytogenes* con internalización tipo “*zipper*”, o *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* que utilizan la tipo “*trigger*” (Cossart y Lecuit, 2000).

La capacidad de ciertas bacterias de invadir células no fagocíticas, como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp y *Shigella* spp., es considerado como un importante factor de virulencia (Galán, 1994; Zierler y Galán, 1995), y así, el estudio de la adherencia e invasión celular, tanto *in vivo* como *in vitro*, son usados actualmente para profundizar en diferentes aspectos de la patogenia de las enfermedades infecciosas.

Este tipo de estudios se han llevado a cabo en multitud de especies bacterianas, como los realizados en *Haemophilus influenzae*, donde se demostró capacidad invasiva en células humanas (Ketterer y cols., 1999), *Klebsiella pneumoniae* (Oelschlaeger y Tall, 1997), donde además de demostrar la capacidad de invadir células epiteliales, describieron que la despolarización de microfilamentos de actina inhibía su internalización, *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Harvey y cols., 1997; Edwards y cols., 2000) y *Campylobacter jejuni* como invasora de células intestinales de origen humano (Monteville y Konkel, 2002; Monteville y cols., 2003). En todos estos patógenos se asume que la internalización bacteriana es un mecanismo de virulencia.

Tradicionalmente, salvo en el caso de las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasivas, las infecciones por *E. coli* se catalogaban como extracelulares, por lo que se consideraba que causaba daño únicamente por la expresión de productos tales como toxinas. Sin embargo, se ha demostrado que infecciones intestinales causadas por *E. coli* no enteroinvasivas, pueden incluir una fase intracelular, tanto a nivel intestinal (Meier y cols., 1996) como extraintestinal (Palmer y cols., 1997; Prasadarao y cols., 1999; Kim, 2001; Kansau y cols., 2004).

Aun cuando se ha establecido el papel de algunos factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* en el desarrollo de la linfadenitis caseosa, poco se conoce acerca de las interacciones de la bacteria con los componentes de la matriz extra e intercelular. Por otra parte, tampoco se ha analizado la interacción de *C. pseudotuberculosis* con células estables en cultivo considerando para esto, la especificidad del hospedador y la vía natural del inicio de la infección, con la ventaja de que este tipo de estudio podría representar un modelo más adecuado para el estudio de diversos aspectos del desarrollo de la enfermedad.

II.4.-EXPLOSIÓN RESPIRATORIA Y CONTENIDO EN PEROXIDASA

Durante el proceso de fagocitosis se produce un incremento en el consumo de glucosa y oxígeno que se denomina explosión respiratoria, también conocida por estallido oxidativo. El resultado de dicha explosión genera varios compuestos con contenido de oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales superóxido) que son los encargados de la degradación de partículas internalizadas y bacterias en el interior de los leucocitos. El mecanismo por el cual las células producen especies reactivas de oxígeno implica la acción de una enzima llamada oxidasa de NADPH, y esta enzima es capaz de emplear NADPH como agente reductor para reducir el oxígeno libre (O_2) a superóxido, el cual se combina espontáneamente con otras moléculas para producir radicales libres muy reactivos, entre los cuales se encuentran los aniones hidróxido, peróxido, hipoclorito, hipoyodito y el óxido de nitrógeno entre otros. El estallido respiratorio en las células fagocíticas es tan potente y violento que la mayor parte de las veces causa la muerte de la célula por consumo de equivalentes de reducción, por la formación de radicales libres y por desbalances en los potenciales de hidrógeno.

Además, los leucocitos poseen mieloperoxidasas en sus gránulos citoplasmáticos, que en presencia de haluro y peróxido de hidrógeno, destruyen a las bacterias por halogenación de su pared celular. La inhibición de estos mecanismos por parte de ciertas bacterias se ha descrito como un importante mecanismo de virulencia de algunos patógenos en mamíferos (McCaffrey y Allen, 2006) y peces (Boesen y cols., 2001), permitiendo la supervivencia de la bacteria en el interior de los leucocitos y, finalmente, inducir la muerte mediante la activación de caspasas relacionadas con la apoptosis (Hacker y cols., 2002).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. CEPAS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* UTILIZADAS

Tres cepas clínicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* empleadas en este estudio fueron recolectadas de diferentes explotaciones caprinas de la isla de Gran Canaria. Las muestras se obtuvieron tras extracción aséptica de material purulento y fluido caseoso de abscesos subcutáneos de diferentes regiones anatómicas, como la región submandibular y región mamaria de cabras por aspiración con aguja fina, tras desinfección previa. Posteriormente, las muestras se trasladaron refrigeradas al laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). También utilizamos una cepa de referencia, la cepa *C. pseudotuberculosis* 808T de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

III.1.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

Las muestras clínicas se sembraron en medio Agar Sangre (AS) (Pronadisa) y fueron incubadas a 37°C durante 48-72 horas en aerobiosis. Las cepas aisladas fueron sometidas a la siguiente batería de pruebas convencionales (tinción de Gram, movilidad, oxidasa y catalasa) mediante la metodología descrita por Smibert y Krieg (1981), así como al sistema de identificación miniaturizado API Coryne (*bioMérieux*). A modo de confirmación, todas las cepas fueron sometidas a identificación por la técnica de la PCR-*mutiplex* para regiones específicas de los genes 16S rRNA y *PLD* (que codifica para la fosfolipasa D) (Tabla 1), según indican trabajos previos (Cetinkaya y cols., 2002; Pacheco y cols., 2007).

Para la extracción del ADN usamos el kit comercial de extracción de Invitrogen (Invitrogen), y seguimos las instrucciones del fabricante. Tras el cultivo de cada cepa, se procede a realizar una suspensión en 1 ml de PBS y posteriormente se centrifuga durante 2 minutos a 14.000 rpm. Tras desechar el sobrenadante, resuspendemos el *pellet*

en 480 μ l de EDTA (50 mM) y adicionamos 120 μ l de enzima de lisis (Proteasa alcalina), incubamos a 37°C durante 60 minutos, y finalmente centrifugamos durante 2 minutos a 14.000 rpm. Eliminamos el sobrenadante, y adicionamos 600 μ l de solución de lisis, mezclamos e incubamos a 80°C durante 5 minutos. Posteriormente dejamos la muestra a temperatura ambiente y adicionamos 3 μ l de solución RNasa, incubando la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Tras esta incubación, adicionamos 200 μ l de solución precipitadora de proteínas, mezclamos con vórtex, e incubamos en hielo durante 5 minutos, para posteriormente obtener el precipitado, tras centrifugación a 14.000 rpm durante 3 minutos, y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf con 600 μ l de isopropanol. Tras un suave movimiento para facilitar la disolución, centrifugamos durante 2 minutos a 14.000 rpm para posteriormente retirar el sobrenadante y adicionar 600 μ l de etanol al 70%. Centrifugamos a 14.000 rpm durante 2 minutos y repetimos el último paso. Retiramos el etanol y dejamos secar el *pellet* durante 15 minutos sobre papel absorbente para, finalmente, rehidratar el *pellet* de ADN en 100 μ l de solución de rehidratación durante 1 hora a 65°C o durante toda la noche a 4°C.

Para la realización de la PCR-*multiplex* usamos un volumen final por reacción de 25 μ l, formada por 2,5 μ l de buffer, 0,5 μ l de la mezcla de nucleótidos, 0,75 μ l de cloruro de magnesio, 0,3 μ l de la enzima Taq polimerasa, 0,25 μ l de cada cebador (Tabla 1), 2 μ l de ADN, completando hasta los 25 μ l con 17,95 μ l de agua Milli-Q. La PCR-*multiplex* se llevó a cabo en un termociclador C1000 Thermal Cycler (Biorad), con una desnaturalización inicial de 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto para la desnaturalización, 58°C durante 40 segundos para la alineación, y 68°C durante 90 segundos para la elongación de la cadena, acabando con un ciclo de elongación final a 68°C durante 7 minutos. La visualización de los productos amplificados en la técnica de la PCR se realizó por electroforesis a 120 voltios durante 40 minutos en geles de agarosa al 2% con 1,5 μ g/ml de bromuro de etidio, usando un marcador de peso molecular de 50-2000 pares de bases (Biorad).

Tabla 1. Descripción de los cebadores utilizados para la amplificación de regiones específicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Gen	Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Producto Amplificado	Referencia
16S Rrna	16S-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	816 pb	Cetinkaya y cols. (2002)
	16S-R	TCTCTACGCCGATCTTGAT		
PLD	PLD-R1	ATCAGCGGTGATTGTCTTCC	203 pb	Pacheco y cols. (2007)
	PLD-R2	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG		

III.1.2. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Una vez confirmada la identificación como *C. pseudotuberculosis* de las cepas aisladas, su conservación se hizo mediante congelación a -80°C en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) (Pronadisa) adicionado de glicerol al 15%. También fueron conservadas mediante liofilización en el banco de cepas del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del IUSA, utilizando para ello el liofilizador Cryodos-50 (Telstar).

III.1.3. PERFIL DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

La susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas se realizó por el método estándar de difusión de discos en agar (Bauer y cols., 1966) en el medio Agar Sangre.

III.2. ESTUDIO DE LA DE ADHERENCIA E INVASIÓN CELULAR DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LÍNEA CELULAR NO FAGOCÍTICA

Los diferentes ensayos correspondientes a este apartado se realizaron por triplicado en placas de cultivo celular de 24 pocillos (Corning) con la línea celular no fagocítica de origen ovino FLK-BLV-044. Los ensayos descritos a continuación se basan en la metodología descrita por Isberg y Falkow (1985) y Pizarro-Cerdá y cols. (2002).

III.2.1. LÍNEA CELULAR

Para las experiencias de adherencia e invasión celular usamos la línea celular FLK-BLV-044, que adquirimos en el *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (referencia: ACC 153). Es una línea estable fibroblástica de células embrionarias de riñón ovino. La línea celular se cultivó utilizando el medio DMEM (Sigma) suplementado con un 10% de suero fetal bovino descomplementado, y se cultivó a 37°C con un 5% de CO₂. La línea celular se conservó mediante congelación a -80°C y en nitrógeno líquido.

III.2.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

Para la estandarización de los ensayos de adherencia e invasión celular determinamos previamente la curva de crecimiento de *C. pseudotuberculosis* para calcular el momento en que la bacteria se encuentra al final de su fase de crecimiento exponencial. Para ello partimos de medio de cultivo BHIB adicionado de 0,1% de Tween 80, donde sembramos *C. pseudotuberculosis*, realizándose lecturas de la densidad óptica del cultivo por espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda y, paralelamente, realizando diluciones seriadas y recuento de UFC/ml de cada uno de esos momentos de lectura.

III.2.3. DETERMINACIÓN DE LAS TASAS DE ADHERENCIA E INVASIÓN CELULAR DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LA LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044

Las cuatro cepas usadas en este estudio descritas en el punto III.1 se cultivaron en medio AS a 37°C durante 48 horas para obtener cultivos al final de su fase exponencial. Al mismo tiempo se prepararon las células en placas de 24 pocillos a una confluencia del tapiz del 80-90%. Cada pocillo se inoculó con 20 μ l (condición estándar) de cada una de las cepas probadas tras las 48 horas de incubación, correspondiéndose con una multiplicidad de infección (MOI) de $100 \approx 1$, es decir, 100 bacterias por cada célula. Una vez inoculadas, las placas se centrifugaron a 450 rpm durante 5 minutos para promover la adherencia bacteriana y fueron incubadas a 37°C. Transcurridas cuatro horas de la infección procedemos al recuento de bacterias totales (adheridas e internas). Para ello, realizamos el lavado de cada pocillo retirando el medio de cultivo celular y adicionando PBS, para volver a retirar el PBS adicionado y volver a sustituirlo con PBS para, posteriormente, lisar las células del tapiz con 100 μ l de tritón X-100 al 0,2%. Seguidamente, realizamos recuento en placa mediante diluciones seriadas, obteniendo la suma de bacterias adheridas e internas (bacterias totales) para cada una de las 4 cepas probadas. Para determinar la tasa de invasión, los pocillos inoculados bajo las mismas condiciones mencionadas en la determinación de las bacterias totales, tras 4 horas de incubación se lavan 3 veces con PBS estéril y se añade 500 μ l de medio DMEM con gentamicina a una concentración de 200 μ g/ml durante 2 horas para eliminar las bacterias adheridas al tapiz celular. Transcurridas estas 2 horas, procedemos a eliminar los restos de antibiótico mediante lavados sucesivos con PBS. Posteriormente, añadimos 100 μ l de tritón X-100 al 0,2% para lisar las células del tapiz y para que liberen las bacterias intracelulares que han escapado a la acción bactericida del antibiótico. Posteriormente, realizamos recuento en placa tras diluciones seriadas en PBS, determinando así la tasa de invasión para cada cepa. La tasa de adherencia bacteriana será la diferencia entre el recuento de bacterias totales y las internalizadas en las células.

III.2.4. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE INFECCIÓN EN LA INVASIÓN DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LA LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044

El objetivo de esta prueba es determinar el tiempo que necesita *C. pseudotuberculosis* para penetrar en la línea celular ovina FLK-BLV-044. Para ello, tras realizar la infección de los pocillos a una MOI $100 \approx 1$ con las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis*, mantenemos tiempos de infección de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos. Tras estos periodos, procedemos al lavado de cada pocillo con PBS y añadimos 500 μ l de medio de cultivo celular DMEM con gentamicina (200 μ l/ml) durante dos horas. Transcurrido ese tiempo, lavamos los pocillos tres veces con PBS estéril, lisamos con tritón y sembramos para realizar el recuento de las bacterias internas para cada uno de los diferentes tiempos utilizados, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

III.2.5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO EN LA INVASIÓN DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LA LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044

El objetivo de este ensayo es determinar la existencia de receptores celulares implicados en la invasión celular y su posible saturación tras el aumento de la multiplicidad de la infección (MOI), es decir, el número de bacterias por cada célula. Para este ensayo cultivamos nuestras cepas en medio AS a 37°C durante 48 horas para obtener un cultivo en fase exponencial, e infectamos diferentes pocillos con una suspensión de *C. pseudotuberculosis* en PBS a una MOI de $5 \approx 1$, $25 \approx 1$, $50 \approx 1$, $100 \approx 1$ y $150 \approx 1$, respectivamente. El resto del ensayo sigue la misma metodología descrita anteriormente en ensayos previos.

III.2.6. PERSISTENCIA INTRACELULAR DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* Y TASA DE REPLICACIÓN INTRACELULAR (ÍNDICE I_{PRO}) EN LA LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044

El objetivo de esta prueba es determinar si una vez producida la invasión, nuestras cepas se mueren en el interior celular, quedan latentes, o son capaces de

multiplicarse/replicarse activamente. Para este ensayo usamos un tapiz celular con una confluencia del 60%-70% debido a que este ensayo se va a prolongar durante varios días. Se infectan placas de 24 pocillos con nuestras cepas a una MOI $100 \approx 1$ de la misma forma que como se describió en el punto III.2.3. Transcurridas 4 horas de incubación, procedemos a la eliminación del medio de cultivo en los pocillos y realizamos tres lavados con PBS. Posteriormente añadimos medio de cultivo con gentamicina a una concentración de 200 $\mu\text{l/ml}$ para eliminar bacterias adheridas. Tras una incubación de dos horas con gentamicina, para determinar el punto de inicio, tres pocillos por cada cepa se lavan tres veces con PBS, se añade tritón X-100 al 0,2% y se procede al recuento en placa. Para determinar los siguientes puntos de muestreo, en el resto de pocillos se elimina el medio de cultivo con gentamicina a 200 $\mu\text{l/ml}$ y se sustituye por medio de cultivo con gentamicina a una concentración de 20 $\mu\text{l/ml}$ con el fin de mantener un ambiente extracelular estéril y se realizan recuentos de las bacterias intracelulares a las 24, 48, 72, 96, 120 y 148 horas.

La tasa de replicación intracelular (índice I_{PRO}) expresa la relación existente entre el número de bacterias intracelulares viables presentes a las 24 horas con las presentes tras 4 horas postinfección.

III.2.7. EFECTO DE LA PREINCUBACIÓN CON ANTISUERO DE CONEJO FRENTE A *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LA LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044

El objetivo de este ensayo es analizar si un antisuero anti-*C. pseudotuberculosis* elaborado en conejo bloquea ligandos específicos bacterianos impidiendo su unión a receptores celulares, afectando por tanto a la invasión de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044. La obtención del antisuero policlonal anti-*C. pseudotuberculosis* para la técnica de la inmunofluorescencia se realizó según la metodología descrita por Harlow y Lane (1988) y Acosta y cols. (2002), utilizándose 2 conejos de unos 2 Kg de peso procedentes de una explotación con un alto nivel sanitario. Ambos animales fueron desparasitados y adaptados a nuestro animalario, inspeccionándolos periódicamente durante dos semanas para garantizar su buen estado de salud previo a la inmunización. A cada animal se le administró 2 ml de un inóculo compuesto por 1 ml de una suspensión de la cepa *C. pseudotuberculosis* IUSA-1

inactivada y 1 ml de Adyuvante de Freund incompleto (Sigma) repartidos en 10 puntos de inoculación por vía subcutánea en la zona lumbar. La suspensión inactivada de *C. pseudotuberculosis* se realizó con un cultivo en fase exponencial de *C. pseudotuberculosis* IUSA-1 adicionando un 5% de formol e incubando durante 24 horas a 37°C para inactivar las bacterias. A las 24 horas tomamos una alícuota de 100 µl de la suspensión y la sembramos en una placa de AS a 37°C, e incubamos durante 48 horas para garantizar la inexistencia de bacterias vivas.

Tras cinco semanas desde la primera inoculación, se les aplicó una segunda dosis de recuerdo con un inóculo preparado de forma similar a la primera inoculación, para provocar así una buena hiperinmunización. A los 15 días de esta segunda inoculación se procedió a la sangría completa de los conejos por punción cardíaca (previamente anestesiados mediante la aplicación subcutánea de una solución compuesta por 0,2 ml de acepromacina y 0,4 ml de ketamina). Una vez obtenida la sangre, se conservó refrigerada durante 3 horas, y posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos para la separación de fases. El suero se conservó a -80°C para ser usado posteriormente en la determinación del efecto de la preincubación con antisuero de conejo de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044 y en la técnica de la inmunofluorescencia.

Una vez obtenido el antisuero, procedemos a la realización de las siguientes suspensiones a una relación 1:1 y su incubación durante 30 minutos para, posteriormente, proceder a su recuento en placa mediante diluciones previas seriadas con PBS.

- antisuero completo + cultivo en fase exponencial
- antisuero descomplementado + cultivo en fase exponencial
- PBS + cultivo en fase exponencial

Tras la incubación de las diferentes suspensiones se procedió a la inoculación de cada pocillo en la línea celular, a una MOI $100 \approx 1$. Tras 4 horas de infección, lavamos los pocillos, añadimos gentamicina, volvemos a lavar, lisamos con tritón X-100 y procedemos al recuento en placa, determinando las tasas de infección bajo cada una de

estas condiciones para valorar el bloqueo de ligandos específicos que reduzcan la tasa normal de invasión de las cepas analizadas bajo condiciones estándar.

III.2.8. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA INCUBACIÓN CELULAR A 4°C EN LA INVASIÓN DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LA LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044

El objetivo de este ensayo es determinar la intervención del metabolismo celular en el proceso de invasión de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044. Veinte minutos previos a la infección, incubamos una placa de cultivo celular de 24 pocillos a 4°C con una confluencia al 80-90% con la línea celular señalada. Una vez inoculados los pocillos con las cepas de *C. pseudotuberculosis* a una MOI $100 \approx 1$, incubamos durante 90 minutos a 4°C y procedemos al recuento de bacterias intracelulares tras la eliminación de las bacterias adheridas con gentamicina. El control de la infección se realiza al mismo tiempo pero incubando a 37°C.

III.2.9. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE AZÚCARES EN LA INVASIÓN DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LA LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044

En las células eucariotas, muchos receptores celulares son azúcares que son reconocidos por ligandos bacterianos por lo que, si previamente bloqueamos estos ligandos adicionando azúcares durante la incubación de los inóculos de *C. pseudotuberculosis*, se bloqueará la posterior unión con el receptor celular y se evitará en parte la internalización celular de la bacteria. Para ello, preparamos un cultivo de *C. pseudotuberculosis* en presencia de un 1% de glucosa y un 1% de manosa, así como un inóculo control sin azúcares (lote testigo). Tras 48 horas de incubación con o sin azúcares, procedemos al cálculo de los diferentes inóculos por recuento en placa tras diluciones seriadas. El ensayo prosigue como ensayos previos inoculando las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* a una MOI $100 \approx 1$ en placas de 24 pocillos con la línea celular FLK-BLV-044, observando tasas de invasión celular bajo las condiciones probadas.

III.2.10. ESTUDIO DE LA ADHERENCIA E INVASIÓN DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LA LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044 MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

Para realizar la técnica de la inmunofluorescencia, las células de la línea FLK-BLV-044 fueron depositadas en placas de 24 pocillos con una lentilla de vidrio de 12 mm de diámetro en el fondo de cada pocillo. Para producir la infección celular se inocularon los pocillos con una MOI $100 \approx 1$ con un tiempo de infección de 4 horas. Transcurridas estas 4 horas de infección, procedemos a la eliminación del medio de cultivo, y realizamos tres lavados con PBS, fijando posteriormente con una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las lentillas con las células fijadas fueron extraídas cuidadosamente de los pocillos y depositadas en una cámara húmeda donde se realizó la técnica de la tinción doble por inmunofluorescencia según la metodología descrita por Pizarro-Cerdá y cols. (2002). Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron a una concentración 1:1000 en una solución de albúmina sérica bovina (Sigma) al 1% en PBS. Las lentillas se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal anti-*C. pseudotuberculosis* obtenido en conejo). Se realizan nuevos lavados con PBS y las lentillas se incuban durante 20 minutos con 200 μ l del anticuerpo secundario alexa-594 anti-conejo (fluorocromo con emisión en rojo) (Invitrogen) para marcar las bacterias extracelulares. Posteriormente, las células se permeabilizaron utilizando una solución de tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la entrada de los anticuerpos primario y secundario al interior celular. Transcurrido este tiempo se procede a su lavado con PBS, y para proceder al marcado de las bacterias totales (extracelulares + internas), las lentillas se vuelven a incubar con el anticuerpo primario siguiendo el proceso descrito anteriormente, para proceder posteriormente a la incubación con 200 μ l del anticuerpo secundario alexa-488 anti-conejo (fluorocromo con emisión en verde) (Invitrogen). De este modo, las bacterias extracelulares quedarán marcadas con ambos anticuerpos secundarios (rojo y verde), mientras que las bacterias intracelulares únicamente quedarán marcadas con el alexa 488 con emisión en verde. Después de realizar otros 3 lavados con PBS, se procedió al montaje de las lentillas en portaobjetos con una gota de ProLong Gold con DAPI (Invitrogen), que marca de manera selectiva el material

genético con emisión en azul. Todas las preparaciones se examinaron con microscopio de epifluorescencia Zeiss con cámara digital Zeiss AxioCam HRc, y las imágenes digitales se procesaron con Photoshop CS3 (Adobe). Las imágenes fueron obtenidas en el laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Marqués de Valdecillas de Santander (Hospital Marqués de Valdecillas, Barrio de las Mazas, Liencres).

III.2.11. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE INVASIÓN BACTERIANA

El objetivo de esta experiencia es determinar si la internalización de *C. pseudotuberculosis* depende de la viabilidad bacteriana tras la inactivación de *C. pseudotuberculosis* por calor y radiación ultravioleta. Si tras la infección con bacteria no viable no se observaran bacterias internas, la internalización requiere que la bacteria esté viva, o la internalización se realiza por mecanismos bacterianos que se inactivan por calor y/o radiación ultravioleta, por lo que podríamos referirnos a invasión bacteriana. Por el contrario, si observamos bacterias intracelulares tras la inactivación por calor y/o radiación ultravioleta querrá decir que existe fagocitosis por parte de la línea celular empleada. Este ensayo se realiza por la técnica de la tinción doble por inmunofluorescencia, cuyo protocolo se ha descrito anteriormente en el punto III.2.10. La inactivación bacteriana por calor consistió en mantener un cultivo celular de *C. pseudotuberculosis* a 60°C durante 90 minutos. La inactivación por radiación ultravioleta consistió en someter a un cultivo celular a radiación ultravioleta durante 150 minutos. En ambos casos se tomaron alícuotas de 100 µl y se sembraron en medio agar sangre para comprobar la completa inactivación bacteriana. Tras la inactivación bacteriana, se procedió a la inoculación de tres pocillos por cepa bajo condiciones estándar previamente descritas para aplicar la técnica de la tinción doble por inmunofluorescencia.

III.3. ESTUDIO DE LA FAGOCITOSIS, PERSISTENCIA Y REPLICACIÓN DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN MACRÓFAGOS

III.3.1. CÉLULAS FAGOCÍTICAS UTILIZADAS

Para las diferentes experiencias de fagocitosis, resistencia y replicación intracelular de *C. pseudotuberculosis* en células fagocíticas especializadas usamos la línea celular macrofágica de ratón J774, cedida por el Dr. Vivas del Servicio de Microbiología del Hospital Marqués de Valdecillas (Santander), así como leucocitos obtenidos a partir de cabra y oveja.

Ambos tipos celulares se cultivaron utilizando medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino descomplementado a 37°C y en una atmósfera acondicionada con un 5% de CO₂. Los diferentes experimentos se realizaron por triplicado en placas de cultivo celular de 24 pocillos (Corning).

Para la obtención de macrófagos de oveja y cabra se extrajeron 7 ml de sangre de oveja o de cabra por punción venosa de la yugular, mezclándose con 7 ml de medio DMEM a 37 °C, a los que se había adicionado previamente penicilina (50 UI/ml) y estreptomicina (50 µg/ml) (Barta 1993; Luo y cols., 2006). Para la separación de las células mononucleares se utilizó un gradiente de Ficoll. Para su elaboración, se disolvieron 6,41 g de Ficoll-400 en 100 ml de agua destilada, adicionando diatrizoato sódico con la ayuda de un densímetro para que la densidad final de la mezcla fuera de 1,081 g/ml, y posteriormente se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121°C. En dos tubos estériles se dispensaron 4 ml de Ficoll adicionándolos a 6 ml de la mezcla de sangre y DMEM procedente de cada animal. Sin agitar los tubos, se centrifugaron a 600 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se obtuvo una banda blanquecina entre el plasma y el medio de separación que contiene las células mononucleares que se recogieron con la ayuda de pipetas Pasteur estériles, depositándose en tubos estériles a los que se adicionó 5 ml de medio DMEM. Finalmente, mediante una cámara de Neubauer procedemos a determinar el número de células por ml.

III.3.2. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE FAGOCITOSIS DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

Para determinar la tasa de fagocitosis de *C. pseudotuberculosis* usamos la línea celular estabilizada J774 de ratón en placas de cultivo celular de 24 pocillos a una confluencia del tapiz del 80-90% (10^5 células por pocillo). Los pocillos fueron inoculados a una MOI $10 \approx 1$ con cada una de las cepas de *C. pseudotuberculosis* durante 2 horas a 37°C. Se lavaron todos los pocillos tres veces con PBS estéril para eliminar las bacterias extracelulares residuales que no fueron fagocitadas, y se adicionaron 600 μ l de medio DMEM con 200 μ g/ml de gentamicina, incubándose durante otras 2 horas a 37°C, considerándose este momento el tiempo 0. Para detectar la posible presencia de bacterias extracelulares no retiradas del medio, se sembraron 100 μ l del sobrenadante en medio agar sangre. Posteriormente se lavaron todos los pocillos tres veces con 700 μ l de PBS estéril y se lisaron los macrófagos utilizando tritón al 1% durante 5 minutos para, finalmente, realizar recuento en placa mediante diluciones seriadas en PBS, determinando así el número de bacterias fagocitadas por los macrófagos.

III.3.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE FAGOCITOSIS EN LA INFECCIÓN POR *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

El objetivo de esta prueba es conocer el tiempo que necesitan los macrófagos para fagocitar a *C. pseudotuberculosis*. Para ello incubamos nuestras cepas a 37°C en la línea celular macrofágica de ratón J774 a una MOI $10 \approx 1$, y dejamos tiempos de infección de 15, 30, 45, 60, 120 y 240 minutos, procediendo a la realización de la técnica de la tinción doble por inmunofluorescencia y recuento en placa con la misma metodología descrita anteriormente.

III.3.4. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA FAGOCITOSIS Y REPLICACIÓN INTRACELULAR DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

El objetivo de este experimento es determinar si, una vez producida la fagocitosis, *C. pseudotuberculosis* se muere en el interior del macrófago, queda latente, o es capaz de resistir, multiplicarse/replicarse activamente. Para este ensayo usamos un

tapiz celular de macrófagos de ratón J774 con una confluencia del 60-70% en placas de 24 pocillos y se inoculan con *C. pseudotuberculosis* a una MOI $10 \approx 1$. Transcurridas 2 horas de incubación a 37°C, procedemos a la eliminación del medio de cultivo y realizamos tres lavados con PBS para eliminar las bacterias no fagocitadas. Posteriormente, añadimos 600 µl de medio de cultivo celular con gentamicina a una concentración de 200 µl/ml para eliminar bacterias adheridas. Tras la incubación con gentamicina, tres pocillos por cepa se lavan tres veces con PBS, se añade Tritón X-100 al 1% y se procede al recuento en placa. En el resto de pocillos se elimina el medio de cultivo con gentamicina a 200 µl/ml y se sustituye por 500 µl de medio de cultivo con gentamicina a una concentración de 20 µl/ml con el fin de mantener un ambiente extracelular estéril. Con estos pocillos se realizarán recuentos de bacterias intracelulares a las 6, 24 y 48 horas. Este mismo ensayo también fue realizado por la técnica de la tinción doble por inmunofluorescencia, ya descrita anteriormente en el apartado III.2.10.

III.3.5. ESTUDIO DE LA ADHERENCIA E INVASIÓN DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EN LA LÍNEA CELULAR MACROFÁGICA DE RATÓN J774 MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

Para realizar la técnica de la inmunofluorescencia con la línea celular macrofágica J774 seguimos la metodología descrita en el apartado III.2.10 empleando la cepa IUSA-1 con dos horas de incubación, usando únicamente como anticuerpo secundario el antisuero alexa-fluor-488 (fluorocromo con emisión en verde) (Invitrogen).

III.4. ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE LOS FAGOCITOS DE OVEJA, CABRA Y RATÓN SOBRE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

Las muestras de sangre de las ovejas y cabras de este apartado procedieron de animales de las instalaciones de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria. La sangre se extrajo de un *pool* de 10 ovejas y 10 cabras aparentemente sanas ubicadas en las instalaciones de la Facultad en las mismas condiciones.

III.4.1. EXPLOSIÓN RESPIRATORIA

El objetivo de esta prueba es analizar la actividad microbicida de células fagocíticas de oveja, cabra y ratón frente a *C. pseudotuberculosis*. Una vez extraídos los fagocitos de oveja y cabra (III.3.1) y conocida su concentración mediante cámara de Neubauer, depositamos aproximadamente 10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos (tapiz al 80-90%) e incubamos durante 3 horas a 37°C. Posteriormente lavamos con medio de cultivo celular para eliminar células no adherentes e incubamos hasta el día siguiente, donde volvemos a lavar los fagocitos con medio de cultivo celular L-15 sin antibiótico y con HBSS (Lonza) para eliminar restos celulares. En el caso de los macrófagos de ratón, el ensayo se inicia cuando el tapiz alcanza una confluencia del 80-90%. En cada pocillo conteniendo macrófagos de ratón o fagocitos de oveja o cabra, añadimos 100 µl de NBT (Sigma) disuelto en una solución 1 mg/ml de HBSS e incubamos a 37°C durante 30 minutos añadiendo las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* a una MOI $10 \approx 1$. Como control positivo utilizamos pocillos con leucocitos y PMA (1 µg/ml) (Sigma), que estimula la explosión respiratoria en macrófagos no infectados. Junto con el NBT añadimos 100 µl de PMA y para controlar la especificidad de la reacción utilizamos superóxido dismutasa (SOD) (Sigma) a una concentración de 300 UI/pocillo en un pocillo que contenga PMA y leucocitos. Después de la incubación retiramos el sobrenadante y añadimos metanol al 70%. Dejamos secar a temperatura ambiente las muestras hasta el día siguiente, y una vez evaporadas las muestras, añadimos 120 µl de KOH 2M y 140 µl de superóxido dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma), y medimos la absorbancia a 620 nm por espectrofotometría (Genesys 10 uv, Thermo). Finalmente, los resultados se expresan como índice de estimulación, que es el ratio del valor mostrado entre los pocillos en presencia de las cepas y los pocillos con PMA. Si el índice es superior a 1, significa que existe estímulo, y por debajo de 1 hay inhibición.

III.4.2. CONTENIDO EN PEROXIDASA EN MACRÓFAGOS DE OVEJA, CABRA Y RATÓN

El objetivo de esta prueba es determinar el contenido en peroxidasa presente en macrófagos de ratón y fagocitos de oveja y cabra inoculados con *C. pseudotuberculosis*. Las placas de 96 pocillos se preparan con los diferentes tipos celulares de igual forma que la descrita en el apartado anterior, añadiendo las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* a una MOI $10 \approx 1$, para posteriormente centrifugar las placas a 400 g durante 5 minutos e incubar durante 30 minutos a 37°C. Tras la incubación volvemos a centrifugar las placas de 96 pocillos a 400 g durante 10 minutos y lavamos la muestra con HBSS. Añadimos 75 µl de una solución de CTAB (Sigma) al 0,02%, incubamos durante 5 minutos para lisar las células y añadimos 50 µl de TMB (Sigma) y 25 µl de H₂O₂ 5mM, produciéndose una reacción colorimétrica de tonos azulados. Transcurridos dos minutos añadimos 50 µl de H₂SO₄ 2M para detener la reacción colorimétrica. Finalmente, tomamos 150 µl de la dilución anterior y la pasamos a una nueva placa para medir su absorbancia por espectrofotometría a 450 nm (Genesys 10 uv, Thermo). La interpretación del resultado la hacemos siguiendo la misma pauta expresada en la explosión respiratoria.

III.5. DETERMINACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL SUERO

Utilizamos la metodología descrita por Hughes y cols. (1982) modificada por Podschun y cols. (1991). Para ello se realizó una suspensión bacteriana a una concentración de 5×10^8 UFC/ml en PBS estéril a partir de un cultivo previo en BHIB adicionado con un 0,5% de Tween 80 para evitar la agregación bacteriana. Se incubó durante 48 horas a 37°C para obtener la fase de crecimiento exponencial, ajustándose por espectrofotometría a la concentración señalada. Posteriormente, y por medio de diluciones seriadas del inóculo, alcanzamos una concentración de 5×10^6 UFC/ml corroborada por recuento en placa. Añadimos 25 µl de esta suspensión a 75 µl de suero de oveja o cabra obtenido en las mismas condiciones que se señala en el punto 3.4, y lo mezclamos en una placa de 96 pocillos. Finalmente incubamos a 37°C durante 3 horas,

cuantificando el número de UFC/ml que contiene el inóculo mediante recuento en placa tras cada hora de incubación. Como control se realizó la descomplementación del suero en baño maría a una temperatura de 56°C durante 30 minutos, procediendo a realizar el mismo ensayo ya descrito en este apartado. La viabilidad de *C. pseudotuberculosis* se determinó inmediatamente (a tiempo cero) y tras 1, 2 y 3 horas de incubación realizando diluciones seriadas y recuento en placa. Cada cepa fue analizada por triplicado, considerándose resistentes al efecto bactericida del suero aquellas cepas que tras tres horas de incubación mostraban una supervivencia superior al 100% respecto al inóculo inicial, y sensibles cuando la supervivencia era menor al 100% (Davies, 1991).

IV.-RESULTADOS

IV.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

IV.1.1.- ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE LOS ANIMALES MUESTREADOS

Las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas de diferentes explotaciones caprinas y ovinas de la isla de Gran Canaria, así como de la Granja experimental de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria a partir de cabras de raza majorera que presentaban abscesos en la región submandibular y retro-mamaria (Tabla 2). Una vez sembrados y cultivados los contenidos purulentos de los abscesos, las cepas obtenidas se sometieron a distintas pruebas que permitieron su precisa identificación.

IV.1.2.- IDENTIFICACIÓN DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

En primer lugar, a todas las cepas experimentales obtenidas se les realizó una batería de pruebas bioquímicas convencionales en placa y tubo, trabajando mediante el uso de tablas de identificación. Al mismo tiempo, en la realización de estas pruebas se utilizó una cepa de referencia de la Colección Española de Cultivos Tipo, *C. pseudotuberculosis* CECT-808T, que utilizamos como control. En la Tabla 2 se muestran los datos de procedencia de todas las cepas utilizadas en las distintas fases de este trabajo de investigación.

Tabla 2. Datos principales de la procedencia de las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* que fueron utilizadas en el trabajo de investigación

Cepa	Origen	Hospedador (nº de adultos)	Fuente
CECT-808T	Sudamérica	Oveja	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)
IUSA-1	Arucas (*)	Cabra** (120)	IUSA (ULPGC)
IUSA-2	Arucas (*)	Cabra** (120)	IUSA (ULPGC)
TARA-1	Valleseco	Cabra** (180)	IUSA (ULPGC)

(*) Granja de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC

(**) Cabra majorera

En la Tabla 3 observamos el resultado de las diferentes pruebas a las que fueron sometidas las cepas obtenidas en los muestreos realizados, habiendo eliminado aquellos aislados que no se correspondieron previamente con cocobacilos Gram positivos, β hemolíticos y catalasa positivos. Como observamos en la Tabla 3, las cepas preseleccionadas eran inmóviles y negativas a la prueba de la oxidasa. Mediante esta batería mínima de pruebas morfológicas y bioquímicas, nos aproximamos bastante a la correcta clasificación de estas cepas dentro del Género *Corynebacterium*, pero no logramos una identificación definitiva como *C. pseudotuberculosis* al no poder discriminar entre las diferentes especies que conforman el Género *Corynebacterium*, como *C. bovis* y *C. ulcerans*.

Los resultados del sistema miniaturizado de identificación API Coryne (*bioMérieux*, Madrid, España) se presentan en la Tabla 3 para completar la identificación de las cepas obtenidas. Como podemos apreciar en dicha Tabla, las cepas de campo IUSA-1 y TARA-1 mostraron resultados positivos para las pruebas α -glucosidasa (α -GLU), ureasa (URE), fermentación de glucosa (GLU) y fermentación de ribosa (RIB). Por el contrario, el resto de las pruebas realizadas dieron un resultado negativo, obteniéndose un código de lectura final 0011304 mediante este sistema miniaturizado, que se correspondía con *C. pseudotuberculosis* con un nivel de fiabilidad del 99,9%.

A su vez, con el sistema API Coryne, la cepa de campo IUSA-2, presentó resultados positivos para las pruebas α -glucosidasa (α -GLU), ureasa (URE), fermentación de glucosa (GLU), fermentación de ribosa (RIB) y fermentación de maltosa (MAL). Por el contrario, el resto de las pruebas presentaron un resultado negativo, obteniéndose un código de lectura final 0011324 que se correspondía con *C. pseudotuberculosis* con un nivel de fiabilidad del 99,5%.

Finalmente, la cepa de referencia usada como control, *C. pseudotuberculosis* CECT-808T, presentó resultados positivos para las pruebas fosfatasa alcalina (PAL), α -glucosidasa (α -GLU), ureasa (URE), fermentación de glucosa (GLU) y fermentación de ribosa (RIB), mientras que mostró resultados negativos para el resto de las pruebas,

obteniéndose un código de lectura final 0111304, que se correspondía con *C. pseudotuberculosis* con un nivel de fiabilidad del 99,3%.

Tabla 3. Caracterización fenotípica de las cepas de *C. pseudotuberculosis* obtenidas en Gran Canaria, y de la cepa de referencia CECT-808T, mediante el sistema API Coryne (*bioMérieux*)

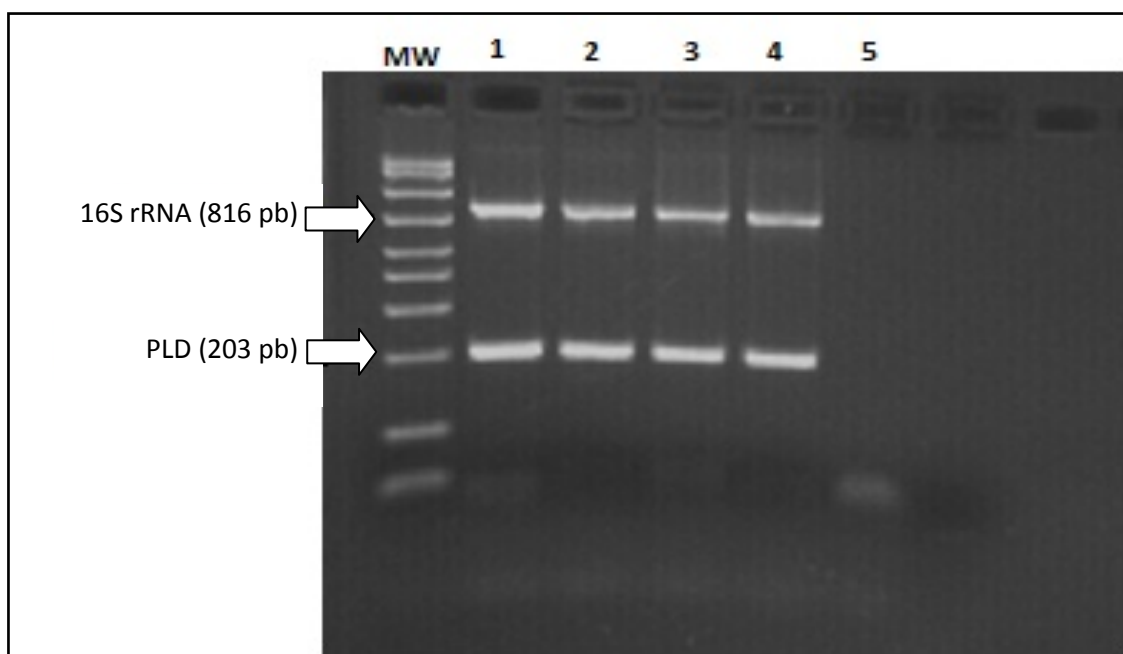
	Cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i>			
	CECT-808T	IUSA-1	IUSA-2	TARA-1
Prueba				
Reducción de Nitratos	-	-	-	-
Pirazinamidasa	-	-	-	-
Pirrolidónilarilamidasa	-	-	-	-
Fosfatasa alcalina	+	-	-	-
β -glucuronidasa	-	-	-	-
β -galactosidasa	-	-	-	-
α -glucosidasa	+	+	+	+
N-acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-
Hidrólisis de la esculina	-	-	-	-
Ureasa	+	+	+	+
Hidrólisis de la gelatina	-	-	-	-
Fermentación a partir de:				
Testigo Negativo	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+
Ribosa	+	+	+	+
Xilosa	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-
Maltosa	-	-	+	-
Lactosa	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-
Glicógeno	-	-	-	-

(+) Reacción positiva; (-) Reacción negativa

Para corroborar la identificación de las 4 cepas empleadas de nuestro estudio, todas ellas fueron sometidas a análisis por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la realización de una PCR-*multiplex* para regiones específicas de los genes 16S rRNA y *PLD*. En la Figura 1 observamos que en las 4 cepas analizadas se producen las amplificaciones esperadas de 816 y 203 pares de bases

(pb), confirmando de manera definitiva que las cepas CECT-808T, IUSA-1, IUSA-2 y TARA-1 se correspondían, sin lugar a dudas, con *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Figura 1. Resultados obtenidos mediante la PCR-*multiplex* de los genes 16S rRNA y PLD de las 4 cepas empleadas en nuestro estudio



MW: marcador de peso molecular de 50 a 2000 pares de bases

Pocillo 1: CECT-808T. Pocillo 2: IUSA-1. Pocillo 3: IUSA-2. Pocillo 4: TARA-1. Pocillo 5: control negativo.

IV.1.3.- PERFIL DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

En la Tabla 4 observamos los perfiles de resistencia antibiótica de las cepas analizadas. Como se puede apreciar, todas las cepas de *C. pseudotuberculosis* estudiadas son sensibles a la gentamicina, ampicilina, lincomicina, oleandomicina, amoxicilina y bacitracina. Por el contrario, todas las cepas son resistentes a la novobiocina, fosfomicina, ácido nalidíxico, cefalotina, cloxacilina, nitrofurantoina y estreptomina. En el caso de la penicilina G y la enrofloxacin, todas las cepas mostraron una sensibilidad intermedia, excepto la cepa TARA-1, que es sensible. A su vez, todas las cepas son resistentes a la kanamicina y cefuroxima, excepto la cepa TARA-1 que muestra sensibilidad intermedia. Finalmente, todas las cepas son sensibles a la eritromicina, salvo la cepa IUSA-1, que presenta un nivel de sensibilidad intermedia.

Tabla 4. Perfil de resistencia antibiótica de la cepas clínicas de *C. pseudotuberculosis* aisladas, comparadas con la cepa de referencia CECT-808T

Antibióticos	Cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i>			
	IUSA - 1	IUSA - 2	TARA - 1	CECT-808T
Gentamicina (10mg)	S	S	S	S
Ampicilina (30 mg)	S	S	S	S
Lincomicina (50 mg)	S	S	S	S
Oleandomicina (1mg)	S	S	S	S
Amoxicilina (30 mg)	S	S	S	S
Bacitracina (10 U)	S	S	S	S
Eritromicina (15 mg)	I	S	S	S
Penicilina G (100 U)	I	I	S	I
Enrofloxacina (15 mg)	I	I	S	I
Kanamicina (30 mg)	R	R	I	R
Cefuroxima(30 mg)	R	R	I	R
Novobiocina (30mg)	R	R	R	R
Fosfomicina(50 mg)	R	R	R	R
Ácido nalidíxico (30 mg)	R	R	R	R
Cefalotina (30 mg)	R	R	R	R
Cloxacilina (5 mg)	R	R	R	R
Nitrofurantoina (100 mg)	R	R	R	R
Estreptomina (10 mg)	R	R	R	R

(S) Sensible

(I) Sensibilidad Intermedia

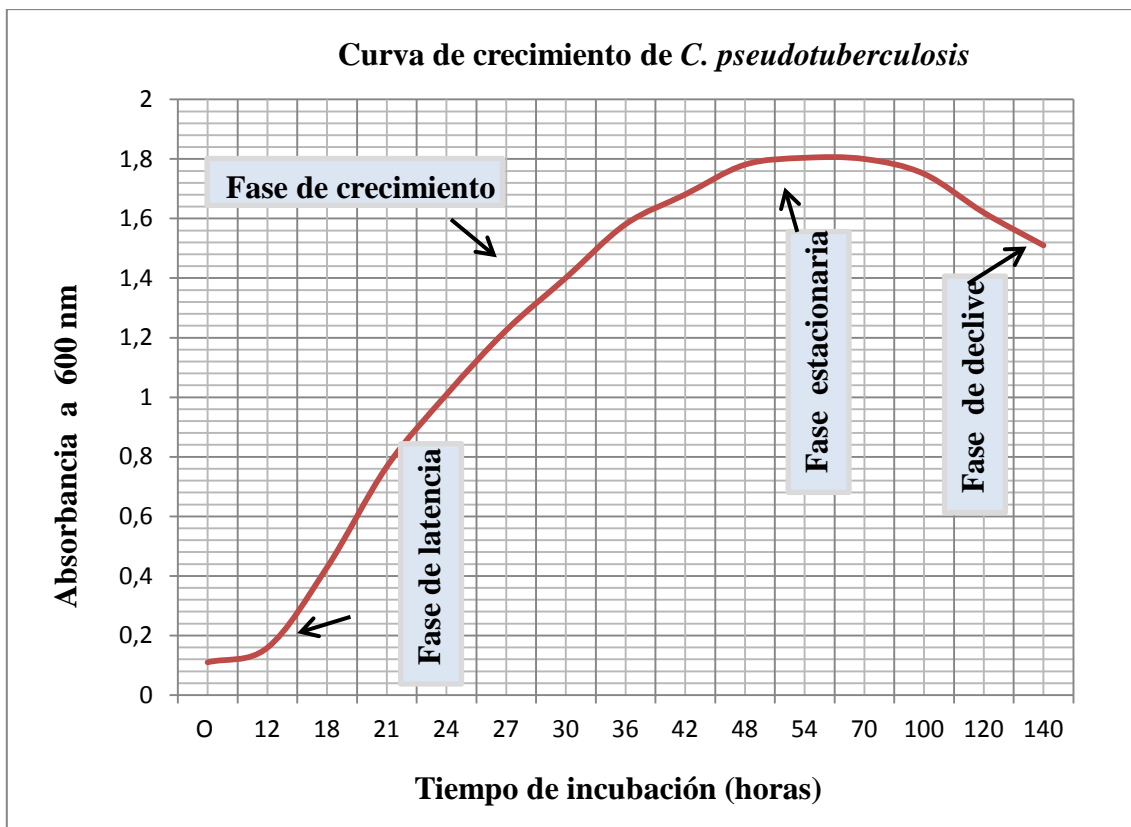
(R) Resistente

IV.2.-ADHERENCIA E INVASIÓN DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* EN CÉLULAS NO FAGOCÍTICAS (LÍNEA CELULAR FLK-BLV-044)

IV.2.1.- ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PREVIAS: CURVA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE INFECCIÓN

Previamente a la realización de los ensayos de adherencia e invasión de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular no fagocítica de origen ovino FLK-BLV-044, determinamos la curva de crecimiento para *C. pseudotuberculosis* a fin de obtener un cultivo fresco en fase de crecimiento exponencial para la estandarización de los ensayos. En la Figura 2 observamos que hasta las 12 horas de incubación se mantiene la fase de latencia, pero a partir de ese momento comienza la fase de crecimiento logarítmico con un pico máximo a las 48 horas, momento en el que se inicia la fase estacionaria y, posteriormente, la fase de declive a partir de las 72 horas de iniciado el cultivo. A consecuencia de estos resultados, todos los ensayos de adherencia e invasión celular se realizaron con cultivos frescos con 48 horas de incubación.

Figura 2. Representación gráfica del crecimiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a lo largo del tiempo



En la Figura 3 y Tabla 5 se representa la tasa de invasión de las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* en función del tiempo de incubación. Como observamos, la tasa de invasión aumenta con el incremento de la duración del contacto célula-bacteria en las 4 cepas analizadas, y así, la cepa IUSA-1 presenta la mayor tasa de invasión con un 0,164% a los 240 minutos. Comprobamos que a los 30 minutos de incubación prácticamente no observamos bacterias internalizadas, hecho que ocurre con las 4 cepas en estudio, que presentan una cinética de invasión celular semejante a lo largo del tiempo de infección, no apreciando diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro cepas del estudio. Debido a estos resultados, en la estandarización definitiva del tiempo de infección para este ensayo se utilizó un periodo de incubación de 4 horas.

Figura 3.- Efecto del tiempo de infección en la invasión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044

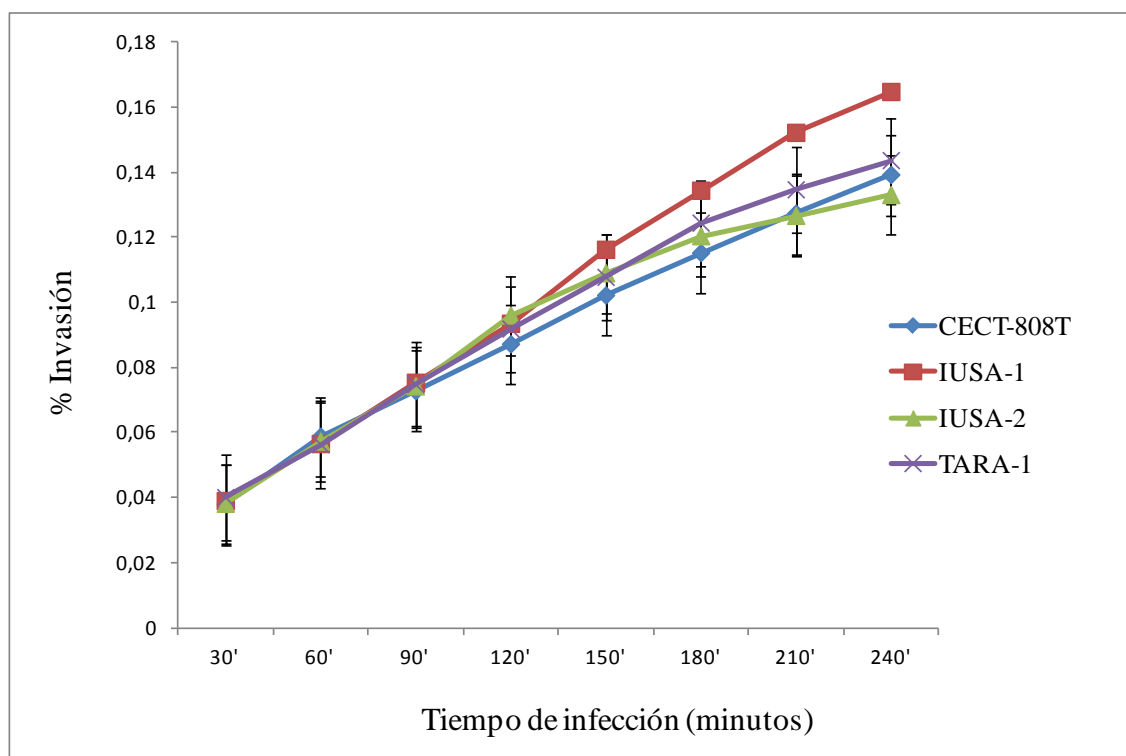


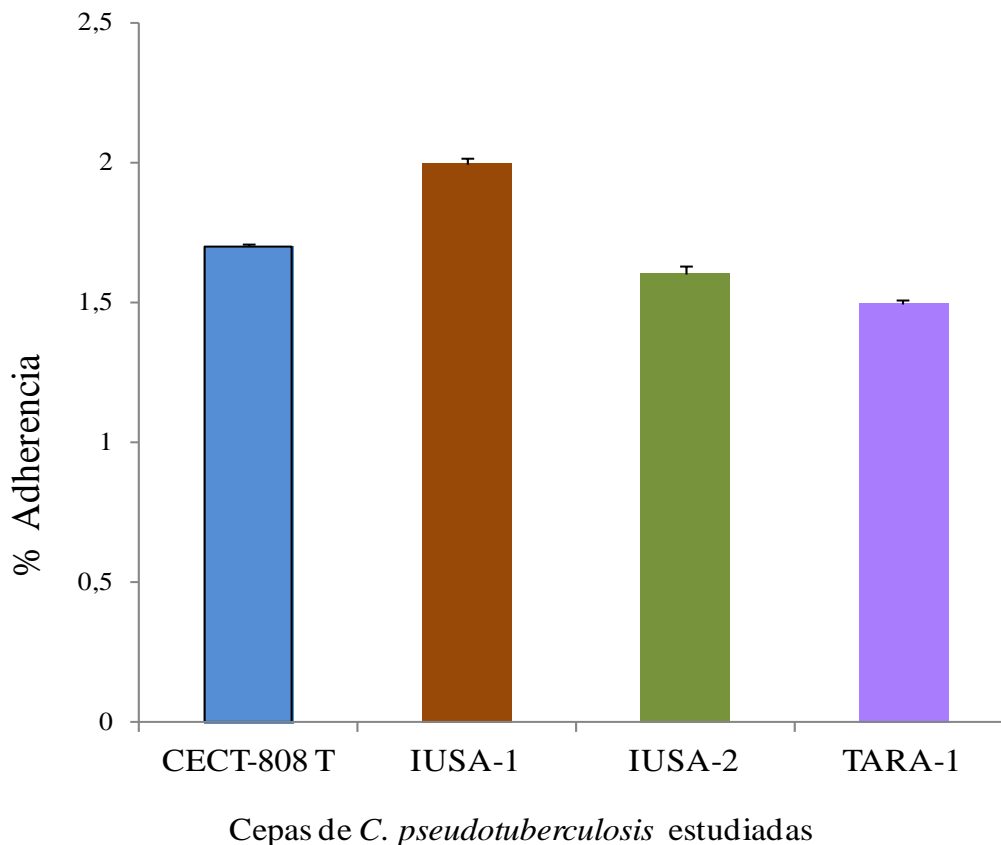
Tabla 5. Datos numéricos del efecto del tiempo de infección en la invasión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044

CEPAS	Tiempo de infección (minutos)							
	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
CECT-808T	0,039	0,058	0,072	0,087	0,102	0,115	0,127	0,139
IUSA-1	0,038	0,056	0,075	0,093	0,116	0,134	0,152	0,164
IUSA-2	0,038	0,057	0,074	0,095	0,120	0,120	0,126	0,133
TARA-1	0,039	0,056	0,074	0,091	0,124	0,124	0,134	0,143

IV.2.2.- PORCENTAJE DE ADHERENCIA E INVASIÓN

En la Figura 4 y Tabla 6, se representan las tasas de adherencia tras 4 horas de incubación de las cuatro cepas de *C. pseudotuberculosis* analizadas. Puede apreciarse que todas las cepas mostraron valores similares. En la Figura 4 observamos que los porcentajes de adherencia varían entre el 1,994% de la cepa IUSA-1 y el 1,494% de la cepa TARA-1, mientras que las cepas IUSA-2 y CECT-808T presentan tasas de adherencia intermedias, con valores de 1,602% y 1,701%, respectivamente, aunque a nivel estadístico no se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar las tasas de adherencia de las 4 cepas de estudio.

Figura 4. Adherencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044



En la Figura 5 y Tabla 6 observamos las tasas de invasión de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044, tras 4 horas de incubación. La cepa IUSA-1 es la que presenta porcentualmente una mayor tasa de invasión (0,164%), mientras que la cepa IUSA-2 fue la que mostró menor tasa de invasión con el 0,133%. Finalmente, las cepas CECT-808T y TARA-1 presentan tasas de invasión intermedias, con valores de 0,139 y 0,143%, respectivamente, si bien a nivel estadístico, como ocurriera con la adherencia, no se observan diferencias significativas entre los valores encontrados para las 4 cepas estudiadas.

Figura 5.- Invasión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044

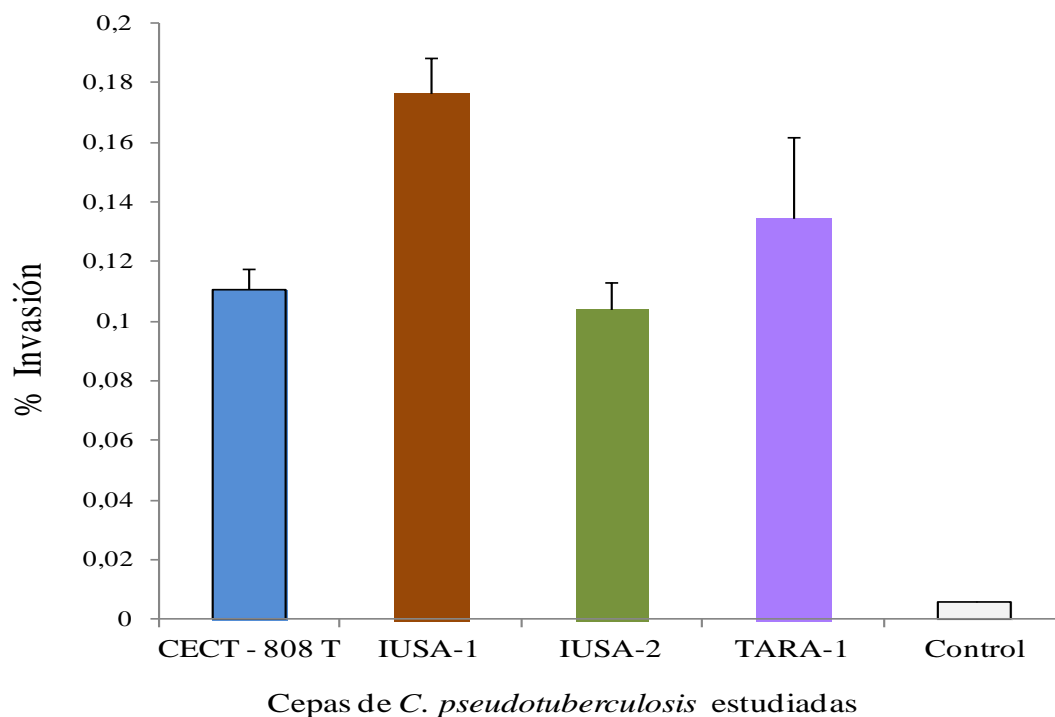


Tabla 6. Datos numéricos de la adherencia e invasión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044

CEPAS	Porcentaje de adherencia	Porcentaje de invasión
CECT-808T	1,701	0,139
IUSA-1	1,994	0,164
IUSA-2	1,602	0,133
TARA-1	1,494	0,143

IV.2.3.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO

En la Figura 6 y Tabla 7 observamos cómo varía la invasión de *C. pseudotuberculosis* en función de la variación de la multiplicidad de la infección (MOI), que representa el ratio nº de bacterias por célula. Como se observa, se producen aumentos significativos ($p < 0,05$) de la tasa de invasión conforme incrementamos el ratio bacteria/célula de $5 \approx 1$ hasta $100 \approx 1$, no existiendo incremento en la tasa de invasión al incrementarse la MOI de $100 \approx 1$ a $150 \approx 1$. En la Figura, diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los valores comparados.

Figura 6.- Efecto de la multiplicidad de la infección (MOI) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la invasión en la línea celular FLK-BLV-044

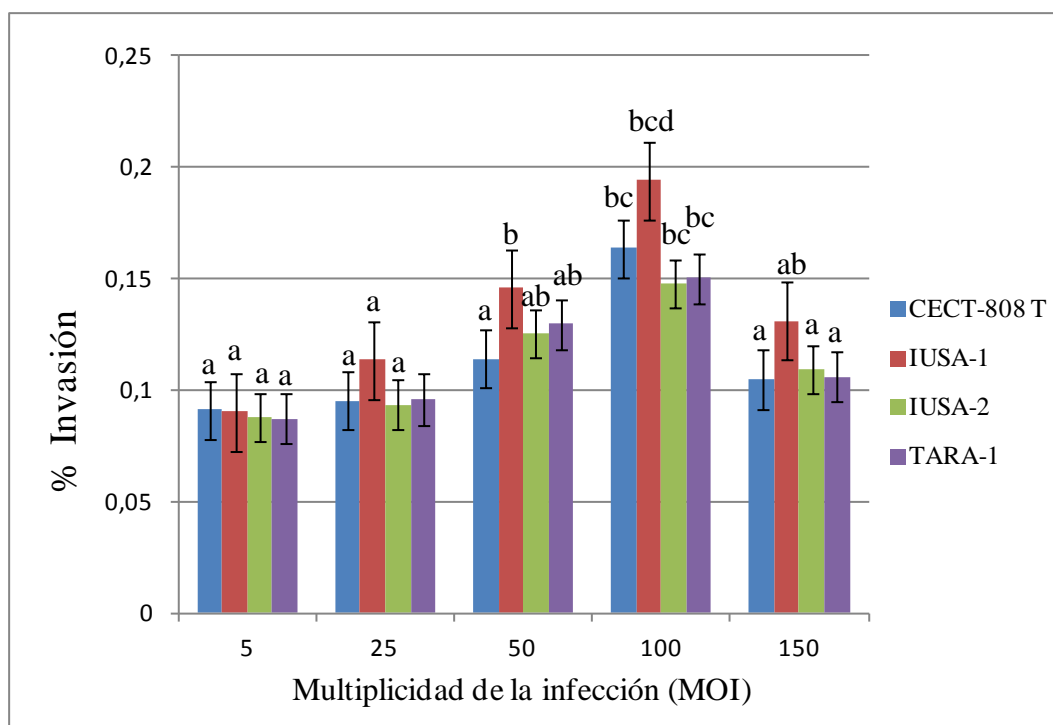


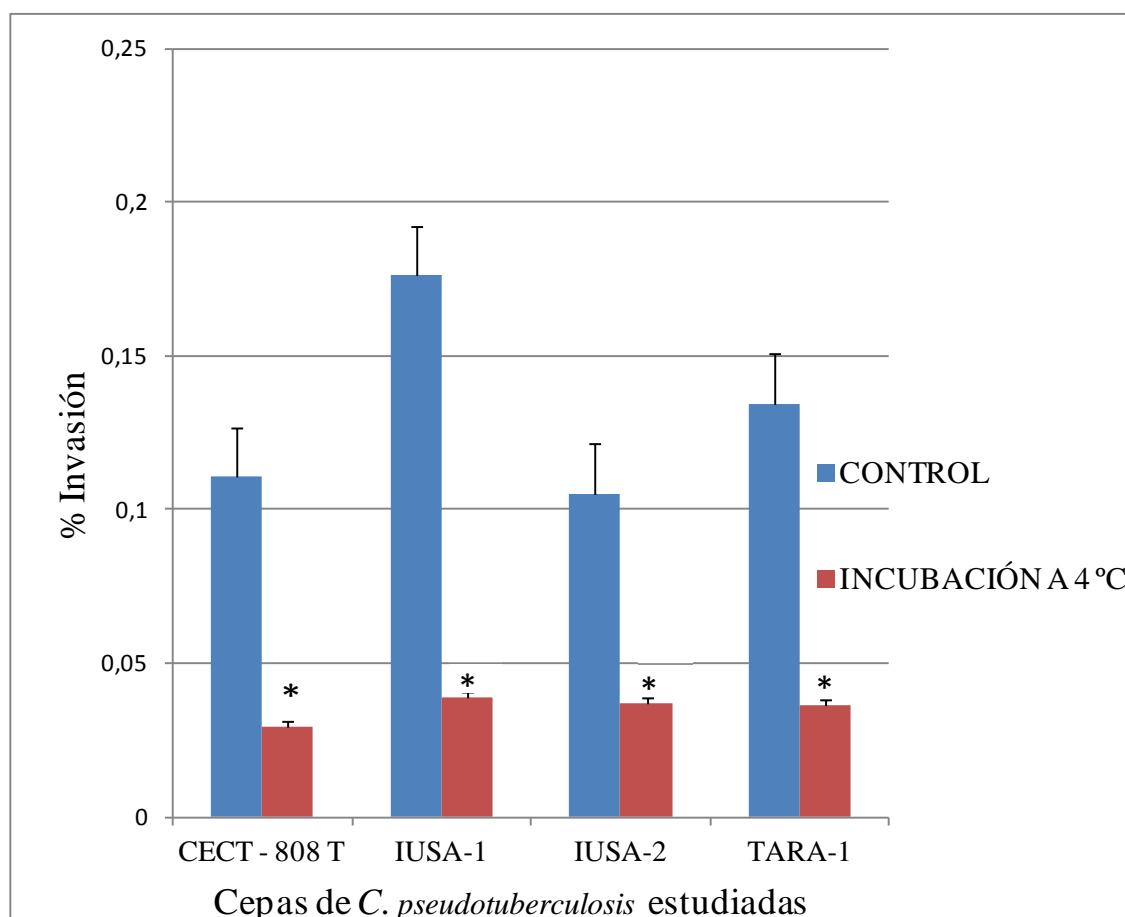
Tabla 7. Datos numéricos de la multiplicidad de la infección (MOI) en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044

CEPAS	Multiplicidad de infección (MOI)				
	MOI≈5	MOI≈25	MOI≈50	MOI≈100	MOI≈150
CECT-808T	0,090	0,095	0,114	0,139	0,104
IUSA-1	0,090	0,113	0,145	0,164	0,131
IUSA-2	0,087	0,093	0,125	0,133	0,109
TARA-1	0,087	0,095	0,129	0,143	0,105

IV.2.4.-EFECTO DE LA INCUBACIÓN DE LAS CÉLULAS A 4°C

En la Figura 7 y Tabla 8 observamos el efecto producido en la invasión de *C. pseudotuberculosis* a una MOI de $100 \approx 1$, tras la incubación previa de la línea celular FLK-BLV-044 a 4°C para determinar la implicación del metabolismo celular en la internalización bacteriana. Como apreciamos en dicha Figura, el hecho de incubar la línea celular a esa temperatura produce una drástica disminución en la tasa de invasión de *C. pseudotuberculosis* ($p < 0,05$) con todas las cepas analizadas, presentando todas ellas una tasa de invasión inferior al 0,04%.

Figura 7.- Tasas de invasión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044 a 4°C con una MOI inicial de $100 \approx 1$

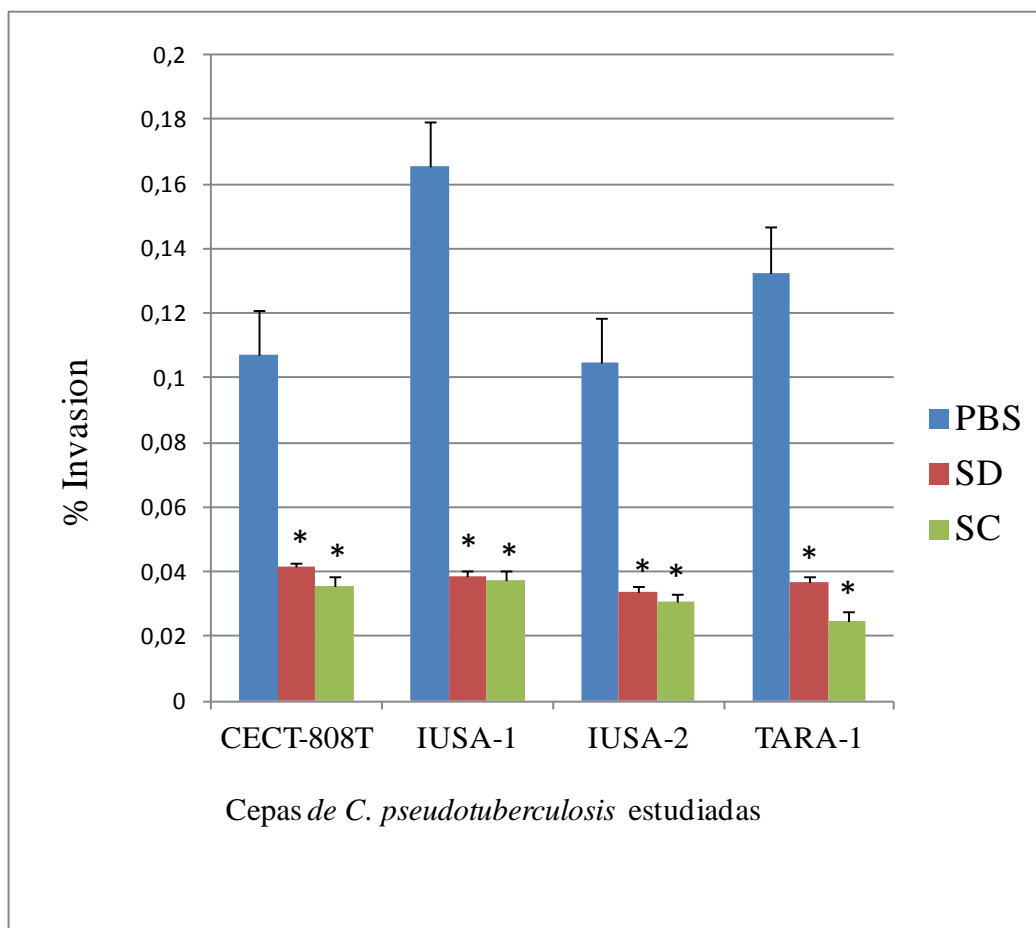


*diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

IV.2.5.- EFECTO DE LA PREINCUBACIÓN CON ANTISUERO DE CONEJO

En la Figura 8 y Tabla 8 podemos observar el efecto de la preincubación de *C. pseudotuberculosis* con suero completo (SC) y descomplementado (SD) anti-*C. pseudotuberculosis*. Como se observa en dicha Figura, las cuatro cepas estudiadas responden con un modelo similar en esta prueba; la incubación, tanto con suero completo como con suero descomplementado de conejo, produce una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las tasas de invasión de todas las cepas de *C. pseudotuberculosis* incluidas en este estudio, en la línea celular FLK-BLV-044, a una MOI de $100 \approx 1$, respecto al grupo control, que fue incubado con PBS.

Figura 8.- Efecto de la preincubación con suero anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* en la invasión de la línea celular FLK-BLV-044, a partir de una MOI de $100 \approx 1$



PBS: Buffer fosfato salino

SD: Suero descomplementado anti-*C.pseudotuberculosis*

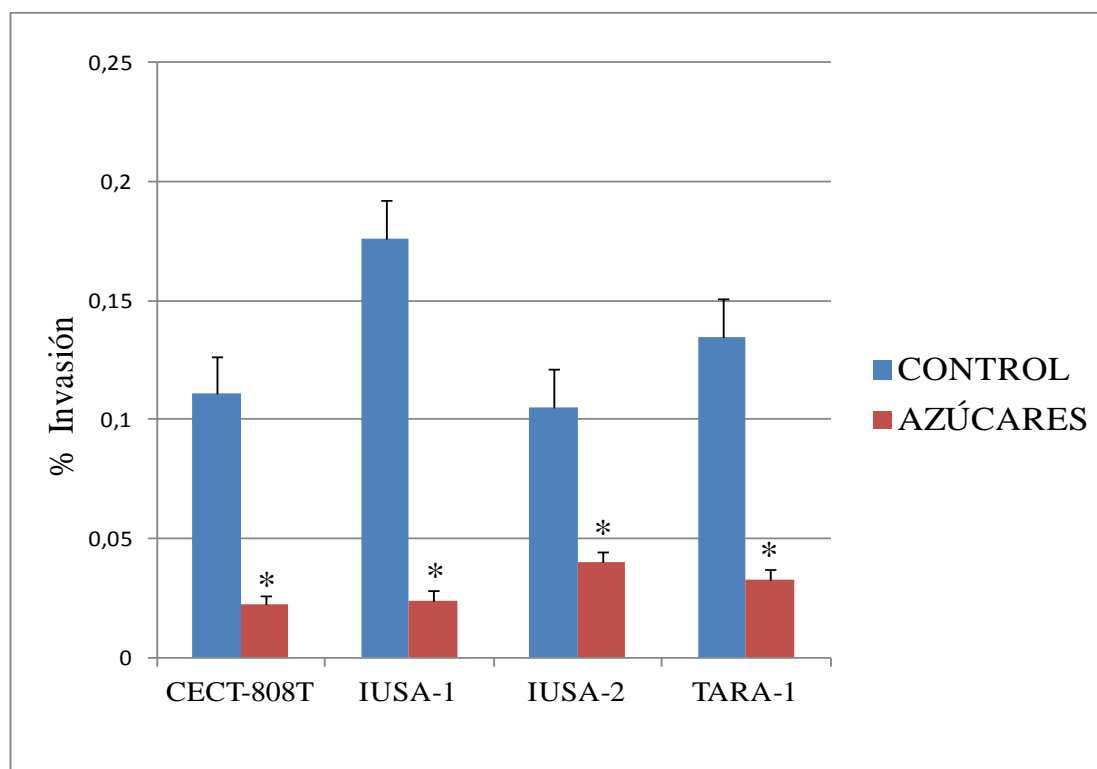
SC: Suero completo anti-*C.pseudotuberculosis*

*diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

IV.2.6.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE DETERMINADOS AZÚCARES

En la Figura 9 y Tabla 8 se observa el efecto que produce el cultivo de *C. pseudotuberculosis* a una MOI $100 \approx 1$, en presencia de los azúcares glucosa y manosa al 1%. Como observamos en dicha Figura, se produce una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en las tasa de invasión de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044, tras las 4 horas de incubación a 37°C. Así, la cepa IUSA-1 que en condiciones estándares de cultivo tiene una tasa de invasión del 0,17%, al cultivarla en presencia de los referidos azúcares presenta una tasa de invasión del 0,02%. A su vez, la cepa IUSA-2 que en condiciones estándares de cultivo presenta una tasa de invasión del 0,10%, tras su cultivo en presencia de los referidos azúcares modifica dicha tasa en el 0,04%. De manera similar a las anteriores, la CECT-808T pasa del 0,11% al 0,02% y la cepa TARA-1, que pasa del 0,13% al 0,03%. Por tanto, la mayor disminución de la tasa de invasión bacteriana observada, a consecuencia de la incubación con azúcares fue para la cepa CECT-808T, y la menor para la cepa IUSA-2.

Figura 9.- Efecto de la incubación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* con glucosa y manosa al 1% en la invasión de la línea celular FLK-BLV-044, a partir de una MOI de $100 \approx 1$



*diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 8. Datos numéricos de la tasa de invasión bajo diferentes condiciones de cultivo en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044

CEPAS	Condición analizada				
	Control	4°C	Azúcares	Suero completo	Suero descomplementado
CECT-808T	0,139	0,020	0,022	0,035	0,041
IUSA-1	0,164	0,031	0,024	0,037	0,038
IUSA-2	0,133	0,036	0,040	0,030	0,033
TARA-1	0,143	0,036	0,033	0,025	0,036

IV.2.7.- SUPERVIVENCIA Y/O REPLICACIÓN INTRACELULAR

En la Figura 10 y Tabla 9 observamos la evolución que siguió *C. pseudotuberculosis* inoculada a una MOI $100 \approx 1$, una vez se produjo su internalización en la línea celular FLK-BLV-044. La Figura detalla el comportamiento de cada una de las cepas utilizadas que, como puede verse, fue similar para todas ellas, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos para cada cepa en comparación con las demás. Como se aprecia en la Figura 10, *C. pseudotuberculosis* se replica ligeramente en el interior celular hasta las 24 horas postinfección, para después producirse una drástica disminución en el número de bacterias viables en el interior celular hasta el sexto día postinfección, momento en el que observamos la degradación del tapiz celular y dimos por acabada la experiencia.

La tasa de proliferación intracelular, entendida como la relación existente entre las bacterias viables a las 24 y 4 horas (índice I_{PRO}) se situó alrededor del 1,08 para las 4 cepas analizadas, indicando una ligera replicación bacteriana en el interior celular.

Figura 10.- Replicación intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044, a partir de una MOI de $100 \approx 1$

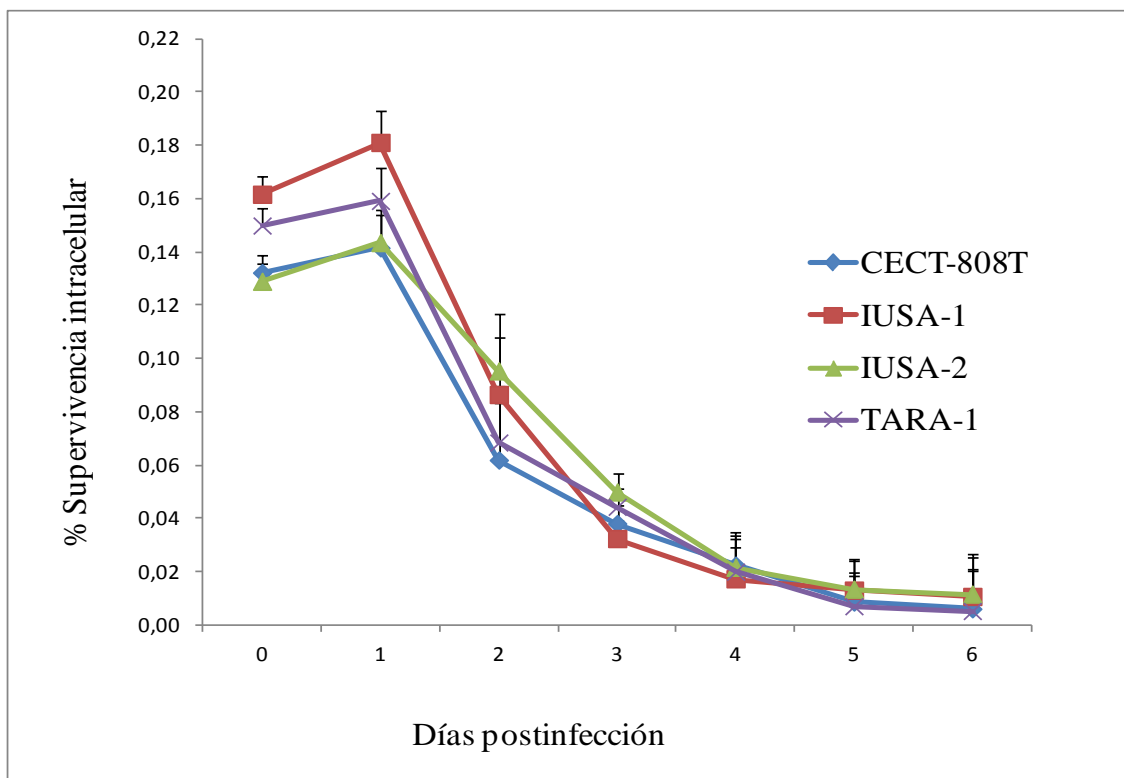


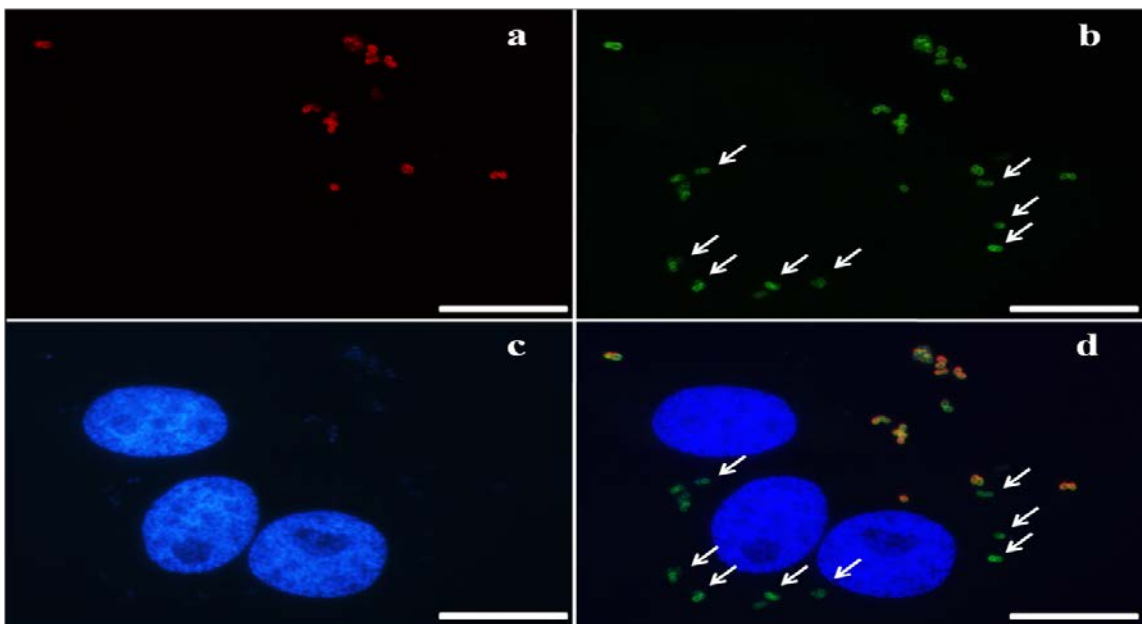
Tabla 9. Datos numéricos de la replicación intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044, a partir de una MOI de $100 \approx 1$

CEPAS	Tiempo de infección (días)					
	1	2	3	4	5	6
CECT-808T	0,139	0,141	0,061	0,041	0,021	0,010
IUSA-1	0,164	0,182	0,092	0,033	0,023	0,012
IUSA-2	0,133	0,143	0,103	0,054	0,024	0,013
TARA-1	0,143	0,162	0,072	0,042	0,021	0,014

IV.2.8.- ADHERENCIA E INVASIÓN INTRACELULAR MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

En la Figura 11 observamos la secuencia de la tinción doble por inmunofluorescencia realizada en la línea celular FLK-BLV-044 tras 4 horas de incubación con *C. pseudotuberculosis*, a una MOI de $100 \approx 1$. Las bacterias extracelulares adheridas a las células las observamos teñidas de rojo en la Figura 11a con el fluorocromo Alexa-594 en células sin permeabilizar. Tras la permeabilización de la membrana celular con Tritón, observamos en verde el total de bacterias (adheridas más internas) teñidas con el fluorocromo Alexa-488 (Figura 11b). Las flechas muestran un grupo de bacterias internas, no teñidas anteriormente en células sin permeabilizar. La siguiente secuencia, Figura 11c, se corresponde con la acción del DAPI, que tiñe de azul de manera selectiva el ADN bacteriano y ADN celular. La última imagen (Figura 11d) se corresponde con la superposición de las imágenes anteriores, donde podemos observar en tonos naranjas a las bacterias extracelulares (adheridas) teñidas con ambos fluorocromos (rojo y verde), en verde bacterias internas, y en azul ADN bacteriano y ADN celular. En las muestras de control de adherencia, que se realizó inactivando las bacterias mediante calor y rayos UVA, no encontramos bacterias internas mediante inmunofluorescencia.

Figura 11.- Invasión y adherencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044, a una MOI de $100 \approx 1$, mediante inmunofluorescencia



IV.3.-INTERACCIÓN DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* CON FAGOCITOS DE RATÓN, CABRA Y OVEJA

IV.3.1.- ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PREVIAS: TIEMPO DE INFECCIÓN

Con el fin de estandarizar el tiempo de infección que debíamos aplicar en esta experiencia, en la Figura 12 y Tabla 10 se observa el porcentaje de bacterias fagocitadas de las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* usadas en el estudio, a una MOI $10 \approx 1$, en función de los diferentes tiempos de infección probados en la línea celular macrofágica J774. Como observamos, la fagocitosis aumenta con el tiempo de incubación de las 4 cepas estudiadas, y así, la cepa IUSA-1 es fagocitada un 71,56% tras 240 minutos de incubación. A los 30 minutos de contacto macrófago-bacteria ya se observan bacterias fagocitadas con las cuatro cepas de *C. pseudotuberculosis* analizadas. Todas las cepas analizadas presentan una cinética de fagocitosis similar, con tasas de fagocitosis a los 240 minutos que oscilan entre el 71,56 y el 54,38%, no observándose diferencias significativas a nivel estadístico entre las cuatro cepas estudiadas entre los 120 y 240 minutos.

Figura 12.- Porcentaje de fagocitosis de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular J774 en función del tiempo de infección empleado (MOI $10 \approx 1$)

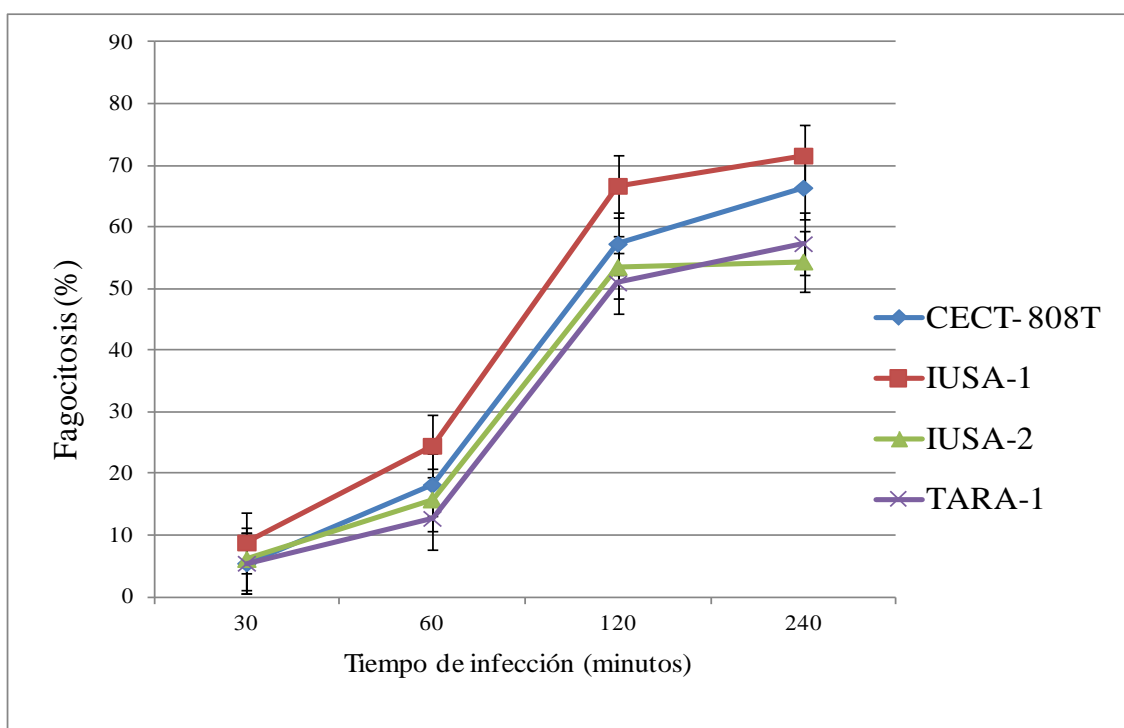


Tabla 10. Datos numéricos del porcentaje de fagocitosis de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular J774 en función del tiempo de infección empleado (MOI 10 \approx 1)

CEPAS	Tiempo de infección (minutos)			
	30´	60´	120´	240´
CECT-808T	5,45	18,18	57,27	66,36
ÍUSA-1	8,82	24,50	66,66	71,56
IUSA-2	6,14	15,78	53,50	54,38
TARA-1	5,45	12,72	50,90	57,27

IV.3.2.- FAGOCITOSIS POR LA LÍNEA CELULAR DE RATÓN J774

En la Figura 13 y Tabla 11 se representa la tasa de fagocitosis (porcentaje de bacterias fagocitadas) de las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* usadas en este estudio, tras 120 minutos de incubación en la línea celular macrofágica J774, a una MOI 10 \approx 1. Las cepas presentaron tasas de fagocitosis que se encontraron en unos valores entre el 50,9% de la cepa TARA-1 y el 66,6% de la cepa IUSA-1. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores mostrados por las diferentes cepas analizadas.

Figura 13.- Actividad fagocítica de la línea celular J774 sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tras 120 minutos de incubación a una MOI 10 \approx 1

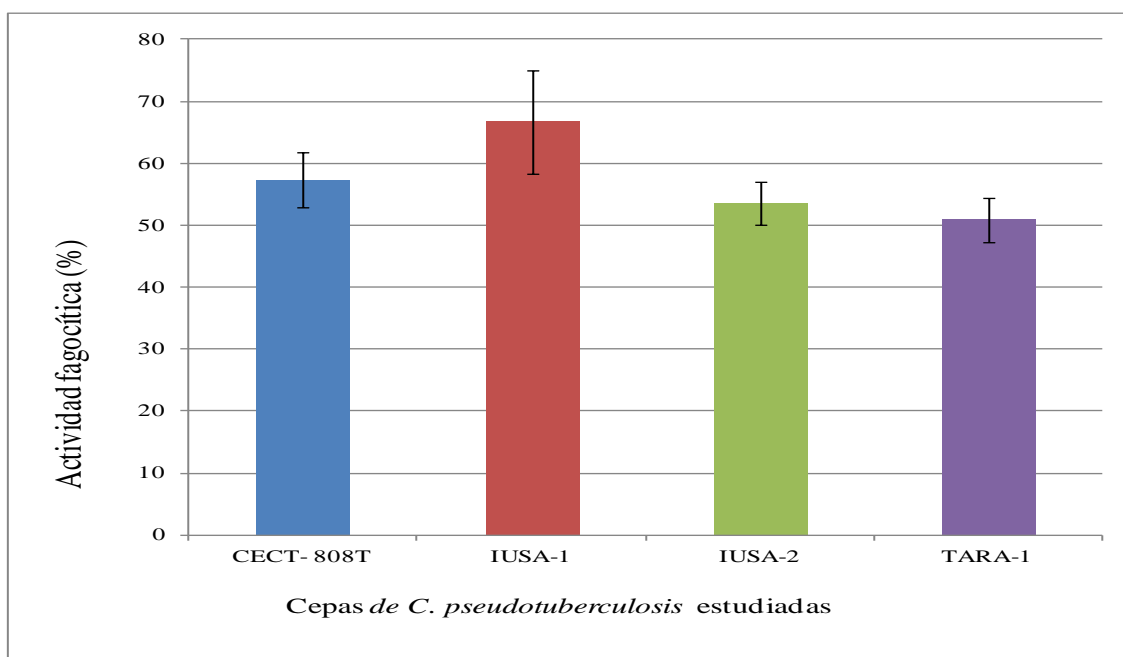


Tabla 11. Datos numéricos expresados en porcentaje de la fagocítica de la línea celular J774 sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis*, tras 120 minutos de incubación a una MOI $10 \approx 1$

CEPAS	Porcentaje de fagocitosis
CECT-808T	57,27
IUSA-1	66,66
IUSA-2	53,50
TARA-1	50,90

IV.3.3.- PERSISTENCIA Y/O REPLICACIÓN INTRACELULAR EN LA LÍNEA CELULAR DE RATÓN J774

En la Figura 14 y Tabla 12 observamos la evolución intracelular de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular fagocítica de ratón J774, que fue inoculada con una MOI $10 \approx 1$. Los índices de proliferación intracelular (índice I_{PRO}) de las cuatro cepas utilizadas en este estudio (CECT-808T, IUSA-1, IUSA-2 y TARA-1), que expresan la relación entre el número de bacterias viables a las 24 horas y 2 horas postinoculación, quedaron establecidos en 0,26, indicando la inexistencia de replicación activa de esta bacteria en el interior del macrófago en las condiciones estudiadas, pero sí una persistencia intracelular de *C. pseudotuberculosis*, al menos hasta las 72 horas postinoculación.

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores mostrados por las cepas estudiadas. Como observamos en la Figura 16, entre las 2 y 6 horas postinfección, se produce una drástica disminución de *C. pseudotuberculosis* en el interior de la línea celular J774, existiendo bacterias viables hasta las 72 horas, momento en que dimos por finalizada la experiencia al observar daño celular con destrucción del tapiz.

Figura 14.-Persistencia y replicación intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular fagocítica J774, que fue inoculada a una MOI 10 \approx 1

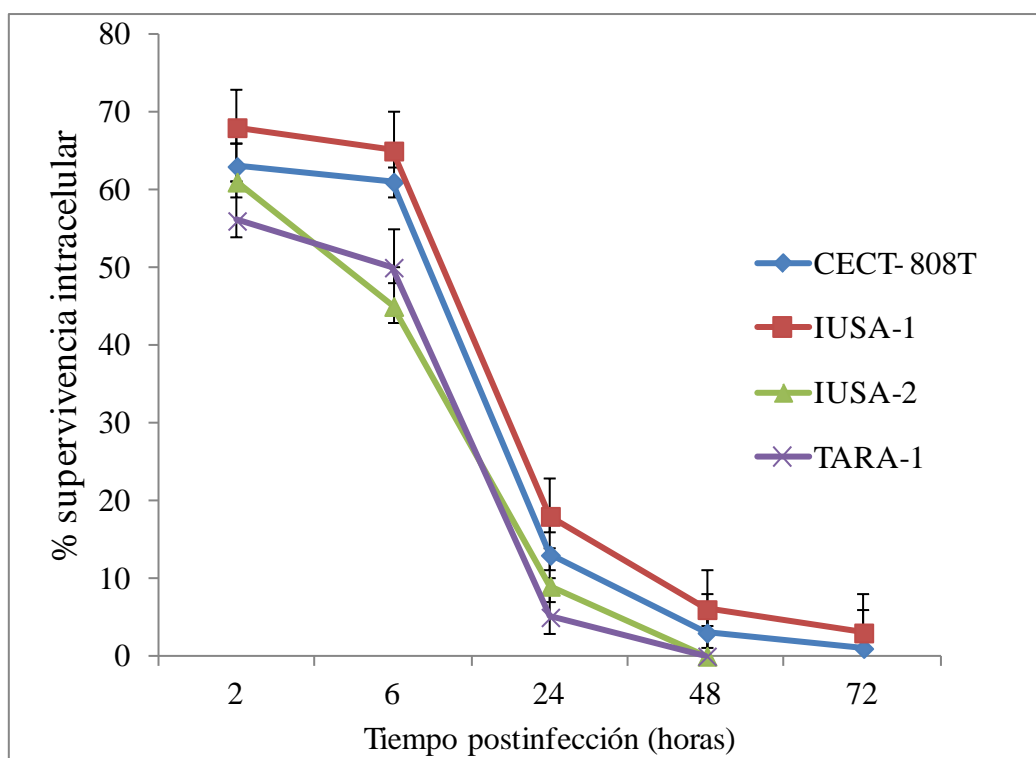


Tabla 12.- Datos numéricos de la persistencia y replicación intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular fagocítica J774 inoculada a una MOI 10 \approx 1

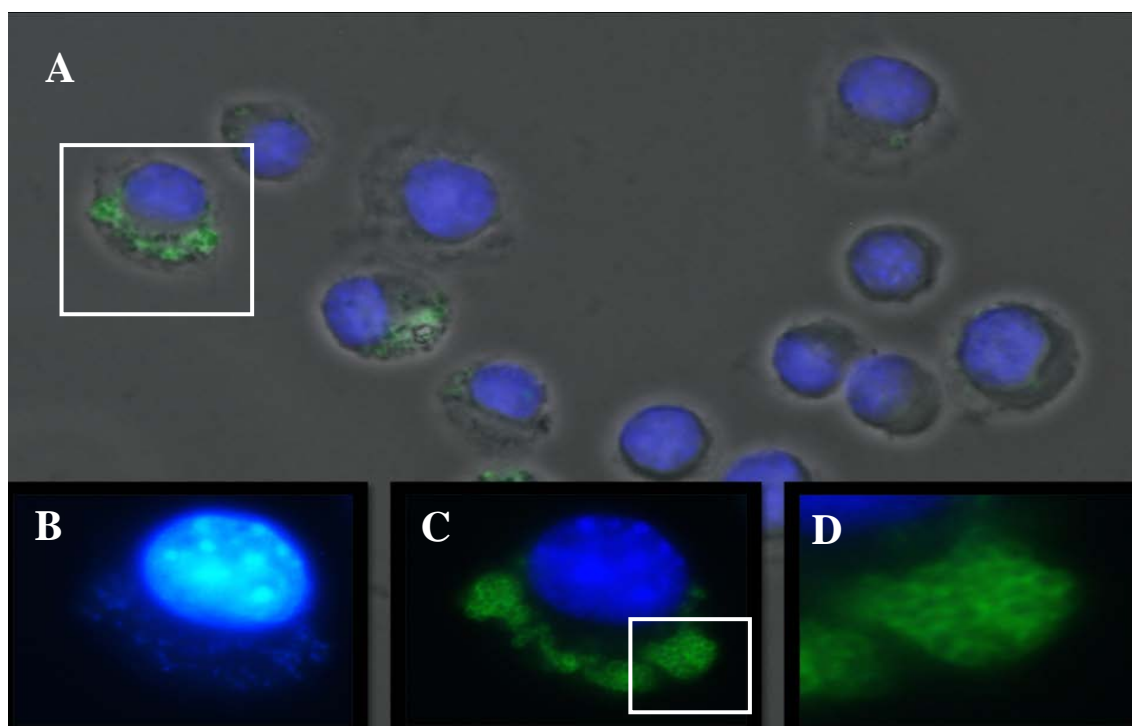
CEPAS	Tiempo de infección (horas)				
	2	6	24	48	72
CECT-808T	63,76	61,04	13,32	3,34	1,32
IUSA-1	68,34	65,65	18,21	6,76	3,31
IUSA-2	61,43	45,35	9,78	0	0
TARA-1	56,98	50,32	5,33	0	0

IV.3.4.- ESTUDIO DE LA FAGOCITOSIS POR INMUNOFLUORESCENCIA

La microscopia de fluorescencia confirmó la localización intracelular de *C. pseudotuberculosis*. En las imágenes, las bacterias intracelulares se marcaron en verde con el anticuerpo secundario alexa fluor-488, mientras que el ADN quedó marcado en azul por acción del DAPI (Figura 15). Se detectaron bacterias intracelulares hasta pasadas las 48-72 horas con una morfología redondeada y marcadas con DAPI,

indicando la integridad de su ADN y su viabilidad en el interior de los macrófagos. En la Figura 15A se observa la superposición de imágenes de fluorescencia y contraste de fase, donde las bacterias intracelulares quedan marcadas en verde y el ADN en azul. La Figura 15B se corresponde con la imagen magnificada con sobreexposición del DAPI para la visualización del ADN celular y bacteriano. La Figura 15C muestra la imagen magnificada de un macrófago con bacterias fagocitadas, mientras que la imagen 15D muestra la imagen magnificada para la visualización de bacterias fagocitadas.

Figura 15.- Fagocitosis de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular macrofágica J774 a una MOI de $10 \approx 1$ mediante inmunofluorescencia

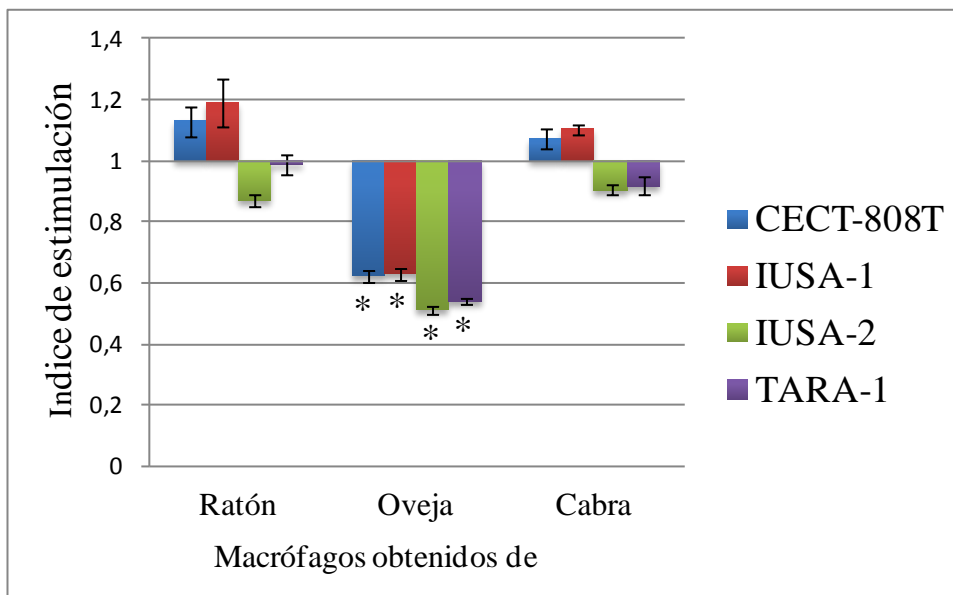


IV.3.5.- EXPLOSIÓN RESPIRATORIA Y CONTENIDO DE PEROXIDASA DE LEUCOCITOS DE RATÓN, OVEJA Y CABRA

En la Figura 16 y Tabla 13 observamos los resultados del índice de explosión respiratoria, mientras que en la Figura 17 y Tabla 14 se representan los resultados obtenidos del contenido de peroxidasa en macrófagos de ratón (línea celular J774), oveja y cabra, tras la exposición con *C. pseudotuberculosis*, a una MOI $10 \approx 1$.

Respecto al índice de explosión respiratoria, se encontraron diferencias estadísticamente significativas atendiendo a la especie de procedencia de los macrófagos utilizados. Como se aprecia en la Figura 16 y Tabla 13, se produjo la inhibición de la explosión respiratoria de los fagocitos de oveja ($p < 0,05$), respecto a los valores encontrados en ratón y cabra, con todas las cepas de *C. pseudotuberculosis* utilizadas. Sin embargo, como observamos en la Figura 17 y Tabla 14, ninguna de las cepas estudiadas produce la inhibición de la producción del contenido de peroxidasa, y en el análisis estadístico de los datos entre las especies utilizadas, muestra únicamente diferencias estadísticamente significativas con las cepas CECT-808T, IUSA-2 y TARA-1 en macrófagos de ratón ($p < 0,05$).

Figura 16.- Índice de explosión respiratoria en macrófagos de ratón, oveja y cabra infectados con *C. pseudotuberculosis*, a una MOI $10 \approx 1$

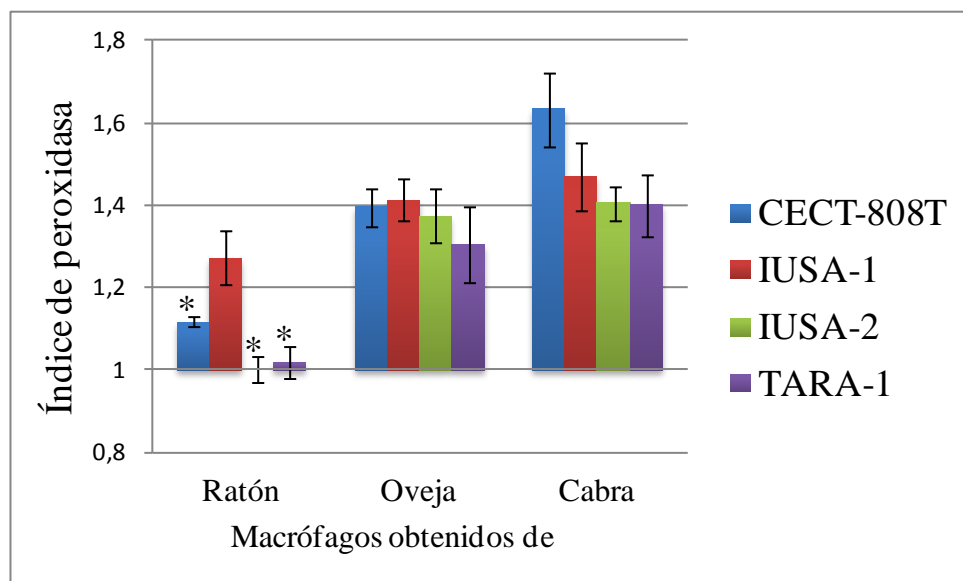


*diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 13.- Datos numéricos del índice de la explosión respiratoria en leucocitos de ratón, oveja y cabra infectados con *C. pseudotuberculosis*

CEPAS	Macrófagos obtenidos de		
	ratón	oveja	cabra
CECT-808T	1,12	0,62	1,073
ÍUSA-1	1,18	0,62	1,103
IUSA-2	0,87	0,51	0,90
TARA-1	0,98	0,54	0,91

Figura 17.- Contenido de peroxidasa en leucocitos de ratón, oveja y cabra infectados con *C. pseudotuberculosis*



*diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 14.- Datos numéricos del contenido de peroxidasa en leucocitos de ratón, oveja y cabra infectados con *C. pseudotuberculosis* expresados como índice de estimulación

CEPAS	Macrófagos obtenidos de		
	ratón	oveja	cabra
CECT-808T	1,12	1,40	1,63
IUSA-1	1,27	1,41	1,47
IUSA-2	1,00	1,37	1,40
TARA-1	1,02	1,31	1,40

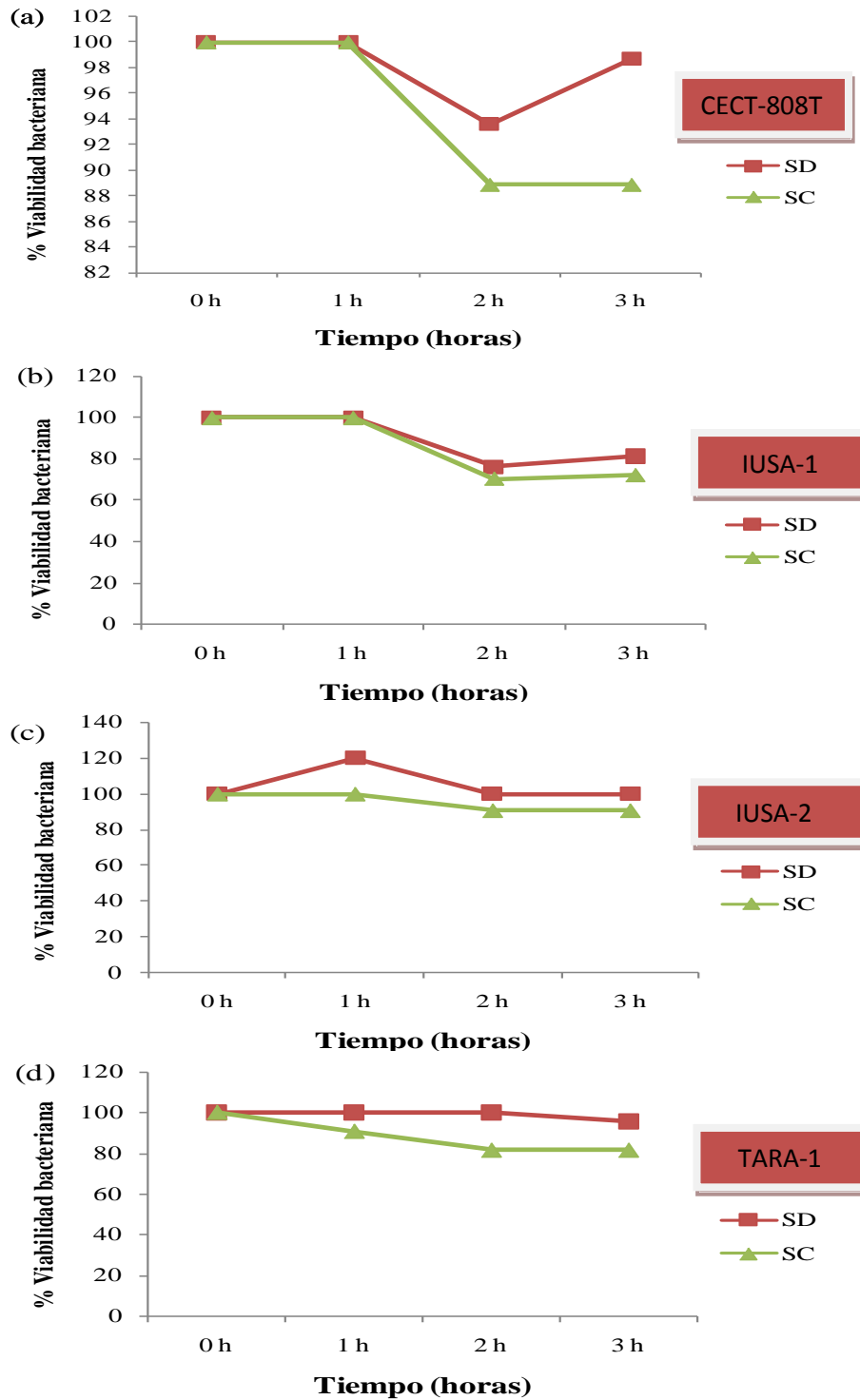
IV.4.- EFECTO BACTERICIDA DEL SUERO DE CABRA Y OVEJA SOBRE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

La resistencia/susceptibilidad de las cepas de *C. pseudotuberculosis* analizadas en este estudio, frente al efecto bactericida del suero de cabra y oveja se puede observar en las Figuras 18 y 19, respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje de bacterias viables tras la incubación con el suero completo de cabra y oveja (SC), durante 3 horas a 37°C. Los resultados muestran el valor medio de cada lectura realizada por triplicado, incluyendo los controles de cada una de las experiencias realizadas tras la incubación con suero descomplementado (SD), por tratamiento térmico para la eliminación del sistema del complemento.

Tomando como base para la interpretación de esta prueba, la directriz que señala RL. Davies (1991), que considera a una cepa resistente al efecto bactericida del suero cuando tras 3 horas de incubación presenta un porcentaje de viabilidad superior al 100%, todas las cepas estudiadas mostraron un patrón de respuesta similar cuando fueron incubadas con suero de cabra y, de la misma manera, cuando fueron incubadas con suero de oveja.

En la Figura 18 observamos que las cuatro cepas *C. pseudotuberculosis* estudiadas fueron susceptibles al efecto bactericida del suero de cabra, mientras que, en la Figura 19 podemos observar que esas mismas cepas analizadas fueron resistentes al efecto bactericida del suero de oveja.

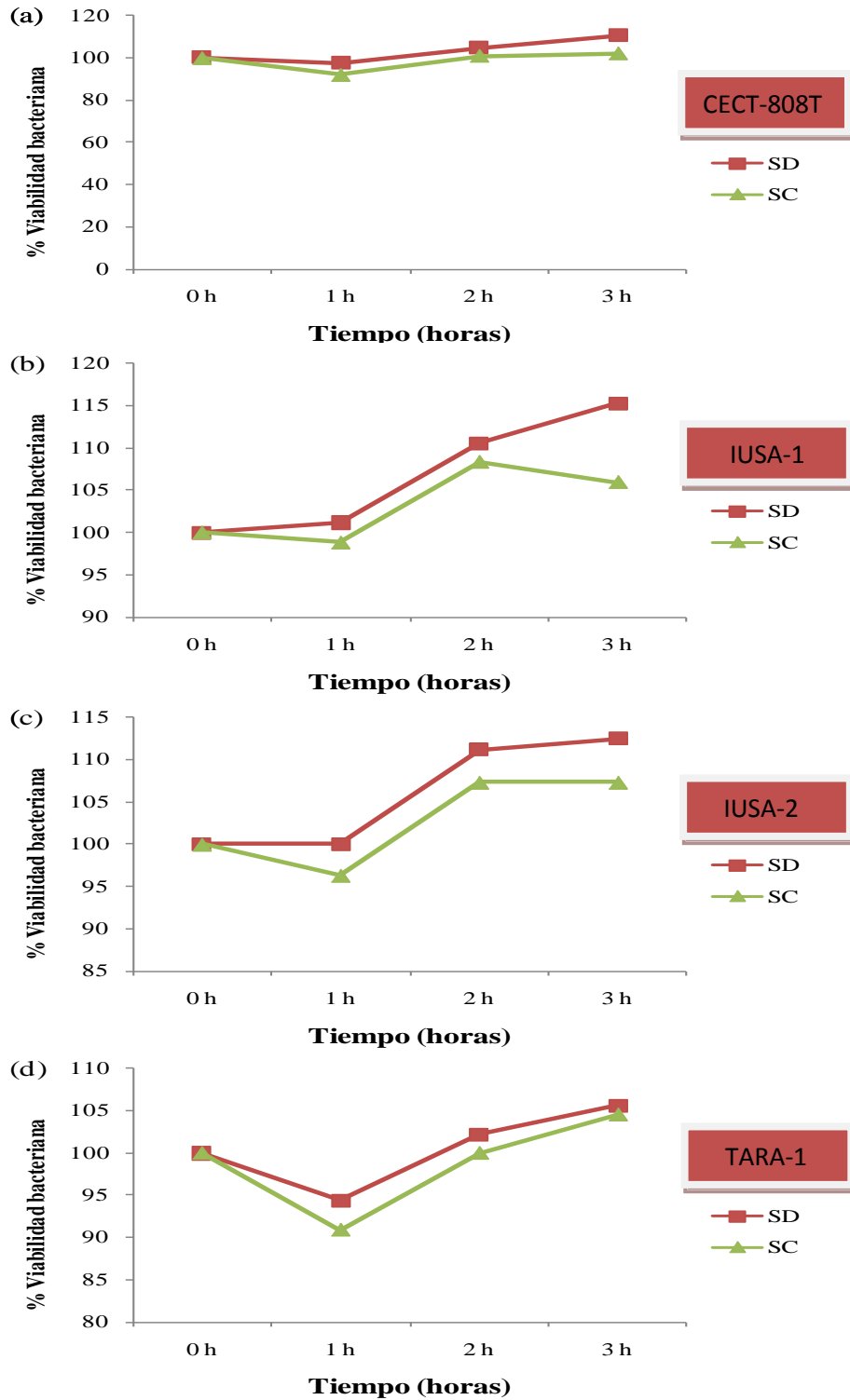
Figura 18.- Resistencia del efecto bactericida del suero de cabra de las cepas de *C. pseudotuberculosis* estudiadas, expresada como porcentaje de viabilidad de cada cepa estudiadas, medida tras diferentes tiempos de incubación



SD: Suero descomplementado anti-*C. pseudotuberculosis*

SC: Suero completo anti-*C. pseudotuberculosis*

Figura 19.- Resistencia del efecto bactericida del suero de oveja de las cepas de *C. pseudotuberculosis* estudiadas, expresada como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación



SD: Suero descomplementado anti-*C. pseudotuberculosis*
 SC: Suero completo anti-*C. pseudotuberculosis*

V.- DISCUSIÓN

V.1.- ASPECTOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LAS CEPAS DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* OBJETO DE ESTUDIO

La clínica encontrada en los animales, de los cuales se tomaron las muestras de los abscesos, a partir de los cuales aislamos cada una de las cepas estudiadas IUSA-1, IUSA-2 y TARA-1 (Tabla 2) en este trabajo, ha sido absolutamente convencional y, por tanto, coincidente con las formas clásicas de la enfermedad en los pequeños rumiantes, que se manifiestan con linfadenitis caseosa superficial, afectando a los ganglios linfáticos submandibulares y a la región retromamaria. Esta última localización se ha descrito ocasionalmente en el ganado caprino canario (Real y cols., 1993). Estos aspectos clínicos son coincidentes con los señalados previamente por otros autores (Unanian y cols., 1985; Brown y cols., 1986; Collins y Cummins, 1986). También coincide el curso subagudo a crónico, encontrado en los animales estudiados, respecto a los que señalan referencias previas (León, 1985). Y, aunque el estudio clínico-patológico fue muy reducido en número, no hemos apreciado otros cuadros que también se citan en la bibliografía como bronconeumonías caseosas (Addo y Dennis, 1977), abortos (Benham y cols., 1962), artritis y bursitis (Beer, 1981; Zarzuelo, 1981) epididimitis y endometritis (Mostafa y cols., 1973), ni cuadros septicémicos en animales jóvenes (León, 1985). Coincidiendo con Unanian y cols. (1985), no apreciamos diferencias significativas en el aspecto general relacionado con su peso corporal entre los animales enfermos y los sanos de los colectivos estudiados clínicamente (Tabla 2), aunque dicho valor no fue medido individualmente.

Aunque no lo investigamos específicamente, tampoco hemos localizado, ni comprobamos la existencia de alguna evidencia clínica de la afección de ganglios linfáticos viscerales o de órganos internos, como se señalan en algunos casos (Zarzuelo, 1981; Batey, 1986a), por lo que, atendiendo a la clasificación de L. León (1985), de las dos formas posibles de la enfermedad, la que hemos estudiado es la linfadenítica. Pero, si nos centramos en la clasificación realizada por otros autores (Zarzuelo, 1981; Guada, 1986), la forma clínica presente en los animales del estudio fue la nodular, caracterizada

por ganglios linfáticos de consistencia pastosa, pudiendo afectar a cualquier ganglio corporal.

Debido a la homogeneidad en la respuesta de nuestras cuatro cepas a los distintos antimicrobianos utilizados en este estudio, y aunque no entraban a formar parte de nuestros objetivos iniciales, hemos considerado interesante incluir estos datos en la discusión, aún conscientes de que corresponden a un número limitado de cepas como para poder considerar dichos resultados concluyentes. Según Judson y Songer (1991) las cepas de *C. pseudotuberculosis* nitrato reductasas negativas presentan una alta resistencia a la acción de los aminoglucósidos. Asimismo, estos autores refieren una mayor resistencia del biovar *ovis* frente al biovar *equi* (nitrato positivo). A este respecto las cuatro cepas que formaron parte de nuestro trabajo (Tabla 3) fueron nitrato reductasa negativas y, por tanto, se corresponden con *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

En nuestro estudio entre los tres aminoglucósidos incluidos (gentamicina, kanamicina y estreptomycin) hemos encontrado una sensibilidad variable a los mismos, habiéndose mostrado todas nuestras cepas sensibles a la gentamicina y resistentes a la estreptomycin. Respecto a la kanamicina todas las cepas (Tabla 4) fueron resistentes excepto TARA-1, que mostró una sensibilidad intermedia. Bryan y cols. (1980) justificaron esta resistencia con la actividad nitrato reductasa, que incapacita el transporte de los aminoglucósidos por la membrana bacteriana. La gentamicina, según nuestros resultados, es activa frente a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*, por lo que consideramos que la explicación dada por Bryan y cols. (1980) no debe ser la única causa de resistencia o sensibilidad a los aminoglucósidos. Romero y cols. (2008) obtuvieron tan solo un 32% de sensibilidad para este antimicrobiano, mientras que Estevao y cols. (2007) describen una alta sensibilidad a la gentamicina y kanamicina. En nuestro estudio, las cuatro cepas resultaron sensibles a la gentamicina, mientras que frente a la kanamicina, solo tres cepas mostraron resistencia antibiótica. Romero y cols. (2008), así como Estevao y cols. (2007) describen baja sensibilidad para otro antimicrobiano del grupo, la neomicina, la cual no hemos utilizado en nuestro estudio. Estos mismos autores señalan a la nitrofurantoina como un antimicrobiano poco efectivo *in vitro* frente a *C. pseudotuberculosis*, si bien el 100% de sus cepas mostraron una sensibilidad intermedia, a diferencia de nuestras cepas que mostraron un 100% de resistencia. Por otro lado, se han descrito aislamientos resistentes a los nitrofuranos

(Judson y Songer, 1991), y todas nuestras cepas analizadas mostraron resistencia a la nitrofurantoína.

Respecto al grupo de las fluorquinolonas, Estevao y cols. (2007) y Romero y cols. (2008), encontraron una alta sensibilidad a la ciprofloxacina y norfloxacina. En nuestro estudio (Tabla 4), todas las cepas utilizadas fueron sensibles a la enrofloxacin, único antimicrobiano dentro del grupo de las quinolonas que incluimos. Romero y cols. (2008), obtuvieron un 83,9% de sensibilidad para otra fluorquinolona, la orbifloxacina. Sin embargo, frente al ácido nalidíxico, todas nuestras cepas mostraron un 100% de resistencia, coincidiendo con Romero y cols. (2008). En definitiva, el grupo de las fluorquinolonas se presenta muy efectivo *in vitro* frente a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

Y, respecto al grupo de las penicilinas, Estevao y cols. (2007) y Romero y cols. (2008) encontraron una elevada sensibilidad a la penicilina, discrepando nuestros resultados para la penicilina G (Tabla 4), frente a la que nuestras cepas mostraron mayoritariamente sensibilidad intermedia (3 de las 4 cepas utilizadas). Estos autores encontraron también en este grupo una gran resistencia para la oxacilina (35%), pero en nuestro estudio no se incluyó este antimicrobiano pero sí la cloxacilina, antimicrobiano muy cercano al anterior, y los resultados obtenidos para este antibiótico mostraron una resistencia del 100% de nuestras cepas, mucho más alta que la obtenida por estos autores para la oxacilina. Dentro del subgrupo de las aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), encontramos una elevada sensibilidad, resultados que concuerdan con los obtenidos por Romero y cols. (2008) que obtuvieron un 90,3% de sensibilidad para la amoxicilina, y del 77,4% para la ampicilina.

En el grupo de las cefalosporinas, utilizamos en nuestro estudio la cefuroxima como representante de la segunda generación de cefalosporinas, y la cefalotina en el grupo de las cefalosporinas de primera generación. Ambas cefalosporinas resultaron ser poco efectivas *in vitro* frente a este patógeno, resultados que no concuerdan con los obtenidos por Estevao y cols. (2007), que usaron la cefotaxima (tercera generación), ni con Romero y cols. (2008), que obtuvieron un 93,5% de sensibilidad para la cefazolina (primera generación).

En general, nuestros resultados son bastante concordantes con los obtenidos por Zhao y cols. (1991) quienes probaron la concentración mínima inhibitoria de 23 antibióticos sobre 86 cepas de este microorganismo aisladas en Japón. Este trabajo evidenció que la mayor susceptibilidad antibiótica se obtuvo con la penicilina G, la ampicilina, la eritromicina y la bacitracina, mientras que todas las cepas resultaron resistentes a la nitrofurantoína. El resto de las cepas tenían un comportamiento intermedio, aunque cuatro de ellos mostraban poca actividad, como la estreptomicina, la kanamicina, amikacina y novobiocina. Respecto a estos últimos antimicrobianos citados, la amikacina no entró a formar parte de nuestro estudio, y nuestras cepas (Tabla 4) mostraron resistencia antibiótica frente a la estreptomicina, kanamicina y novobiocina, resultados que discrepan de los presentados por estos últimos autores. Tampoco hay coincidencia respecto a lo que obtuvieron estos autores para la sensibilidad a la penicilina, pues la mayoría de nuestras cepas mostraron una sensibilidad intermedia.

Encontramos cierta concordancia en la acción de los macrólidos utilizados con nuestras cepas (oleandomicina y eritromicina). Respecto a la eritromicina, Estevao y cols. (2007) muestran una alta sensibilidad. No hemos podido contrastar los resultados obtenidos con la oleandomicina que ha mostrado en nuestro estudio una alta sensibilidad. Este antimicrobiano no ha sido incluido en estudios anteriores, quizá debido en parte a las sugerencias realizadas por investigadores anteriores que recomiendan el uso de la penicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, tetraciclina, eritromicina, cefalosporina, cloranfenicol y rifampicina. Estos autores también hacen referencia a la diferencia de sensibilidad *in vitro* e *in vivo*, dado que el microorganismo suele estar encapsulado dentro de un nódulo linfático (Coyle y Lipsky, 1990; Judson y Songer, 1991; Von Graevenitz y Krech, 1992; Aleman y Spier, 2001).

Tanto Romero y cols. (2008) como Estevao y cols. (2007) añaden a esta lista de antimicrobianos que ofrecen buenos resultados frente a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* la vancomicina, tetraciclina y cloranfenicol, este último actualmente apartado de la relación de productos disponibles para su uso en salud animal y humana. Romero y cols. (2008) obtienen un 77,4% de cepas sensibles a la lincomicina y un 90,3% a la tetraciclina.

V.2.- PAPEL DE LAS CELULAS NO FAGOCITICAS EN LA PERMANENCIA INTRAORGANICA DE C. PSEUDOTUBERCULOSIS.

Entre los objetivos que se han pretendido cubrir con este trabajo experimental, destacan, por una parte un nuevo modelo que se conoce poco en referencia a las interacciones de la bacteria con los componentes extra e intracelulares de un organismo. Por otra parte, nunca se ha analizado la interacción de *C. pseudotuberculosis* con células estables no fagocíticas en cultivo, considerando para esto la especificidad del hospedador y la vía natural de entrada que marca el inicio de la infección. Y existe una ventaja en este tipo de estudio, pues podría representar un modelo más sencillo, capaz de explicar muchas incógnitas para el conocimiento de diversos aspectos de la patogenia de la enfermedad.

Es cierto que ha sido una limitación para el desarrollo de los distintos experimentos del presente trabajo, no contar con una línea celular propia de la especie caprina. En todo caso, sería muy útil poder comparar en el futuro nuestros resultados con los que podrían obtenerse directamente empleando células fagocíticas y no fagocíticas de origen caprino.

Como reflejan múltiples autores, es patente la relevancia que tiene en los pequeños rumiantes la linfadenitis caseosa ocasionada por *C. pseudotuberculosis*, y las repercusiones que desde el punto de vista productivo pueden tener en el ganado caprino y ovino (Abrigo, 1984; Cetinkaya y cols., 2002). Tras la entrada del patógeno en el organismo, este se difunde rápidamente al ganglio linfático más cercano. Una vez allí, *C. pseudotuberculosis* es fagocitado por los macrófagos, pudiendo permanecer en el interior celular como parásito intracelular facultativo, activando varios mecanismos de resistencia por parte de las células hospedadoras (Aleman y Spier, 2001; Williamson, 2001).

Los estudios de adherencia e invasión celular, tanto *in vitro* como *in vivo*, son usados actualmente para profundizar en aspectos relacionados con la patogenia de distintas enfermedades infecciosas que afectan a especies, tanto terrestres como

acuícolas. Los mecanismos involucrados en la adherencia, invasión y supervivencia intracelular de *C. pseudotuberculosis* en células no fagocíticas eran totalmente desconocidos hasta el inicio del presente trabajo. Además, hay que tener en cuenta que, la capacidad de ciertas bacterias patógenas, que afectan a distintas especies animales y a la especie humana, como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (Zierler y Galán, 1995), para invadir células no fagocíticas, es considerada como un importante factor de virulencia.

A la hora de considerar las diferentes etapas que tienen lugar en la patogenia de la seudotuberculosis, es bien conocida la capacidad del agente causal para utilizar las soluciones de continuidad de las heridas o la piel, así como el epitelio de las mucosas para penetrar en el organismo (León y cols., 2002b), lo cual determina la asiduidad con que se asientan las lesiones en determinadas regiones corporales (Stoops y cols., 1984; Real, 1989). Tras la multiplicación en la puerta de entrada, resulta fundamental la diseminación hemolinfática de la bacteria. En estas fases y, cuando la bacteria no dispone de una gruesa capa lipídica externa, o si tiene lugar en territorios fácilmente accesibles para los macrófagos (como las amígdalas o la mucosa respiratoria), la infección primaria puede adoptar un curso regresivo hacia la resolución en 2-3 semanas, mientras en circunstancias opuestas se instaura la infección crónica (Blood y cols., 1979).

La adherencia e internalización de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044, línea celular no fagocítica derivada de fibroblastos de células embrionarias de riñón ovino, no habían sido estudiadas con detalle previamente, a pesar de que dicha línea celular podría ser útil como modelo único, a la hora de profundizar en las fases patogénicas de esta enfermedad. Más aún si se considera que, hasta la fecha, no ha habido disponibilidad de alguna línea celular de características similares, obtenida a partir de la especie caprina, convirtiéndose así en el único modelo experimental, más cercano taxonómicamente a la especie caprina, disponible “*in vitro*” para abordar tales aspectos de la seudotuberculosis en los pequeños rumiantes.

Nuestros ensayos demuestran que *C. pseudotuberculosis* tiene capacidad de adherirse e invadir la línea celular FLK-BLV-044, con diferentes valores, en función de la cepa analizada, observándose una correlación positiva entre la tasa de adherencia e

invasión (Figuras 3, 4 y 5). Este hecho, en sí mismo, lo convierte en un factor que vendría a facilitar la permanencia de la bacteria en el hospedador y sugiere, que la instauración de la infección crónica también puede depender de que se produzca este mecanismo en los tejidos de un animal vivo, como hemos podido demostrar *in vitro*. Además, no encontramos en este aspecto, un comportamiento diferente en nuestro estudio entre las cepas que fueron aisladas originalmente de cabras o de ovejas, ni pueden asumirse unos niveles de invasión celular que hayan demostrado diferencias estadísticamente significativas entre las distintas cepas clínicas probadas.

Nuestros resultados de microscopía de fluorescencia y adherencia e invasión en la línea celular FLK-BLV-044 (Figuras 4 y 5, Tabla 6) evidencian niveles de eficiencia para la adherencia e invasión, similares entre las cepas probadas y una posible correlación entre la eficiencia de la adherencia y la invasión. La máxima eficiencia de invasión observada en el presente estudio es más baja que las mostradas por otros patógenos en estudios semejantes como *Brucella* (Pizarro-Cerdá y cols., 2000) y *Salmonella* (Mills y Finlay, 1994), pero similares o superiores a los descritos en *Campylobacter* (Friis y cols., 2005; Byrne y cols., 2007), *Burkholderia* (Martin y Mohr, 2000; Stevens y cols., 2003), *Hafnia alvei* (Padilla y cols., 2008) y *Prevotella* (Dorn y cols., 1998).

En el ensayo para determinar el tiempo de infección (Figura 3 y Tabla 5) en la invasión de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044, se detectaron bacterias en el interior celular a partir de 30 minutos postinfección, aumentando progresivamente hasta los 240 minutos postinfección. El proceso de invasión celular de *C. pseudotuberculosis* también depende de la cantidad de bacterias (Figura 6 y Tabla 7), sugiriéndose la saturación de los receptores celulares a partir de una multiplicidad de infección (MOI) superior a 100 (López-Doriga y cols., 2000).

El proceso de invasión fue dependiente de la temperatura (Figura 7 y Tabla 8), ya que la invasión bacteriana se inhibe parcialmente al incubar las células a 4°C, lo que sugiere que el metabolismo celular juega un papel activo en el proceso de invasión de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular analizada, tal y como sugieren diferentes autores (Magariños y cols., 1996; López-Doriga y cols., 2000; Padilla y cols., 2008; Acosta y

cols., 2009). Finalmente, la preincubación de *C. pseudotuberculosis* con azúcares y suero anti-*C.pseudotuberculosis* inactivado y completo (Figuras 8 y 9, Tabla 8), sugiere que se produce el bloqueo de receptores bacterianos específicos y/o ligandos celulares al observarse un drástico descenso en las tasa de internalización bacteriana. En muchos sistemas, la adhesión está mediada por lectinas presentes en la superficie del agente patógeno que se unen a hidratos de carbono complementarios de los tejidos del animal infectado (Acord y cols., 2005). Y se ha demostrado que hidratos de carbono solubles, reconocidos por las lectinas superficiales de bacterias, bloquean la adhesión de las bacterias a las células animales *in vitro* (Sharon, 2006), y por tanto su posterior internalización, como ocurre con nuestras cepas.

Nuestro estudio también demostró *in vitro* que, tras su internalización, el microorganismo permanece viable durante más de 120 horas en la línea celular FLK-BLV-044 (Figura 10 y Tabla 9). Este hecho sugiere con elevada probabilidad (aun no estando constatado estadísticamente), que la bacteria podría persistir o difundirse a través de células no fagocíticas en diferentes tejidos de las ovejas y cabras, facilitando así la progresión de la infección y de la enfermedad en los animales infectados. Esta circunstancia, que no se conocía hasta la fecha en el estudio de la enfermedad, vendría a sumar su efecto sinérgico en los hechos inmediatos que pueden suceder al traspaso de la puerta de entrada por el microorganismo en donde, tanto el factor piógeno como la exotoxina, le facultan para resistir las defensas antimicrobianas inespecíficas que se interponen a la infección, facilitando el acúmulo de fagocitos en el foco de multiplicación bacteriana (Jolly, 1966. Real, 1989; León y cols., 2002b).

El estudio de la invasión celular mediante inmunofluorescencia (Figura 11), también demostró que las bacterias muertas por calor o radiación ultravioleta no se localizaron en el interior celular, lo que sugiere que la internalización de *C. pseudotuberculosis* en células de la línea celular FLK-BLV-044 requiere de bacterias viables o que presenten los componentes de la superficie bacteriana intactas para interactuar con dicha superficie celular.

A la hora de comparar los resultados de diferentes estudios, hay que tener en cuenta una serie de consideraciones, ya que estos pueden verse influenciados por varios factores, como las características de las cepas analizadas, los medios de cultivo

bacterianos y la línea celular usada, o la utilización de métodos distintos a la hora de cuantificar las bacterias internalizadas. Elkamel y Thune (2003) y López-Dóriga y cols. (2000), trabajando con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con la línea celular EPC (línea epitelial de células de carpa), obtuvieron resultados contradictorios en la capacidad de replicación intracelular de este patógeno. En nuestro caso, la variabilidad que han podido inducir estos factores es muy reducida al haber realizado los experimentos por triplicado y someter a todas las cepas de estudio a los mismos métodos de evaluación en paralelo. Por otro lado, y con respecto a estudios similares realizados con *C. pseudotuberculosis*, no existe hasta la fecha referencia alguna que nos permita comparar los resultados obtenidos, por lo que sólo podemos concluir que la adherencia y la invasión intracelular dependen directamente de los factores señalados anteriormente.

Una vez hemos comprobado que diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* son capaces de penetrar en células no fagocíticas de origen ovino, y de multiplicarse y permanecer en el interior celular a través de estos resultados, estamos convencidos de que un mejor conocimiento de las interacciones de *C. pseudotuberculosis* en células no fagocíticas y, por tanto, de las interacciones bacteria-célula, puede ayudar al desarrollo de nuevas herramientas para combatir esta enfermedad, y también aumentará nuestra evidencia documental sobre el sistema inmune de las especies ovina y caprina.

En resumen, nuestros datos indican que *C. pseudotuberculosis* es capaz de invadir células no fagocíticas de origen ovino y que, una vez en su interior, es capaz de replicarse, permaneciendo viable durante más de 120 horas. Estos hallazgos *in vitro* son de sumo interés, ya que plantean la posibilidad de que este patógeno pueda difundirse *in vivo* a través de este tipo de células, facilitando la difusión del microorganismo, permitiéndole a la vez, cierto grado de protección frente a los mecanismos defensivos del hospedador infectado, otorgándole un nicho adecuado para su multiplicación y permanencia, permitiendo también el establecimiento del estado de portador en el curso de la infección.

En el organismo vivo, la diseminación de *C. pseudotuberculosis* tiene lugar de manera casi inmediata a la infección primaria (León y cols., 2002b). En nuestro modelo

experimental *in vitro* no podemos, ni hemos pretendido, valorar la participación de algunos factores de difusión que contribuyen de forma activa para la difusión local del microorganismo en la patogenia de la enfermedad. De esta manera, la exotoxina facilita el transporte y la difusión del microorganismo por vía linfática hasta el estrato linfático inmediato (nódulo linfático regional), y su efecto se concreta en un incremento de la permeabilidad vascular (Brown y cols., 1986; Carne y Onon, 1978), actuando directamente sobre las células endoteliales en el entorno del punto de infección y, posteriormente, en otros territorios orgánicos. Pero a la exotoxina también se le reconoce una acción fosfolipídica (por una fosfolipasa D) que ocasiona reacciones de contracción celular y, como consecuencia, aumento de la permeabilidad capilar (Carne y Onon, 1978). En definitiva, el efecto permeabilizante sobre las membranas celulares del organismo vivo, se traduce en facilitar la afluencia de granulocitos y macrófagos al punto de infección y, posteriormente, su incorporación a la corriente linfática y hemática (León y cols., 2002b). Y, desde la puerta de entrada, las corinebacterias se difunden por vía linfática, normalmente transportadas por los macrófagos, pero también libres, hasta los nódulos linfáticos regionales, e incluso hasta órganos internos, donde continúan su multiplicación bacteriana, a la par que producen las lesiones características (Hard, 1972; Blood y cols., 1979). Todas estas serían las principales limitaciones que no pueden ser comparables con los métodos desarrollados en nuestro estudio *in vitro*. Pero, en cualquier caso, la supervivencia de la bacteria en células no fagocíticas resulta esencial a la hora de facilitar la difusión del microorganismo en el hospedador vivo.

Una vez establecida la base de que *C. pseudotuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo, capaz de residir en el interior de células no fagocíticas, quedan abiertas nuevas incógnitas como líneas futuras de investigación en este campo específico. Completar en profundidad el estudio del tráfico intracelular de *C. pseudotuberculosis* en células no fagocíticas de los pequeños rumiantes puede permitirnos conocer las bases celulares y moleculares de dichos procesos, hoy en día totalmente desconocidos. Y, estudiar las estrategias de invasión y tráfico intracelular de *C. pseudotuberculosis* en células no fagocíticas, no solo puede ayudar al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y vacunas, sino también, a identificar aspectos desconocidos de las vías de señalización relacionadas con la respuesta inmune de base celular, frente a las infecciones por *C. pseudotuberculosis* y otros patógenos intracelulares de las especies animales y humana.

La interacción con células no fagocíticas animales, puede conferir a *C. pseudotuberculosis* cierto grado de protección frente a las defensas de las cabras y ovejas, o proporcionarle un nicho adecuado en el establecimiento del estado de portador. Además, la infección por este patógeno de células no pertenecientes al sistema inmune, podría afectar al curso de la infección en los tejidos, ya que actualmente se sabe que las infecciones bacterianas activan defensas celulares directa o indirectamente, a través de la inducción de mediadores proinflamatorios y citoquinas.

V.3.- INTERACCIONES DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* CON CELULAS FAGOCITICAS

La segunda parte de nuestro estudio la hemos desarrollado con la línea celular de ratón J744, de naturaleza macrofágica. Los macrófagos son células efectoras, destruyen una gran variedad de patógenos bacterianos que son fagocitados y expuestos a un medio ambiente perjudicial. No todos los microorganismos que entran en un fagocito especializado son expuestos a este medio perjudicial, y otros tantos tampoco llegan a ser realmente fagocitados por estas células. Los microorganismos, en muchos casos, invaden las células y forman una vacuola con características que son controladas por las bacterias patógenas y no por la célula fagocítica (Arenas y cols., 2000). Los macrófagos están presentes en todos los sistemas orgánicos, y constituyen una de las primeras barreras que un microorganismo encuentra cuando entra en un organismo superior.

Los macrófagos tienen un papel importante en la respuesta inmune, pues son los primeros en eliminar microorganismos invasores a través de la fagocitosis y la liberación de sustancias bactericidas como los radicales superóxido. Además, pueden atraer rápidamente otras células con capacidad de respuesta inmune, de los tejidos, sangre y hematopoyéticas, neutrófilos y monocitos por la liberación de citoquinas y sustancias quimiotácticas. Dado que los macrófagos son uno de los tipos de células que los patógenos intracelulares facultativos tienen probabilidades de encontrarse, tras su entrada en un hospedador, y debido a su destacado papel en la respuesta inmune, no resulta sorprendente que algunos de estos patógenos se hayan adaptado a vivir dentro de estas células como parte de su ciclo de vida, usando la parasitación intracelular como un

escudo contra otras respuestas inmunes de naturaleza humoral, que podrían resultarles perjudiciales.

Tal y como sucede en el organismo vivo, en la estrategia antifagocítica de *C. pseudotuberculosis* intervienen dos componentes de la célula bacteriana, la exotoxina y la capa lipídica externa. La exotoxina ejerce una acción en parte inhibidora del factor de agregación de los macrófagos, mientras que la capa lipídica presente en la zona externa de la pared bacteriana interviene decisivamente en la diseminación de la infección, actuando a tres niveles: 1) como un elemento quimiotáctico de atracción de los fagocitos, 2) mayor persistencia endofagocitaria al inducir una resistencia bacteriana a los enzimas líticos lisosomales, correspondiéndose directamente con el grosor de la capa lipídica de la pared celular de una cepa (Hard, 1972 y 1973), y 3) desarrollando un efecto patógeno leucotóxico que origina degeneración y lisis de macrófagos y polimorfonucleares (Tashjian y Campbell, 1983).

Estudios previos demostraron que, microorganismos intracelulares, como es el caso de *C. pseudotuberculosis*, desarrollan una serie de estrategias para sobrevivir en el interior celular. Hasta ahora, solamente pocos estudios (Stefanska y cols., 2010) investigaron las interacciones de *C. pseudotuberculosis* con los macrófagos. Pero se ha demostrado que este microorganismo se comporta esencialmente como una bacteria endocelular facultativa (Jolly, 1965; Cameron y Fuls, 1973), cualificada para la persistencia en el interior del fagocito, sobre todo en los macrófagos. Y es el lípido externo de la bacteria el que permite la formación de agregados bacterianos en el interior del fagocito, resistiendo de esta forma los enzimas lisosomales (Muckle y Gyles, 1983). Otros estudios realizados con yersinias patógenas humanas (*Y. enterocolitica*, *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*) han demostrado que estas bacterias son también capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos (Cavanaugh y Randall, 1959; Une, 1977; Yamamoto y cols., 1996; Pujol y Bliska, 2003).

En el presente trabajo se utilizaron cuatro cepas diferentes de *C. pseudotuberculosis*, CECT-808T, IUSA-1, IUSA-2 y TARA-1, cuyos datos sobre su origen y fuente se presentan en la Tabla 2. Nuestros resultados reflejan que, tras 2 horas de incubación, las cuatro cepas de *C. pseudotuberculosis* analizadas, presentaron valores similares en las tasas de fagocitosis en la línea celular J774 (Figuras 14 y 15).

Asimismo, concluimos que la tasa de fagocitosis aumenta con el tiempo de incubación. Dicha tasa comenzó a ser efectiva, para las cuatro cepas señaladas, a los 30 minutos postincubación (Figura 14), obteniendo un valor máximo a los 240 minutos. Pero no podemos ligar a estos resultados ningún efecto distintivo de nuestras cepas desde el punto de vista microbiológico, pues todas tuvieron un comportamiento similar, ni formaba parte de los objetivos del presente trabajo la búsqueda de diferencias en el grosor de la capa lipídica, que podría haberse realizado mediante estudios de microscopía electrónica. Sería muy útil la comparación de los resultados obtenidos con la línea celular J774 con los que ofrecerían macrófagos obtenidos directamente de ganado ovino y caprino, de rebaños en su medio natural, así como de animales gnotobióticos, pues se sugiere la existencia de diferencias patogénicas entre la oveja y la cabra, con respecto tanto a la difusión hemolinfática como al embolismo pulmonar de corinebacterias (Batey, 1986b). Y estos resultados serían especialmente relevantes investigando también lotes de animales previamente inmunizados con el anacultivo de *C. pseudotuberculosis*.

Nuestros resultados también permitieron concluir que *C. pseudotuberculosis* no se multiplica activamente en el interior celular de la línea J774 (Figura 16), ya que a partir de las 6 horas post-infección, se produce una drástica disminución del número de bacterias viables en el interior celular. Pero pudimos encontrar bacterias intracelulares hasta las 72 horas post-inoculación. Este hecho representa una clara ayuda, por parte del hospedador, a la hora de facilitar la progresión del patógeno en los animales infectados. Debemos enfatizar el papel que juega en el animal vivo la exotoxina bacteriana (Pépin y cols., 1991) como un factor de difusión de la infección, facilitando el transporte y la diseminación del microorganismo por vía linfática hasta el estrato linfático inmediato, pues las corinebacterias se difunden por vía linfática, normalmente transportadas por los macrófagos, pero también libres, hasta los nódulos linfáticos regionales e incluso hasta órganos internos (León y cols., 2002b). Además, con posterioridad, puede ocurrir una difusión secundaria, por vía hemática y linfática, que origina metástasis en vísceras diversas (Brogden y cols., 1984).

Al comparar los modelos *in vitro* e *in vivo*, el tiempo limitado de supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular macrofágica J774 (Figura 16) contrasta con

la persistencia frecuente de la infección que sucede en el hospedador vivo, cuya causa podríamos relacionar con diferentes hechos que suceden en el hospedador, como la difusión intraorgánica favorecida por la corriente linfática y hemática y la propia respuesta celular en la reacción anti-*C. pseudotuberculosis*. Por su parte, su supervivencia “*in vitro*” (Figura 16) está constreñida a la capacidad de las células para mantenerse viables en el medio de cultivo, una vez que se activan los mecanismos de muerte celular. En definitiva, la supervivencia de las corinebacterias en los macrófagos y su destrucción es un hecho conocido que permite su difusión intraorgánica (Tashjian y Campbell, 1983). No obstante, nuestros resultados se asemejan a los descritos por otros estudios previos que, tanto mediante inmunofluorescencia como por recuento bacteriano, encontraron bacterias dentro de estas células (McKean y cols., 2005, Stefanska y cols., 2010). Además, los resultados que obtuvimos por microscopia de fluorescencia demostraron un considerable potencial de *C. pseudotuberculosis* para ser fagocitado por la línea celular de ratón (J774) (Figura 17).

Estos experimentos, siendo limitados en cierta medida a la hora de establecer comparaciones con lo que ocurriría en un animal vivo, ayudan a entender mejor varios aspectos de la patogenia de la seudotuberculosis. Pero se necesita en el futuro una mejor identificación y caracterización de los factores de virulencia de este patógeno, para poder comprender mejor la patocronia de la enfermedad (Dorella y cols., 2006), y los factores que intervienen en el desarrollo de este proceso morboso en los animales vivos.

De otra parte, llama la atención que el estímulo con el patógeno sea capaz de inducir la inhibición de la explosión respiratoria de los fagocitos de oveja, respecto de los valores que presentan los fagocitos de ratón y cabra (Figura 18), siendo las diferencias encontradas estadísticamente significativas ($p < 0,05$). A pesar de que el tamaño de la muestra, en este caso, no fue suficientemente representativo como para concluir de manera tajante en este sentido, los resultados indican la posibilidad de que existan diferencias interespecíficas importantes, que pueden ser manifiestas, incluso entre ovejas y cabras. Sin embargo, tales diferencias no se producen cuando comparamos el contenido de peroxidasa de leucocitos de ratón, oveja y cabra (Figura 19).

Y, en la misma línea, sí encontramos diferencias interespecíficas, entre ovejas y cabras, al estudiar el efecto bactericida del suero de cada una de estas especies sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Figuras 20 y 21), pues todas las cepas estudiadas fueron susceptibles al efecto bactericida del suero de cabra, pero resistentes al de oveja.

VI.- CONCLUSIONES

PRIMERA.- La capacidad de invadir la línea celular FLK-BLV-044 por parte de *C. pseudotuberculosis* se ve influenciada, al menos, por los siguientes mecanismos: 1) metabolismo celular, y 2) presencia de receptores bacterianos y/o ligandos bacterianos específicos.

SEGUNDA.- *Corynebacterium pseudotuberculosis* es capaz de adherirse e invadir la línea celular FLK-BLV-044 y, una vez en su interior, se replica ligeramente permaneciendo viable durante al menos 6 días, planteando la posibilidad de que dicho patógeno se difunda a través de células no fagocíticas, pudiendo así facilitar la progresión de la infección en un hospedador.

TERCERA.- La línea celular macrofágica de ratón J774 ejerce una buena cinética de fagocitosis sobre *C. pseudotuberculosis* a partir de 120 minutos postinfección, donde la bacteria persiste, al menos, hasta las 72 horas postinoculación, aunque no se replica activamente en su interior.

CUARTA.- Demostrada la persistencia de *C. pseudotuberculosis*, al menos durante 72 horas, en la línea celular no fagocítica FLK-BLV-044 y fagocítica J774, sin embargo, la cantidad de bacteria presente en ambos casos es muy distinta en tiempos similares; tasa de invasión del 0,13% en la no fagocítica y una tasa de fagocitosis del 54,38% en la fagocítica a los 240 minutos postinfección.

QUINTA.- En las condiciones de nuestro estudio, la oveja se comporta como una especie más sensible que la cabra al estímulo inhibitorio de la explosión respiratoria de los macrófagos y al efecto bactericida del suero, promovidos tras el contacto previo con *C. pseudotuberculosis*, hecho que podría dificultar la eliminación del patógeno por el sistema inmunológico.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- Abrigo, J. 1984. Pseudotuberculosis o apostemas de los ovinos. Informe URISA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Bariloche. Argentina.
- Acord, J., Maskell, J. y Sefton, A. 2005. A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells. *Journal of Microbiology Methods* 60 (1), 55-62.
- Acosta, F., Real, F., Caballero, M.J., Sieiro, C., Fernández, A., Rodríguez, L.A. 2002. Evaluation of immunohistochemical and microbiological methods for the diagnosis of brown trout infected with *Hafnia alvei*. *Journal of Aquatic Animal Health* 14, 77-83.
- Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V y Real, F. 2009. Invasion and survival of gilt-head seabream (*Sparus aurata*) non-phagocytic cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 32 (6), 535-541.
- Addo, P.B. y Dennis, S.M. 1977. Corynebacteria associated with diseases of cattle, sheep and goats in northern Nigeria. *British Veterinary Journal*, 135, 334-339.
- Aleman, M. y Spier, S.J. 2001. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In: "Large Animal Internal Medicine", 3d ed. Edited by Smith P.B. St Louis: Mosby Co. pp. 1078-1084.
- Aleman, M., Spier, S.J., Wilson, W.D., Doherr, M. 1996. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982-1993). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209 (4): 804-809.
- Ali, H.S., Zaitoun, A.M. 1999. Studies on cutaneous suppurative lymphangitis in buffaloes at Assiut Governorate-Egypt. *Assiut Veterinary Medical Journal* 41, 208-222.
- Alonso J.L., Simón, M.C., Girones O., Múzquiz, J.L., Ortega, C., García, J. 1992. The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. *Research in Veterinary Science* 52, 267-276.
- Anderson, V.M., Nairn, M.E. 1984. Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. En: Les Maladies de la Chevre. *Les Colloques de l'INRA* 28, 605-609.
- Arenas, N., Staskevich, S., Avallay, A. y Mayorga, L. 2000. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infection and Immunity* 68, 4255-4263.
- Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J.R., Boisclair J., Simard, C., Belanger, D. 2003. Prevalence of and carcass condemnation from Maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Québec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine* 30 (59), 67-81.

Ayers, J.L. 1977. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 171, 1251-1254.

Baird, G.J., Fontaine, M.C. 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology* 137, 179-210.

Baird, G.J., Malone, F.E. 2010. Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA testing. *Veterinary Record* 166 (12), 358-62.

Barta, O. 1993. Serum's lymphocyte immunoregulatory factors (SLIF). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 4, 279-306.

Bartolomé, J., Roca, M.J., Marcote, E., Moreno, R. 1995. *Corynebacterium pseudotuberculosis* adenitis in a shepherd. *Medicina Clínica* 104, 699-701.

Batey, R.G. 1986a. "Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at Western Australian abattoir". *American Journal of Veterinary Research* 47 (2), 482-485.

Batey, R.G. 1986b. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal* 63, 269-272.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496.

Beer, J. 1981. La seudotuberculosis en "Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos". Edit Acribia. Vol. 2, 38-39.

Benham, C.L., Seaman, A. y Woodbine, M. 1962. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. *Veterinary Bulletin.*, 32, 645-657.

Bernheimer, A.W., Linder, R., Avigad, L.S. 1980. Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. *Infection and Immunity* 29, 123-131.

Blood, D.C., Henderson, J.A. y Radostits, O.M. 1979. Caseous lymphadenitis in sheep. In: "Veterinary Medicine". 5th ed. Bailliere Tindall. Londres. págs. 420-421.

Boesen, J.T., Larsen, M.H., Larsen, J.L., Ellis, A.E. 2001. *In vitro* interactions between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages and *Vibrio anguillarum* serogroup O2a. *Fish and Shellfish Immunology* 11, 415-431.

Bofill, P., Rivas, C.A., Ramírez, W., Montañés, J., Martínez, M., Quincoses, T., Reinaldo, L., Fustes, E. 1988. Manual de enfermedades infecciosas. Tomo I. ISCAH. ENPES. 132-138.

Braga, W.U., Chavera, A.E., González, A.E. 2006. Clinical, humoral, and pathologic findings in adult alpacas with experimentally induced *Corynebacterium*

pseudotuberculosis infection. *American Journal of Veterinary Research* 67 (9), 1570-1574.

Braga, W.U., Schul, S., Nuñez, A., Pezo, D., Franco, E. 2007. A primary *Corynebacterium pseudotuberculosis* low dose infection in alpacas (*Lama pacos*) protects against a lethal challenge exposure. *Small Ruminant Research* 72, 81-86.

Brogden, K.A., Cutlip, R.C. y Lehmkuhl, H.D. 1984. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lamb. *American Journal of Veterinary Research* 45 (8), 1532-1534.

Brogden, K.A., Chedid, L., Cutlip, R.C., Lehmkuhl., H.D., Sacks J. 1990. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. *American Journal of Veterinary Research* 51 (2), 200-202.

Brown, C.C., Olander, H.J., Biberstein, E.L. y Morse, S.M.1986. Use of a toxoid vaccine to protect goat against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 47, 1116-1119.

Brown, C.C., Olander, H.J. 1987. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: A review *Veterinary Bulletin* 57, 1-12.

Bryan, L. E; Nicas, T; Holloway, B. W; Crowther, C. 1980. Aminoglycoside-resistant mutation of *Pseudomonas aeruginosa* defective in cytochrome c552 and nitrate reductase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17, 71-79.

Burrell, D.H. 1978. Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. *Research in Veterinary Science* 24, 269-276.

Burrell, D.H. 1980. Caseous lymphadenitis in goats. *Australian Veterinary Journal* 57, 105-110.

Byrne, C.M., Clyne, M. y Bourke, B. 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Microbiology* 153, 561-569.

Cameron, C.M. 1972. Immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of the South African Veterinary Association* 43, 343-349.

Cameron, C.M. y Fuls, W.J. 1973. Studies on the enhancement of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 40, 103-114.

Carne, H.R. 1940. The toxin of *Corynebacterium ovis*. *Journal of Pathology* 51, 199-212.

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

Carne, H.R. y Onon, E.O. 1978. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on the endothelial cells of blood vessels. *Nature* 271, 246-248.

Casadevall, A. 1998. Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends in Microbiology* 6 (3), 102-106.

Cavanaugh, D.C. y Randall, R. 1959. The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of fleaborne plague. *Journal of Immunology* 85, 348-363.

Cedré, B. y Hernández, Y. 2012. Ensayo bactericida del suero para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas antimeningocócicas y anticoléricas. *VacciMonitor* 21(3), 37-46.

Cetinkaya, B., Karahan, M. y Atil, E. 2002. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology* 88,75-83.

Chikamatsu, S., Zhao, H.K., Kikuchi, N., Hiramune, T. 1989. Seroepidemiological survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep in Japan using Enzyme-linked immunosorbent assay. *Japanese Journal of Veterinary Science* 51 (5), 887-891.

Chirino-Zarraga, C., Scamelli, A., Rey-Valerion, C. 2005. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research* 65,170-175.

Clarridge, J.E., Spiegel, C.A. 1995. *Corynebacterium* and related organisms. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Edit., E. J. Barron, Ed., American Society for Microbiology, Washington, 357-370.

Collett, M.G., Bath, G.F., Cameron, C.M. 1994. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. En: *Infectious Diseases of livestock with special reference to southern Africa*, 2nd Edit., J. Coetzer, G.R. Thomson y R.C. Tustin, Eds, Oxford University Press, CapeTown, 1387-1395.

Collins, M.D. y Cummins, C.S. 1986. Genus *Corynebacterium* in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (P.H., Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.B. Holt. Eds.) Edit. Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. II, 1266-1276.

Cossart, P., Lecuit, M. 2000. Microbial pathogens, an overview. En: *Cellular Microbiology*. Cossart P, Boquet P Normark S, Rappuoli R. (eds) ASM Press: Washington DC pp. 1-10.

Coyle, M.B., Hollis, D.G., Groman, N.B. 1985. *Corynebacterium spp.* and other *coryneform organisms*. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 4th Edit., E. H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler y H.J. Shadomy, Eds, American Society for Microbiology, Washington, 198-199.

Coyle, M. y Lipsky, B. 1990. Coryneforme bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clinical Microbiology Review* 3, 227-246.

Cubero, M.J., Real, F., González, M. 2002a. Epidemiología de la pseudotuberculosis. *Revista Ovis* 78, 7-39.

Cubero, M.J., González, M., Martín, P., León, V. 2002b. "Estrategias de policía sanitaria en linfadenitis caseosa". *Revista Ovis* 78.

Dalton, H.M., March, P.E. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology* 9 (3), 252-255.

Davis, E.W. 1990. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in animals. En: Large Animal Internal Medicine, B.P. Smith, Ed., C.V. Mosby company, Toronto, 1120-1126.

Davies, R.L. 1991. Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Veterinary Microbiology* 29(3-4), 89-97.

Deitsch, K.W., Moxon, E.R. Wellems, T.E. 1997. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (3), 281-293.

Dercksen, D.P., Ter Laak, E.A., Schreuder, B.E. 1996. Eradication programme for caseous lymphadenitis in goats in The Netherlands. *Veterinary Record* 138 (10), 237.

Dercksen, D.P., Brinkhof, J.M., Dekker-Nooren, T., Maanen, K., Bode, C.F., Baird, G., Kamp, E.M. 2000. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology* 75 (2), 167-75.

Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., Miyoshi, A. y Azevedo, V. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research* 37, 201-218.

Dorn, B.R., Leung, K.L. y Progulsk-Fox, A. 1998. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infection and Immunity* 66, 6054-6057.

Edwards, R.A., Puente, J.L. 1998. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis, *Trends in Microbiology* 6 (7), 282-287.

Edwards, J., Shao, J., Ault, K., Apicella, M. 2000. *Neisseria gonorrhoeae* elicits membrane ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells. *Infection and Immunity* 68, 5354-5363.

Eggleton, D.C., Haynes, J.A., Middleton, H.D., Cox, J.C. 1991a. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial- corinebacterial vaccines. *Australian Veterinary Journal* 68 (10), 322-325.

Eggleton, D.C., Middleton, H.D., Doidge, C.V., Minty, D.W. 1991b. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Australian Veterinary Journal* 68 (10), 317-319.

El Aamri, A., Real, F., Acosta, F., Acosta, B., Valdivia, J., Ramos-Vivas, J. y Padilla, D. 2012. In Vitro Study of Adherence, Invasion and Persistence of *Streptococcus iniae* in Fibroblastic-like Fish Cell Line SAF-1. *Journal of Aquatic Animal Health* 24, 165-170.

Elkamel, A.A. y Thune, R.L. 2003. Invasion and replication of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish cell lines. *Journal of Aquatic Animal Health* 15, 167-174.

Ellis, T.M., Sutherland, S.S., Wilkinson, F.C., Mercy, A.R., Paton, M.W. 1987. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. *Australian Veterinary Journal* 64, 261-263.

Estevao Belchior, S., Gallardo, A., Abalos, A., Diaz, Y., Alvarez, L., Callejo, R., Prieto, M., Jodor, N. y Jensen, O. 2007. Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 39 (1), 44-46.

Euzeby, J.P. 1999. Revised Salmonella nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an Opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 927-930.

Euzeby, J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 590-592.

Finlay, B.B., Falkow, S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (2), 136-169.

Fontaine, M.C., Baird, G., Connor, K.M., Rudge, K., Sales, J., Donachie, W. 2006. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine* 24 (33-34), 5986-5996.

Fontaine, M.C., Baird G.J. 2008. Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research* 76, 42-48.

Fraser, G. 1961. Haemolytic activity of *Corynebacterium ovis*. *Nature* 189, 246.

Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutases. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 41 (0), 35-97.

Friis, L.M., Pin, C., Pearson, B.M. y Wells, J.M. 2005. In vitro cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiology Methods* 61,145–160.

Funke, G., Von Graevenitz, A., Clarridge, JE., Bernard, K.A. 1997. Clinical Microbiology of Coryneform bacteria. *Clinical Microbiology Review*. 10, 125-159.

Galan, JE. 1994. Interactions of bacteria with non-phagocytic cells. *Current Opinion in Immunology* 6 (4), 5490-5495.

Gezon, H.M., Bither, H.D., Hanson, L.A., Thompson, J.K. 1991. Epizootic of external and internal abscesses in a large goat herd over a 16-year period. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198, 257-263.

Goldberger, AC., Lipsky, BA., Plorde, JJ. 1981. Suppurative granulomatous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ovis* (*pseudotuberculosis*). *American Journal of Clinical Pathology* 76, 486-490.

Guada, F. 1986. Nueva profilaxis vacunal para una vieja enfermedad. XI Jornadas de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Palencia, 6-10.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, Y., Tschäpe, H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology* 23 (6) 1089-1097.

Häcker, H., Fürmann, C., Wagner, H., Häcker, G. 2002. Caspase-9/-3 activation and apoptosis are induced in mouse macrophages upon ingestion and digestion of *Escherichia coli* bacteria. *Journal of Immunology* 169 (6): 3172-3179.

Hard, G.C. 1972. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. *Journal of Medical Microbiology* 5, 483-491.

Hard, G.C. 1975. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infection and Immunity* 12, 1439-1449.

Harlow, E., Lane, D. 1988. Immunizations. En “Antibodies, a laboratory manual”. Ed. By E. Harlow y D.Lane. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp.53-138.

Harvey, HA., Ketteter, MB., Preston, A., Lubaroff, D., Williams, R., Apicella, MA. 1997. Ultrastructural analysis of primary human urethral epithelial cell cultures infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity* 65, 2420-2427.

Heithoff, D.M., Conner, C.P., Mahan, M.J. 1997. Dissecting the biology of a pathogen during infection. *Trends in Microbiology* 5 (12), 509-513.

Hodgson, A.L., Krywult, J., Corner, L.A., Rothel, J., Radford, A. 1992. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infection and Immunity* 60 (7), 2900-2905.

Hommez, J., Devriese, L.A., Vaneechoutte, M., Riegel, P., Butaye, P., Haesebrouck, F. 1999. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 954-957.

Hughes, C., Phillips, R., Roberts, AP. 1982. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infection and Immunity* 35, 270-275.

Hultren, SJ., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St Gerne, JW., Normark, S. 1993. Pilus and nopilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73, 887-901.

Isberg, R.R., Falkow, S. 1985. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* 317, 262-264.

Ismail, A.A., Hamid, Y.M.A. 1972. Studies on the effect of some chemical disinfectants used in veterinary practice in *Corynebacterium ovis*. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association* 32, 195-202.

Ireton, K., Cossart, P. 1998. Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 276-283.

Join-Lambert, O.F., Ouache, M., Canioni, D., Beretti, J.L., Blanche, S., Berche, P., Kayal, S. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatric Infectious Disease Journal* 25, 848-851.

Jolly, R.D. 1965. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. *New Zealand Veterinary Journal* 13,141-147.

Jolly, R.D. 1966. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. *Journal of Applied Bacteriology* 29, 189-196.

Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. 1993. Caseous lymphadenitis. Pathology of Domestic Animals. Fourth Edition. Academic Press, Inc. Chapter 3, 238-240.

Judson, R. y Songer, J.G. 1991. *Corynebacterium pseudotuberculosis* in-vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Veterinary Microbiology* 27, 145-150.

Kansau, I., Berger, C., Hospital, M., Amsellem, R., Nicolas, V., Servin, A., Bernet-Camard, M. 2004. Zipper-like internalization of Dr-Positive *Escherichia coli* by epithelial cells is preceded by an adhesin-induced mobilization of raft-associated molecules in the initial step of adhesion. *Infection and Immunity* 72, 3733-3742

- Keisari, Y., Kabha, K., Nissimov, L., Schlepper-Schafer, J., Ofek, Y. 1997. Phagocytobacteria interactions. *Advances in Dental Research* 11 (1), 43-49.
- Ketterer, MR., Shao, J., Hornick, D., Buscher, B., Bandi, V., Apicella, M. 1999. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infection and Immunity* 67, 4161-4170.
- Kim, KS. 2001. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infection and Immunity* 69, 5217-5222.
- Koneman, E.W., Allen, SD., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. 1999. Diagnóstico Microbiológico. Editorial. Médica Panamericana, Argentina, 653.
- Kotwal, G.J. 1997. Microorganisms and their interaction with the immune system, *Journal of Leukocytes Biology* 62 (4), 415-429.
- Kuria, J.K.N., Holstad, G. 1989. Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep-correlation between the hemolysis inhibition test and the ELISA test. *Acta Veterinaria Escandinavica* 30 (1), 109-110.
- Laak, E.A., Schreuder, B.E. 1991. Serological diagnosis of caseous lymphadenitis in goat and sheep. *Veterinary Record* 128 (18), 436-438.
- Laak, E.A., Bosch, J., Bijl, C.G., Schreuder, B.E.C. 1992. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *American Journal of Veterinary Research* 53 (7), 1125-1132.
- LeaMaster, B.R., Shen, D.T., Gorham, J.R., Leathers, C.W., Wells, H.D. 1987. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. *American Journal of Veterinary Research* 48 (5), 869-872.
- Leardini, N., Prieto, M., Martínez, C., Aguirre, L., Loaysa, R. 2002. Infecciones por bacilos Gram positivos aeróbicos, corinebacterias, Bacillus y Actinomyces. En: "Curso A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán". Departamento de Bacteriología, Servicio de Bacteriología Especial.
- Lee, C.A. 1996. Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infectious Agents and Disease Journal* 5 (1), 1-7.
- León, L. 1985. Patología y control de las infecciones animales por corinebacterias. IX Congreso Nacional de Microbiología. Sociedad Española de Microbiología (ed.), 2, 411-416.
- León, L., Garrido, F., González, M. 2002a. Anatomía patología de la pseudotuberculosis. *Revista Ovis* 78, 77-90.

León, L., Garrido, F., González, M., Cubero, M.J. 2002b. Patogenia de la pseudotuberculosis. *Revista Ovis* 78, 41-61.

León, L., Real, F., González, M., Garrido, F. y Cubero, M.J. 2002c. Diagnóstico de la seudotuberculosis o linfadenitis caseosa. *Revista Ovis*, 79: 33-49.

Lipsky, B.A., Goldberger, A.C., Tompkins, L.S., Plorde, J.J. 1982. Infections caused by non diphtheria corynebacteria. *Reviews of Infectious Diseases* 4, 1220-1235.

Literak, I., Horvathova, A., Jahnova, M., Rychlik, I., Skalka, B. 1999. Phenotype and genotype characteristics of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. *Small Ruminant Research* 32, 107-111.

Loewen, P.C. 1997. Bacterial catalases. En: "Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defenses". (Scandalios, JG, ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, New York, pp 273-308.

López-Doriga, M.V., Barnes, A.C., Dos Santos, N.M. 2000. Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. piscicida: evidence for receptor specificity and effect of capsule and serum. *Microbiology* 146, 21-30.

Liu, D.T.L., Chan, W.M., Fan, D.S.P., Lam, D.S.C. 2005. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *British Journal of Ophthalmology* 89, 245-246.

Luo, D. Y., Li, P., Xing, L., Zhao, G. Y., Shi, W., Zhang, S. L., Wang, X. L. 2006. DNA vaccine encoding L7/L12-P39 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Chinese Medical Journal* 119 (4), 331-334.

Lynch, M. y Kuramitsu, H. 2000. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 2 (10), 1245-1255.

Magariños, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. 1996. Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters* 138, 29-34.

Maki, L.R., Shen, S.H., Bergstrom, R.C., Stetenbach, L. 1985. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep, using an enzyme linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research* 46 (1), 212-214.

Martin, D.W. y Mohr, C.D. 2000. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infection and Immunity* 68, 24-29.

McCaffrey, R.L., Allen, L.A. 2006. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *Journal of Leukocyte Biology* 80, 1224-1230.

McKean, S., Davies, J. y Moore, R. 2005. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes and Infection* 7, 1352-1363.

- McNamara, P.J., Cuevas, W.A., Songer, J.G. 1995. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene* 156, 113-118.
- Medrano, G., Hung, A., Alvarado, A., Li, O. 2003. Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú* 14 (1), 61-67.
- Meier, C., Oelschlaeger, T., Merkert, H., Korhonn, T., Hacker, J. 1996. Ability of *Escherichia coli* that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infection and Immunity* 64, 2391-2399.
- Menzies, P., Muckle, A. 1989. The use of micro agglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. *Canadian Journal of Veterinary Research* 53, 313-318.
- Menzies, P.I., Muckle, C.A., Hwang, Y.T., Songer, J.G. 1994. Evaluation of an Enzyme-linked immunosorbent assay using and *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Small Ruminant Research* 13 (2), 193-198.
- Mills, S.D. y Finlay, B.B. 1994. Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 17, 409-423.
- Moller, K., Agerholm, J.S., Ahrens, P. 2000. Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. *Journal of Veterinary Medicine B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47, 55-62.
- Monteville, MR., Konkel, ME. 2002. Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. *Infection and Immunity* 70, 6665-6671.
- Monteville, MR., Yoon, JE., Konkel, ME. 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149, 153-165.
- Morrison, JR., Tillotson, GS. 1988. Identification of *Actinomyces (Corynebacterium) pyogenes* with the API 20 Strep system. *Journal of Clinical Microbiology* 26 (9), 1865-1866.
- Mostafa, A.S., Khater, A., Satyour, E.M. y El-Sawaf, S.A. 1973. Some aspects of reproductive failure due to *Corynebacterium ovis* infection in Merino ewes. *Journal of Egyptian Veterinary Medical Association*, 33, 127-132.
- Muckle, C.A. y Gyles, C.L. 1982. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 46, 206-208.

Muckle, C.A. y Gyles, C.L. 1983. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. *American Journal of Veterinary Research* 44 (6), 1149-1153.

Muckle, C.A., Gyles, C.L. 1986. Exotoxic activities of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Current Microbiology* 13, 57-60.

Nagy, G. 1976. Caseous lymphadenitis in sheep: methods of Infection. *Journal of the South African Veterinary Medical Association* 47, 197-199.

Nairn, M.E., Robertson, J.P. 1974. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. *Australian Veterinary Journal* 50, 537-542.

Nairn, M.E., Robertson, J.P., McQuade, N.C. 1977. The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination. En: Proceedings of the 54th Annual Conference of the Australian Veterinary Association, 159-161.

Oelschlaeger, T., Tall, B. 1997. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract. *Infection and Immunity* 65, 2950-2958.

Ojcius, D.M., Gachelin, G., Dautry-Varsat, A. 1996. Presentation of antigens derived from microorganisms residing in host-cell vacuoles. *Trends in Microbiology* 4 (2), 53-59.

Pacheco, L., Pena, R., Castro, T., Dorella, F., Bahia, R., Carminati, R., Frota, M., Oliveira, S., Meyer, S., Alves, F., Miyoshi, A., Azevedo, V. 2007. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology* 56(4), 480-6.

Padilla, D., Acosta, F., Bravo, J., Grasso, V., Real, F. y Vivas, J. 2008. Invasion and intracellular survival of *Hafnia alvei* strains in human epithelial cells. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1614-1622.

Padilla, D., Acosta, F., Vega, J., Sorroza, L., Román, L., Bravo, J., Real, F. y Vivas, J. 2010. Study of adherence, invasion and survival of *Hafnia alvei* in rainbow trout gonad fish cell line (RTG-2). *Fish Pathology* 45, 179-182.

Palmer, L., Reilly, T., Utsalo, S., Donnenberg, M. 1997. Internalization of *Escherichia coli* by human renal epithelial cells is associated with tyrosine phosphorylation of specific host cell proteins. *Infection and Immunity* 65, 2570-2575.

Paton, M.W., Mercy, A.R., Sutherland, S.S., Ellis, T.M. 1988. The influence of shearing and age on the incidence of caseous lymphadenitis in Australian sheep flocks. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 84, 101-103.

- Paton, M.W., Rose, I.R., Hart, R.A., Sutherland, S.S., Mercy, A.R., Ellis, T.M., Dhaliwal, J.A. 1994. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Australian Veterinary Journal* 71, 47-49.
- Paton, M.W., Rose, I.R., Hart, R.A., Sutherland, S.S., Mercy, A.R., Ellis, T.M. 1996. Post-shearing management affects the sero incidence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 26, 275-284.
- Paton, M.W. 2000. Applying the experience of CLA in the Southern Hemisphere. En: Proceedings of the Moredun Research Institute/Scottish Agricultural College Workshop on Caseous Lymphadenitis, 3-15.
- Paton, M.W., Collett, M.G., Pepin, M., Bath, G.F. 2005. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. En: Infectious Diseases of Livestock, 3rd Edit., J.A.W. Coetzer y R.C. Tustin, Eds, Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, 1917-1930.
- Peel, M.M., Palmer, G.G., Stacpoole, A.M., Kerr, T.G. 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clinical of Infectious Diseases* 24, 185-191.
- Pepin, M., Bismar, J., Marly. 1989. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. *Annales de Recherches Vétérinaires* 20, 111-115.
- Pépin, M., Pardon, P., Lantier, F., Marley, J., Levieus, D. y Lamand, M. 1991. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Veterinary Microbiology* 26, 381-392.
- Pépin, M., Paton, M. y Hodgson, A.L. 1994a. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Current Topics in Veterinary Research* 1, 63-82.
- Pépin, M., Pittet, J.C., Olivier, M., Gohin, I. 1994b. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *Journal of Leukocyte Biology* 56, 666-670.
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Gorvel, JP. 2000. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and Infection* 2, 829-835.
- Pizarro-Cerdá, J., Lecuit, M., Cossart, P. 2002. Measuring and analysing invasion of mammalian cells by bacterial pathogens: the *Listeria monocytogenes* system. *Veterinary Microbiology* 31, 161-176.
- Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P. 2006. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Pathology* 208 (2), 215-23.

Podschun, R., Teske, E., Ullman, U. 1991. Serum resistance properties of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolated from different sources. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 192, 279-285.

Pollard, T.D. 1995. Actin cytoskeleton. Missin link for intracellular bacterial motility. *Current Biology* 5 (8), 837-840.

Ponce De León, P.E.L.J., Gomes, P. 1983. Utilitárias informaoes sobre linfadenite caseosa de caprinos e ovinos e seu control. *Serie de Producao e Sanidade Animal*, 1.

Prasadarao, N.V., Wass, C.A., Huang, S.H., Kim, K.S. 1999. Identification and characterization of a nivel IbelO binding protein that contribuyes to *Escherichia coli* invasion of brain mien oscular endotelial cells. *Infection and Immunity*. 67, 1131-1138.

Preissner, KY., Shingh, C. 2000. Extracellular matrix and host cell surface. En: Cellular Microbiology. Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. (eds). ASM Press, Washington DC. 46-69.

Prospert, F., Lemoine, O., Serruys, E., Sternon, J. 1991. A case of febrile axillary adenopathy. *Acta Clinica Belgica*. 46, 183-188.

Pujol, C. y Bliska, J.B. 2003. The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity* 71, 5892-5899.

Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B., Carter, G. R. 1994. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. En: "Clinical Veterinary Microbiology", Wolfe Publishing Company, London, 137-143.

Quinn, F.D., Newman, G.W., King, C.H. 1997. In search of virulence factors of human bacterial disease. *Trends in Microbiology* 5 (1), 20-26.

Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. 2000. Caseous lymphadenitis in sheep and goats. En: "Veterinary Medicine", 9th Edit., W.B. Saunders, London, 727-730.

Real, F. 1989. Inmunoprevención de la linfadenitis caseosa ovina (por *Corynebacterium pseudotuberculosis*) mediante BCG (Bacilo de Calmette y Guerin). Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

Real, F., León, L. 1990. La linfadenitis caseosa ovina por *C. pseudotuberculosis*: estudio clínico e inmunoprevención mediante B.C.G. (Bacilo de Calmette y Guerin). *Medicina Veterinaria* 7 (12), 681-688.

Real, F., Leon, L., Acosta, B., Ferrer, O., Gutierrez, C. y Deniz, M.S. 1993. Seudotuberculosis caprina: descripción de una nueva forma clínica de la enfermedad. *A.Y.M.A.*, 33(6):177-179.

- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J. y Segal, A.W. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416, 291-297.
- Renshaw, H.W., Graff, V.P., Gates, N.L. 1979. Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Moraxella spp.* from internal abscesses in emaciated ewes. *American Journal of Veterinary Research* 40, 1110-1114.
- Rizvi, S., Green, L.E., Glover, M.J. 1997. Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Veterinary Record* 140, 586-587.
- Robins, R. 1991. Focus on caseous lymphadenitis. *State Veterinary Journal* 1, 7-10.
- Robles, C., Olachea, F. 2001. Salud y enfermedades de las majadas. En: "Ganadería ovina sustentable en la Patagonia Austral, tecnología de manejo extensivo". Editado por P. Borrelli y G. Oliva. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina, pp. 225-243.
- Romero, J.C., Suner, M., Batista, N. 2004. Linfadenitis por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en una paciente joven. *Revista Clínica Española*. 204, 388-389.
- Romero, S., Aparecido, R., Pinheiro, J., Soares, G. y Soares, R. 2008. Perfil de sensibilidad antimicrobiana in vitro de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de pernambuco, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*. 15 (3), 502-509.
- Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and Infection* 5 (14), 1307-1315.
- Ruiz, J., Quintana, M., Barreda, M. 1995. Aislamiento y clasificación bioquímica de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la provincia de La Habana. *Revista de Salud Veterinaria* 17, 307-309.
- Ruiz, J.L., Bulnes, C., Duran, R., Barrera, M., Rodríguez, N., Muñoz, M. 2003. Evaluación de un ELISA Indirecto para el diagnóstico de la linfadenitis caseosa ovina mediante la reproducción experimental y aspectos clínicos. *Revista Electrónica Veterinaria (REDVET)* 4 (5).
- Ruiz, L., Jerónimo, R., Barrera, M., Frías, M. 2007. Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. *Revista Electrónica Veterinaria* 2 (8).
- Schmiel, D.H., Miller, V.L. 1999. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and Infection* 1, 1103-1112.
- Schreuder, B.E., Ter Laak, E.A., Dercksen, D.P. 1994. Eradication of caseous lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed ELISA technique. *Veterinary Record* 135, 174-176.

Senturk, S., Temizel, M. 2006. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. *Veterinary Record* 159, 216-217.

Sharon, N. 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochemical and Biophysical Acta* 1760 (4), 527-537.

Shen, D.T., Jen, L.W., Gorham, J.R. 1982. The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Proceeding 3rd International Conference on Goat production and disease. Tucson Arizona, 445-448.

Shigidi, M.T. A.1978. An indirect haemagglutination test for the sero-diagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Research in Veterinary Science* 24, 57-60.

Simón, M.C., Negrodo, M.P., García, J., Gironés, O., Múzquiz, J.L., Alonso Martinez, J.L. 1987. Técnica de inmunofluorescencia indirecta aplicada a la detección de anticuerpos frente a la célula de *Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis*. *Medicina Veterinaria* 4, 7-8.

Smith, H. 1998. What happens to bacterial pathogens *in vivo*? *Trends in Microbiology* 6 (6), 239-243.

Songer, J.G., Beckenbach, K., Marshall, M.M., Olson, G.B., Kelly, L. 1988. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 49, 223-226.

Songer, J.G., Libby, S., Iandolo, J.J., Cuevas, W.A. 1990. Cloning and expression of Phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Echerichia coli*. *Infection and Immunity* 58 (1), 131-136.

Stefańska, I., Gieryńska, M., Rzewuska, M. y Binek, M. 2010. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish Journal of Veterinary Science* 13 (1), 143-149.

Stevens, M.P., Friebel, A., Taylor, L.A., Wood, M.W., Brown, P.J., Hardt, W.D. y Galyov, E.E. 2003. A *Burkholderia pseudomallei* type III secreted protein, BopE, facilitates bacterial invasion of epithelial cells and exhibits guanine nucleotide exchange factor activity. *Journal of Bacteriology* 185, 4992-4996.

Stoops, S.G., Renshaw, H.W., Thilsted, J.P. 1984. Ovine caseous lymphadenitis: Disease prevalence, lesion, distribution and thoracic manifestation in a population of mature culled sheep from western United States. *American Journal of Veterinary Research* 45 (3), 558-558.

Sutherland, S.S., Ellis, T.M., Mercy, A.R., Paton, M., Middleton, H. 1987. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Australian Veterinary Journal* 64, 263-266.

- Tachedjian, M., Krywult, J., Moore, R.J., Hodgson, A.L. 1995. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine* 13, 1785-1792.
- Tashjian, J.J. y Campbell, S.G. 1983. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopic study. *American Journal of Veterinary Research* 44, 690-693.
- Taylor, P.W., Kroll, H.P. 1983. Killing of an encapsulated strain of *Escherichia coli* by human serum. *Infection and Immunity* 39 (1), 122-131.
- Tejedor, M.T., Lupiola, P., Caballero, M.J., Corbera, J.A., Gutierrez, C. 2009. Multiple abscesses caused by *Salmonella enterica* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a dromedary camel. *Tropical Animal Health and Production* 41(5), 711-714.
- Ter Laak, E.A., Bosch, J., Bijl, G.C., Schreuder, B.E. 1992. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *American Journal of Veterinary Research* 53 (7), 1125-1132.
- Tran Van, G., Sansonetti, P. 2000. Cell adhesion molecules and bacterial pathogens. En: "Cellular Microbiology". Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. (eds). ASM Press, Washington D.C. 46-69.
- Unanian, M.M., Felicinao-Silva, A.E., Pant, K.P. 1985. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 17, 57-62.
- Une, T. 1977. Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica*: II. Interaction with cultured cells in vitro. *Microbiology and Immunology* 21, 365-377.
- Valli, V.E.O., Parry, B.W. 1993. Caseous lymphadenitis, En: "Pathology of domestic animals", Vol. 3, 4th Edit., K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy y N. Palmer, (Eds.). Academic Press, San Diego, pp 238-240.
- Vay, C., Almuzara, M. 2002. Actualización en bacilos Gram positivos, taxonomía, identificación e importancia clínica. II Simposio de Infectología y Microbiología Clínica.
- Von Graevenitz, A. y Krech, T. 1992. The genus *Corynebacterium*-Medical. En "The prokaryotes". Ballows A, Trüper H, Dworkin M, Harder W y Heinz Schleifer K, eds. Handbook on the Biology of Bacteria: ecophysiology, isolation, identification applications., Vol 2, Springer-Verlag.
- West, D.M., Bruere, A.N., Ridler, A.L. 2002. Caseous lymphadenitis. En: "The Sheep: Health, Disease and Production". Foundation for Continuing Education, Palmerston North, pp 274-279.

Williamson, L.H. 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 17, 359-371.

Wong, T.P., Groman, N. 1984. Production of diphtheria toxin by select isolated of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity* 43, 1114-1116.

Yamamoto, T., Hanawa, T., Ogata, S. y Kamiya, S. 1996. Identification and characterization of the *Yersinia enterocolitica* gsrA gene, which protectively responds to intracellular stress induced by macrophage phagocytosis and to extracellular environmental stress. *Infection and Immunity* 64, 2980-2987.

Yeruham, I., Braverman, Y., Shpigel, N.Y., Chizov-Ginzburg, A., Winkler, M. 1996. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and feasibility of transmission by houseflies. *Veterinary Quarterly* 18, 87-89.

Yeruham, I., Elad, D., Van-Ham, M., Shpigel, N.Y., Peri, S. 1997. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israel cattle: Clinical and epidemiological studies. *Veterinary Record* 140, 423-427.

Yeruham, I., Friedman, S., Elad, D., Perl, S. 2000. Association between milk production, somatic cell count and bacteria dermatoses in three dairy cattle herds. *Australian Veterinary Journal* 78, 250-253.

Yozwiak, M.L., Songer, J.G. 1993. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *American Journal of Veterinary Research* 54, 392-397.

Zaki, M.M. 1976. Relation between the toxogenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infected mice. *Research in Veterinary Science* 20, 197-200.

Zarzuelo, E. 1981. Linfadenitis caseosa. En: "Patología Infecciosa". Publicaciones Científicas Ovejero. León, pp 361-369.

Zhao, H.K., Morimura, H., Hiramune, T., Kikuchi, N., Yanagawa, R. y Serikawa, S. 1991. Antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from lesions of caseous lymphadenitis in sheep in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science* 53 (2), 355-356.

Zierler, M.K. y Galán, J.E. 1995. Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein *Inv*. *Journal of Infection and Immunity* 63, 4024-4028.

VIII.- RESUMEN

La infección por *C. pseudotuberculosis* tiene enorme trascendencia en medicina veterinaria. La difusión intraorgánica del agente causal se ve facilitada por la supervivencia en el interior de los macrófagos, actuando como un parásito intracelular facultativo. Pero de esta vida intracelular se desconocen muchos aspectos necesarios para entender la interacción parásito-hospedador.

En el presente trabajo hemos pretendido estudiar *in vitro* la interacción de cepas clínicas y de referencia de *C. pseudotuberculosis* con células no fagocíticas, analizar de forma comparada la interacción de esta bacteria con fagocitos murinos, ovinos y caprinos y el efecto bactericida del suero de cabra y oveja sobre este patógeno. Todas las cepas utilizadas fueron identificadas mediante métodos bioquímicos convencionales, así como mediante una PCR-*multiplex* para regiones específicas de los genes 16S rRNA y *PLD*.

Todas las cepas utilizadas en el presente trabajo son nitrato reductasa negativas y, por tanto, se corresponden con *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. La invasión celular de esta bacteria sobre la línea celular no fagocítica FLK-BLV-044, replicándose ligeramente hasta las 24 horas y permaneciendo viable durante al menos 6 días. Los porcentajes de adherencia varían entre el 2 y el 1,5%, aunque no se observen diferencias estadísticamente significativas. La tasa de invasión disminuye de forma estadísticamente significativa por la presencia de azúcares. La bacteria se replica ligeramente hasta las 24 horas postinfección. La tasa de proliferación intracelular se situó alrededor de 1,08.

La tasa de fagocitosis de las cepas de *C. pseudotuberculosis* sobre la línea celular macrofágica J774 se encuentra entre 50,9 y el 66,6%. Los índices de proliferación intracelular quedaron establecidos en 0,26, lo cual indica que la bacteria no se replica activamente en el interior del macrófago, pero sí se produce la persistencia de, al menos, 72 horas postinfección. Ninguna de las cepas utilizadas produjo inhibición de la producción del contenido de peroxidasa. También se observó inhibición de la explosión respiratoria de los fagocitos de oveja.

Las cuatro cepas de *C. pseudotuberculosis* fueron susceptibles al efecto bactericida del suero de cabra mientras que, paralelamente, las mismas cepas analizadas fueron resistentes al efecto bactericida del suero de oveja.

IX.- SUMMARY

Infection by *C. pseudotuberculosis* is relevant in veterinary medicine. Survival inside the macrophages provides the dissemination in the host of this pathogen, just like a facultative intracellular parasite. But before understanding the interaction parasite-host some aspects of the intracellular life need to be studied.

The aims of this work has been to study *in vitro* the interaction of clinical and reference strains of *C. pseudotuberculosis* with murine, sheep and goat phagocytes, and the bactericidal effect of goat and sheep serum against this bacteria. Strains used in this study were identified by biochemical methods, and also by PCR-*multiplex* for specific regions of 16S rRNA and *PLD* gens.

Strains used are negatives for nitrate-reductase and, therefore, belonging to *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. In intracellular survival experiments in non-phagocytic cells (FLK-BLV-044) all strains were able to grow up to 24 hours post infection and then survive up to 6 days. Percentages of adherence were between 2 and 1.5%, although significant differences were not observed. Invasion decreases with significant differences by sugars presence. Bacteria are growing till 24 hours postinfection. And the growth rate was near to 1.08.

Phagocytosis of *C. pseudotuberculosis* strains used in the macrophagic cellular line J774 was between 50.9 and 66.6%. Intracellular proliferation rates reach 0.26, which is indicating bacteria is not actively growing in the macrophages, but they persist in, at least, 72 hours postinfection. None of the strains used showed inhibition for the peroxidase content production. Inhibition of respiratory burst was also observed for sheep phagocytes.

All *C. pseudotuberculosis* strains used were susceptible to bactericidal effect of goat serum, but also were resistant to sheep serum.

X.- AGRADECIMIENTOS

Probablemente estoy en uno de los momentos más difíciles que se plantean a la hora de escribir una tesis doctoral: redactar los agradecimientos. Pero es algo que se hace con mucho gusto, ya que el trabajo se ha realizado durante una serie de años en un grupo de investigación. No es el fruto del esfuerzo de una única persona, sino de muchas otras que han influido de una forma más o menos directa. Es la hora de plasmar lo realizado. Por escrito se tenga presente a todas aquellas personas que nos ayudaron a conseguir los objetivos.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento fraterno y sincero al Dr. D. Fernando Real Valcárcel, Catedrático de Universidad y coordinador del Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su apoyo incondicional, indesmayable. Por haberme dado la oportunidad y la confianza de trabajar en su grupo de investigación y así poder saber cómo es el mundo de la investigación por dentro y que, a pesar de todos los inconvenientes que se presentaron a lo largo de estos años, supo estar ahí para hacer posible este objetivo. De todo corazón le estaré eternamente agradecido. No olvidaré nunca que desde que lo conocí por medio de correos electrónicos allá por el año 2005, nunca me supo decir no a nada, una de las personas más positivas que he conocido.

Otro referente fundamental desde el día cero hasta el final, el Dr. D. Daniel Padilla Castillo por su confianza y dedicación. Él me enseñó prácticamente todas las técnicas que he utilizado durante estos años y a pensar de una forma positiva, a pesar de que los experimentos salieran fatal. Dani muchas gracias por todo el apoyo, enseñanzas y la gratitud de haber podido compartir momentos culturales tradicionales de las Palmas de GC, los carnavales, la fiesta de la rama y muchas más, hasta las recetas de cocina.

De forma similar, quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. D^a Begoña Acosta Hernández, por su ayuda y motivación sentidos durante esta etapa.

Al Dr. D. Félix Acosta Arbelo, primera persona que tuve contacto directo en la Ciudad que me acogió durante el desarrollo del trabajo de investigación. Por su acogimiento amable y sincero, y apoyo constante cuando le solicitaba en el desarrollo del trabajo siempre con sus opiniones constructivas.

Un laboratorio es un centro en el que el personal se renueva muy rápidamente. Al entrar, tomas contacto con los experimentados, los que se marchan antes que el novato. En este caso, yo llegué a tenerles confianza y amistad. A pesar de todo, en esos tiempos de continuas dudas siempre estaban ahí para ayudar a resolverlas: Jimena, Lita, Lorena, Judit, Fátima y Valentina. Sin duda, siempre las tendré presente.

También quiero extender mi agradecimiento a otras personas que han apoyado desinteresadamente en el desarrollo de este trabajo, como la Dra. D^a Ana Sofía Ramírez. Y, sin duda a Mercedes, Orestes y a los profesores e investigadores de las Unidades de Investigación en Parasitología y Producción Animal. En fin, a todos los amigos y conocidos, que directa o indirectamente han estado ahí apoyándome, y dándome ánimo para llevar a buen término el trabajo.

Al Dr. D. Antonio Fernández, por todo su apoyo durante mi estancia en Gran Canaria.

No puedo olvidarme del Dr. D. Oscar Domínguez Falcón, ex jefe Nacional del Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA-Perú, quien depositó toda su confianza y creyó desde el principio que se lograría conseguir la finalización de este trabajo. A todos los colegas y compañeros de trabajo que apoyaron moralmente desde muy lejos y creyeron en el logro de este objetivo. Entre otros, al Ingeniero Cesar de la Cruz Lescano, Luis Olivera, Bailón, Jossep, John, y muchos otros más que en este momento no se me viene a la memoria, que me disculpen.

Finalmente, agradecer a Mi Mujer Amparo, mis hijos Kimberlin y Aaron, por el apoyo incansable, y haber podido soportar estar lejos de ellos en busca de objetivos. Al final el sacrificio valió la pena, los amo. A mi madre Delma, mi difunto padre Diclio, mi suegra Teodora y mis hermanos, Elmer, Gelberth, Wincho y Henry, que fueron pieza fundamental de apoyo moral. Creo que no soy consciente de lo afortunado que soy.

Institucionalmente, también deseo expresar mi agradecimiento a los representantes de la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID), por haberme proporcionado la beca que ha financiado los gastos de mi manutención durante mi estancia en la cálida ciudad de Las Palmas de Gran Canaria. Y, paralelamente, al Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino del Gobierno de España (proyecto JACUMAR), y a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (proyecto 2007/047), a través de los que se obtuvo el apoyo económico para realizar los trabajos experimentales de esta tesis.