

**Proteínas recombinantes PLD y CP40,  
candidatos para vacunas y diagnóstico  
contra linfadenitis caseosa**

Roberto Montes de Oca Jiménez  
María Carla Rodríguez Domínguez  
Adriana del Carmen Gutiérrez Castillo  
Martha Elba Ruiz Riva Palacio  
Mabel Gethsemani Jaimes González  
José Antonio Ibancovich Camarillo





### **Introducción**

La Linfadenitis caseosa (LAC), es una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en la industria ganadera de los pequeños rumiantes. El agente etiológico es *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovariedad *ovis*, bacteria pleomórfica, Gram positiva e intracelular facultativa. La enfermedad se caracteriza por la formación de abscesos cutáneos y viscerales, con afectaciones en la producción de carne, leche y lana, ocasionando pérdida de peso, inmunodepresión y desordenes reproductivos. La LAC también afecta a los humanos por lo que es una enfermedad de importancia zoonótica, existen vacunas comerciales disponibles fundamentalmente en los principales países productores de ovinos y caprinos; sin embargo, la efectividad de estas varía entre rebaños y no se logra una protección completa. Las proteínas PLD y CP40 constituyen factores de virulencia conservados involucrados en la patogénesis, que han sido evaluados *in vivo* como inmunógenos y como antígenos para medios diagnósticos contra la Linfadenitis caseosa. El uso de la tecnología del ADN recombinante constituye una alternativa para obtener estas proteínas de forma económica, segura y con elevado grado de pureza. El presente trabajo tiene como objetivo exponer la temática relacionada con la obtención de los antígenos PLD y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovariedad *ovis* mediante la tecnología de ADN recombinante y sus aplicaciones para el diseño de vacunas y como antígenos para el diagnóstico contra Linfadenitis Caseosa.

### **Linfadenitis caseosa**

La Linfadenitis caseosa es una enfermedad bacteriana causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* (*C. pseudotuberculosis*), cuya lesión característica es la formación de abscesos en nódulos linfáticos superficiales (manifestación cutánea) e internos, así como en órganos (manifestación visceral). En la forma cutánea los abscesos son visibles y palpables a través de la piel y su localización depende del punto de ingreso del microorganismo. Las lesiones pueden aparecer como abscesos organizados, con inflamación, encapsulación fibrosa, pérdida de pelo sobrepuesto y ruptura eventual, dando como resultado la descarga del contenido purulento. En la manifestación visceral, los abscesos se forman en los nódulos linfáticos internos, así como en órganos como: pulmones, bazo, hígado y riñones, causando pérdida de peso, inmunodepresión, daños sistémicos, con el desarrollo de un curso crónico.

La infección primaria tiene lugar en la región de ingreso de la bacteria al hospedero, con diseminación hematógena y linfática formando abscesos en los nódulos linfáticos más cercanos al sitio de entrada de la bacteria (parótidos, submandibulares, prefemorales, preescapulares, popliteos o mamarios). El ingreso del microorganismo puede ocurrir a través de lesiones en la piel generadas durante el manejo de los animales, como cortes de cola, marcaje de orejas, castración, esquila o en algunos casos lesiones



generadas durante la alimentación con forraje espinoso que daña la mucosa oral.

El periodo de incubación varía tanto en ovejas como en cabras y se han observado intervalos de días o de meses. La infección secundaria se origina con la formación de abscesos en nódulos linfáticos (torácicos, bronquiales y mediastínicos) y en órganos viscerales. La enfermedad se instaura de modo insidioso y adopta un curso crónico, cuando el contenido purulento escapa al exterior evoluciona hacia la recuperación, al contrario de lo que ocurre en las formas viscerales graves donde se causa daños sistémicos.

Es característico en ovinos que los nódulos linfáticos con abscesos tengan apariencia de «capas de cebolla» al presentar una distribución en láminas concéntricas fibrosas separadas por material caseoso. Por el contrario, en cabras los nódulos no presentan esta conformación, sino que usualmente la apariencia es de pasta uniforme seca. En el análisis histopatológico de los abscesos se puede apreciar en general un centro amorfo y eosinófilo de necrosis rodeado por una capa de linfocitos, células plasmáticas, algunas células epitelioides y polimorfonucleares neutrófilos, rodeado por una red de fibroblastos. Se destacan como características clínicas la anemia, leucocitosis con neutrofilia y altos valores de fibrinógeno, incremento de inmunoglobulinas (IgG) e Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

*C. pseudotuberculosis* ha desarrollado mecanismos de resistencia para protegerse ante la acción del sistema inmune. Las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasa (SODs) y las Catalasas, intervienen en la eliminación de algunas moléculas generadas en la cascada de reacciones iniciada por NADPH oxidasa fagocítica. También es capaz de minimizar la acción de los componentes reactivos del Nitrógeno, mecanismo del sistema inmune que actúa a través de la enzima NOS (óxido nítrico-sintetasa), la cual combina el oxígeno molecular con el nitrógeno guanidino de la L-arginina, para generar óxido nítrico (NO), que es tóxico para bacterias. Estudios *in vitro* de cepas de *C. pseudotuberculosis* mutantes del Factor Sigma, son más susceptibles a concentraciones de óxido nítrico, por lo que se propone que la presencia de este, protege ante este tipo de estrés oxidativo. Por otra parte, en esta bacteria la capa de LPS queda protegida por los ácidos corynomicólicos, lo que dificulta que el sistema inmune se active por el reconocimiento de esta estructura. Existe una correlación positiva entre el contenido de estos lípidos, el grosor de la capa lipídica y la habilidad de producir lesiones en nódulos popliteos de oveja. Los lípidos de la pared celular constituyen un factor piogénico, relacionado con la infiltración masiva de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, que transportan las bacterias a los nódulos linfáticos, y con el efecto leucotóxico que origina degeneración y lisis de macrófagos.



### Factores de Virulencia PLD y CP40

La exotoxina Fosfolipasa D es considerada el factor de virulencia principal de *C. pseudotuberculosis*, es una proteína de 31.4 kDa codificada por el gen *pld*. Las fosfolipasas son un grupo variado de enzimas capaces de hidrolizar uno o más enlaces éster en glicerofosfolípidos. La secuencia de la proteína PLD presenta similitud con la Fosfolipasa A2; sin embargo, PLD no pertenece a la familia de las Fosfolipasa y es clasificada como una Esfingomielinasa D (SMasa D; EC 3.1.4.41), también conocidas como esfingomielina fosfodieasterasas D o fosfolipasa D (PLD), que cataliza la escisión hidrolítica de la esfingomielina para producir colina y ceramida 1-fosfato o colina y ácido lisofosfatídico (LPA). Estas enzimas están presentes en diversos organismos como arañas, bacterias, garrapatas, ácaros y hongos.

PLD de *C. pseudotuberculosis* presenta un 30% de similitud con las SMDasa de *Loxosceles spp.* y funciones biológicas semejantes como la agregación plaquetaria, hiperpermeabilidad endotelial, hemólisis y necrosis cutánea dependiente de polimorfonucleares neutrófilos. La estructura de la PLD es de tipo barril TIM ( $\beta\alpha$ ), compuesta por hojas  $\beta$  y hélices- $\alpha$  intercaladas, así como una cola-SMD en el extremo C-terminal con motivo de residuos conservados ATXXDNPW.

La PLD es una exotoxina cuya actividad biológica depende de magnesio, catalizando la disociación de la esfingomielina de las membranas celulares endoteliales, lo que aumenta la permeabilidad vascular, la diseminación y persistencia de la bacteria en los fagocitos, que la transportan a nódulos linfáticos donde se desarrollan los microorganismos. Aunque su acción no se ha considerada directamente hemolítica, se ha informado que es capaz de producir hemólisis sinérgica. La secuencia de aminoácidos de la PLD se encuentra conservada entre diferentes cepas, y la modificación de esta, disminuye la capacidad de producir la enfermedad.

La proteína CP40 se ha caracterizado como antígeno con potencialidades inmuno protectoras contra la LAC. El gen presenta un marco abierto de lectura de 1,137 pb y se encuentra ubicado corriente abajo del gen *pld*. Es una proteína que se ha detectado en el sobrenadante del medio de cultivo de *C. pseudotuberculosis* mediante inmunoensayo, por lo que se caracterizó como proteína extracelular secretada por la bacteria. La actividad biológica de esta proteína fue inicialmente descrita como enzima proteasa de serinas; sin embargo, a través del análisis filogenético permitió su agrupación más cercana junto a otras enzimas endoglicosidasas y más lejos de las secuencias de proteasas de serina. La actividad enzimática desarrollada por esta proteína es de endoglicosidasa mediadoras de la hidrólisis de enlaces glicosídicos, con similitud con el dominio a-Endo E perteneciente a *Enterococcus faecalis*. El análisis de la secuencia del sitio activo en CP40, permitió establecer sus similitud con las enzimas Endo S (*Streptococcus pyogenes*) y Endo E (*Enterococcus faecalis*), solo con cambios en uno o



dos aminoácidos respectivamente.

La actividad de CP40 como factor de virulencia está dada por la capacidad de degradar la región Fc de anticuerpos IgG. La endoglicosidasa CP40 no hidroliza los glicanos en las IgG bovinas y caprinas, mientras que sí hidroliza la IgG ovina y la IgG equina. Por el contrario de la endoglicosidasa Endo S, CP40 es una enzima más pequeña y carece de un sitio de unión a dominios de carbohidratos lo que podría explicar la falta de actividad contra los glicanos IgG con GlcNAc bisectante. La comparación de los cromatogramas de las moléculas hidrolizadas, resultado de la actividad de CP40 y Endo S, indican que el sitio de escisión de glicanos por parte de CP40 es idéntico al de Endo S. En los últimos años se han desarrollado evaluaciones de esta proteína como candidato para el desarrollo de vacunas y medios diagnósticos.

La expresión y secreción de las proteínas PLD y CP40 se identificó en una infección experimental, donde mediante ensayos de inmunoblot se detectó la producción de anticuerpos dirigida en un 88% al reconocimiento de proteínas de 30-31KDa (PLD) y en un 75%-88% hacia proteínas de 38-41KDa (CP40). Por otra parte, el análisis del exoproteoma de la cepa 1002 de origen brasileño, antes y después de la reactivación de la virulencia tras 2 pases en ratones BALB/c, mostró dos perfiles proteicos diferentes. El análisis por espectrometría de masas permitió la identificación de las proteínas PLD y CP40 únicamente en la cepa cuya virulencia fue reactivada. También a través de PCR en tiempo real se identificaron *in vitro* e *in vivo* la expresión de varios genes involucrados en la virulencia entre ellos *pld* y *cp40*. Aún se continúa con el estudio de los factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, para la obtención de moléculas con potencialidades para el desarrollo de vacunas potentes y eficaces; sin embargo, estas proteínas antes mencionadas han sido de las más evaluadas y con resultados prometedores.

#### **Tecnología de ADN recombinante: Obtención de PLD y CP40 recombinantes**

La tecnología del ADN recombinante y la optimización de los bioprocesos, constituyen una fuente confiable para la obtención de proteínas heterólogas que pueden ser utilizadas con fines farmacológicos, industriales y de investigación. Las proteínas recombinantes o heterólogas se caracterizan por ser obtenidas de organismos diferentes al nativo, como resultado de la manipulación genética. Los sistemas especializados en la producción de proteínas heterólogas, permite su obtención en grandes volúmenes y con características similares a la proteína de origen natural. La purificación a partir del organismo original requeriría implementación de metodologías complejas y específicas, costosas y de riesgo biológico en caso de proceder de agentes patógenos.

El sistema de expresión está conformado principalmente por el organismo hospedero y el vector o plásmido de expresión que contiene los elementos génicos, formando ambos la maquinaria para la transcripción y traducción del gen de interés. El sistema de expresión óptimo dependerá del origen biológico y las propiedades de la





proteína de interés, las características de crecimiento del hospedero, los niveles de expresión y la localización celular de la proteína, la existencia de modificaciones post-traduccionales, la actividad biológica de la proteína, así como el costo económico de todo el bioproceso.

Los plásmido o vectores son moléculas de ADN circular que pueden ser de origen bacteriano y constan de diversas regiones especializadas como: el sitio de origen de replicación, el segmento promotor, la secuencia de unión al ribosoma, el sitio múltiple de clonaje donde se inserta el gen de interés, secuencias terminadoras de la transcripción, así como marcadores de resistencia a antibióticos que facilitan la selección de los clones recombinantes y garantizan la estabilidad del plásmido en el hospedero mediante el cultivo en un medio selectivo.

La bacteria Gram negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) es el organismo procarionta más empleado para la producción industrial de proteínas recombinantes ya que en comparación con otros sistemas ofrece ventajas como: crecimiento a expensas de fuentes de carbono económicas, rápida acumulación de biomasa, fermentaciones que alcanzan altas densidades celulares en un proceso simple y corto. Además, su larga historia como sistema modelo ha derivado un amplio conocimiento sobre su fisiología y genoma; y en consecuencia se han desarrollado muchas herramientas de ingeniería cromosómica que facilitan la clonación de genes y su expresión.

*E. coli* BL21 (DE3) es ampliamente utilizada en las producciones de gran escala ya que no presenta las proteasas Lon y Omp-t, lo que evita la degradación de la proteína recombinante en la bacteria. Esta genera bajos niveles de acetato y contiene el profago  $\lambda$ DE3 que transporta el gen de la T7 ARN polimerasa bajo control del promotor lacUV5, inducible por isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El IPTG es análogo no hidrolizable de la alolactosa, metabolito isómero de la lactosa, que dispara la transcripción del operón de expresión lac. A diferencia de la alolactosa, el átomo de azufre (S) en el IPTG crea un enlace covalente no hidrolizable por la bacteria, lo que evita que sea degradado tras su adición y se mantiene así su concentración constante en el medio.

El sistema de expresión T7 se basa en el uso de la ARN polimerasa y el promotor del bacteriófago T7. Esta ARN es menos compleja, se compone por una sola subunidad y es capaz de realizar todo el proceso de transcripción, como su homóloga en organismos superiores. Los plásmidos pET presentan el sistema T7 acoplado y se han empleado para la obtención de proteínas con una elevada expresión y rendimiento. Para expresar el gen de interés en este sistema es necesario una fuente de T7 ARN polimerasa en la célula hospedera, lo que se logra con el uso de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). La T7 ARN polimerasa no reconoce los promotores de *E. coli*, solo reconoce su promotor T7, el cual a su vez no es reconocido por las ARN polimerasas de la bacteria. Esta enzima es capaz de transcribir los genes cinco veces más rápido que la ARN polimerasa de *E. coli*. El gen



que codifica la T7 ARN polimerasa presente en la cepa BL21 (DE3) está bajo el control del promotor lacUV5, por lo que su expresión es básicamente controlada por los mismos mecanismos del operón lactosa. El promotor Lac se reprime en presencia de glucosa y se induce en presencia de lactosa o su análogo IPTG el cual es muy eficiente y ampliamente utilizados a escala de laboratorio.

La proteína recombinante se obtiene mediante un proceso que implica primeramente la inserción del gen que codifica para la proteína de interés en un vector de expresión (plásmidos, virus, cósmidos) a través de un proceso de ligazón, seguido de la transformación del organismo hospedero con la construcción génica de interés.

El gen de interés para la clonación, se adquiere mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como fuente primaria ADN genómico o ADN complementario (ADNc) del ARN mensajero de interés. Luego se corta el sitio múltiple de clonaje con enzimas de restricción para generar el sitio específico donde se va a insertar el gen de interés en el plásmido de expresión. Luego se une el gen de interés al plásmido mediante la acción de una enzima ligasa. Posteriormente, se lleva a cabo la transformación de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido recombinante, ya sea por método químico con CaCl<sub>2</sub> o mediante electroporación, estos métodos permeabilizan la membrana y favorecen la entrada del material genético a la célula. El crecimiento bacteriano se realiza en medio de cultivo caldo Luria Bertani (LB), esperando alcanzar la fase exponencial (densidad óptica del cultivo entre 0.6-0.8 a 600 nm) para realizar la inducción de la expresión de proteínas mediante la adición del IPTG. El IPTG induce la expresión de la T7 ARN polimerasa y consecuentemente la del gen de interés, ya que este inductor remueve el represor lac del operador lacO. El gen que codifica el represor lac está presente en el cromosoma bacteriano, con lo que se garantizan altas concentraciones del represor en la célula. Esto hace que en condiciones normales la enzima no se exprese o se exprese muy poco. Las proteínas expresadas por vía recombinante pueden ser dirigidas hacia el citoplasma, periplasma o medio extracelular.

La producción de la proteína recombinante, dirigida hacia el medio extracelular facilita su obtención y purificación. Sin embargo, en ocasiones la elevada concentración de proteína recombinante forma agregados insolubles en el citoplasma denominados cuerpos de inclusión. Si la proteína se encuentra soluble en el citoplasma se aplican directamente métodos cromatógrafos para su obtención. Mientras que, para la purificación de proteínas insolubles, que se encuentran formando cuerpos de inclusión, es necesario el uso de agentes caotrópicos, que tienden a desnaturalizar la proteína, siendo necesaria posteriormente la implementación de técnicas de re-naturalización. Para la purificación de proteínas se pueden utilizar marcadores de afinidad, como una cola de poli-histidina (6 residuos) que facilita la obtención de la proteína por medio de cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC). Estos métodos permiten la



obtención de la proteína recombinante en grandes concentraciones y con un elevado grado de pureza.

La proteína PLD ha sido obtenida por vía recombinante utilizando *E. coli* como sistema de expresión. El clonaje por primera vez del gen que codifica para esta proteína se realizó en el vector pUC12 en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  y mediante ensayos de Southern blot fue identificada la secuencia del gen insertado en el plásmido. Luego en otro trabajo para la obtención de PLD inactivada mediante mutagénesis sitio específica, se utilizó el sistema *E. coli* DH5 $\alpha$  y el plásmido pTZ18U, seguido de la identificación de la expresión mediante electroforesis en SDS-PAGE y Western blot. Otros investigadores han empleado el plásmido pAE para la expresión de PLD en células *E. coli* BL21 (DE3). La expresión de la proteína recombinante es analizada por SDS-PAGE al 12% teñido con azul Coomassie y Western blot con anticuerpo monoclonal anti-6x His y la purificación se ha realizado por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos.

Por otra parte, la proteína CP40 se obtuvo por vía recombinante con el plásmido pBE12GEX2 utilizando *E. coli* XL1-Blue. En este estudio la proteína se expresó en un 15% de las proteínas totales y fue obtenida del sobrenadante del cultivo. También se empleó el plásmido pAE y la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión con 1mM de IPTG. En este estudio se empleó un sistema de purificación de cromatografía de afinidad, utilizando la columna HisTrap<sup>TM</sup> HP (GE Healthcare, USA). La expresión de la proteína se confirma mediante Western blot usando anticuerpo monoclonal anti-histidina conjugado con peroxidasa (Sigma, USA). La purificación se realiza por cromatografía de afinidad en una columna de níquel sepharose HisTrap<sup>TM</sup> (GE). La pureza se realiza mediante SDS-PAGE al 12%, y la concentración se determina con un kit BCA (PIERCE). Las proteínas obtenidas por vía recombinantes pueden ser empleadas en vacunas y medios diagnósticos. Brindan una alternativa viable y fácil de escalar, con bajos costos de producción, así como permiten la elaboración de vacunas inocuas, a partir de antígenos específicos y altamente puros.

#### **Aplicaciones de las proteínas PLD y CP40 recombinantes en vacunas y medios diagnósticos**

Las formulaciones vacunales basadas en subunidades presentan una mezcla de antígenos de diferente naturaleza como: lipopolisacáridos, extractos ribosómicos, proteínas recombinantes purificadas o péptidos sintéticos. Este tipo de vacunas utiliza moléculas completas o segmentos involucrados en la virulencia, sin necesidad de utilizar el microorganismo patógeno completo, evitándose el riesgo de reproducción de la enfermedad. Este tipo de vacunas permite su producción a grandes escalas sin necesidad de utilizar el agente patógeno, como es *C. pseudotuberculosis* biovariedad *ovis*, bacteria que puede infectar a los humanos, constituyendo un riesgo zoonótico. Las





vacunas de subunidades son poco inmunogénicas por lo que requieren del empleo de adyuvantes, moléculas que potencian la respuesta del sistema inmune.

En los últimos años se han evaluado diferentes tipos de vacunas experimentales contra la LAC (Cuadro.1) y entre ellas destacan por sus resultados favorables las vacunas de subunidades proteicas recombinantes.

La fosfolipasa D obtenida mediante el método recombinante se ha utilizado en números estudios para el desarrollo de vacunas de subunidades. Se ha evaluado la capacidad inmunogénica de una vacuna formulada con 50 µg de PLD recombinante (PLDr), obtenida en *E. coli* como sistema de expresión, así como su combinación con  $1.25 \times 10^{10}$  células/mL de cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* inactivados con formalina. En este experimento se compararon los resultados con la vacuna comercial Glanvac 3 (Commonwealth Serum Laboratories (CSL) Ltd., Victoria, Australia). La vía de inmunización fue subcutánea, separada por un intervalo de 4 semanas entre la primera y segunda dosis de inmunización. El desafío se llevó a cabo con  $10^4$  UFC/mL de una cepa de *C. pseudotuberculosis ovis* virulenta luego de 2 semanas de concluido el esquema de vacunación. Los títulos más altos de anticuerpos se alcanzaron en los grupos vacunados con la proteína PLDr y la vacuna PLDr + células totales inactivadas, en comparación con los grupos inmunizados solamente con células totales inactivadas y Glanvac 3. En todos los grupos experimentales inmunizados con la proteína PLDr se alcanzaron los valores máximos de IgG anti-PLD antes de la segunda dosis de vacunación. No se presentaron signos de la enfermedad en los animales desafiados y vacunados con PLDr y la vacuna PLDr + células totales inactivadas, incluyendo la no formación de abscesos en el sitio de inoculación. Los resultados evidencian el potencial de la PLD obtenida por vía recombinante para el desarrollo de inmunidad protectora, con una respuesta humoral rápida y elevada, en comparación con la vacuna Glanvac 3.

El análisis de la combinación de la proteína PLDr junto a cultivos totales de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* y *equi*, inactivados con formalina en un modelo ovino; las formulaciones se realizaron con 50µg de PLDr y 20mg de células inactivadas ya sea biovar *ovis* para vacuna 1 y biovar *equi* para vacuna 2. El esquema de vacunación incluyó una re-inmunización a las 3 semanas y el desafío con  $2 \times 10^6$  UFC/mL de una cepa biovar *ovis* virulenta aislada de animales locales. La respuesta humoral se evaluó mediante inmunoensayo de tipo ELISA, evidenciando un aumento de IgG en los animales vacunados luego de la segunda dosis de refuerzo, mientras que tras el desafío se produjo una ligera disminución en la DO, aunque los niveles se mantuvieron elevados por encima del valor de corte durante 20 semanas. No se produjeron abscesos en nódulos linfáticos externos o internos, en comparación con el grupo control no vacunado donde el 80% de los animales sí presentaron manifestaciones de la enfermedad. Las dos formulaciones evaluadas protegieron a los ovinos ante el desafío con una cepa virulenta. Es relevante destacar en este trabajo que por primera vez se inmunizan ovejas con una cepa biovar



equi en combinación con PLD obtenida por vía recombinante.

**Cuadro 1.** Vacunas experimentales contra la Linfadenitis caseosa.

Vacunas	Adyuvante	Cepa desafío	Concentración	Vía	Hospedero
Toxina PLD	Hidróxido de aluminio	cepa virulenta	$10^8$ UFC/mL	subcutáneo	ovejas
Extracto CP40	-	cepa virulenta	$2 \times 10^6$ UFC/mL	subcutáneo	ovejas
Cepa Toxminus	-	cepa virulenta	$10^6$ UFC/mL	subcutáneo	ovejas
Cepa mutante gen AroQ/ gen pld	-	C231	$10^6$ UFC/mL	subcutáneo	ovejas
Cultivos totales inactivados/PLD modificada	Hidróxido de aluminio	cepa Virulenta	$10^8$ UFC/mL	subcutáneo	ovejas
Cultivos totales/PLDr	Hidróxido de aluminio	cepa Virulenta	$10^4$ UFC/mL	subcutáneo	ovejas
Pared celular y toxina PLD	Muramíl dipéptido	cepa alpaca	$10^6$ UFC/mL	Intradérmica	Alpacas
Extractos antigénicos	AIF/oligodesoxi	VD57	$10^5$ UFC/mL	Intradérmica	cabras
Cepa atenuada CZ171053	-	MIC-6	$10^6$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
CP40 recombinante y la cepa CP09 atenuada	Saponina	MIC-6	$10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
CP40 recombinante	Saponina	C57	$10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
PLD recombinante/ célula completa	-	cepa Virulenta	$2 \times 10^6$ UFC/mL	Intradérmica	ovejas
plasmid pAE- cp09720/esterasa recombinante	Hidróxido de aluminio	MIC-6	$2 \times 10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
rCP09720 (esterasa), rCP01850 (proteína L14 ) y PLDr	-	MIC-6	$10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
PLD toxina/Cultivos totales	-	cepa virulenta	$4 \times 10^6$ UFC/mL	Intradérmica	ovejas
PLD recombinante	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	MIC-6	$2 \times 10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
CP40 recombinante	Saponina/ACFreund	VD57	$10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones C57Black/6
Proteínas rNanH, rPknG	Saponina	MIC-6	$10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
Vacuna de ADN( pCP01850)/ pCP01850r	Hidróxido de aluminio	MIC-6	$10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
<i>E. coli</i> plasmido pAE- PLD/PLDr	Saponina	MIC-6	$10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c
Proteínas rCP00660, rCP09720, rCP01850	Saponina	MIC-6	$10^4$ UFC/mL	Intraperitoneal	Ratones BALB/c



Otras proteínas factores de virulencia (rCP09720, esterasa) o rCP01850, proteína L14 de unión a la subunidad 50S del ARN) se han empleado en combinación con PLDr en la formulación de vacunas de subunidades, evaluadas en el modelo murino. Se evaluó la tasa de supervivencia después del desafío, siendo de un 30% (rPLD), 40% (rPLD + rCP09720) y 50% (rPLD + rCP01850). La combinación de rCP01850 con rPLD mostró mejores resultados, para una protección del 50% de los animales desafiados y aumento significativo de IgG2.

Al emplear una cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus-Calmette- Gueri) para producir la PLD recombinante en el plásmido pUS2000. El sistema no permitió una expresión elevada de la proteína PLD, pero si fue efectivo como vacuna evaluada en un modelo murino. La inmunización de ratones BALB/c con  $10^6$  UFC de *M. bovis* pUS2000/PLD para la expresión de PLD, así como con *M. bovis* pUS2000/PLD+ 50 $\mu$ g de PLDr purificada y la cepa *M. bovis* sin modificar, indujo una producción de anticuerpos elevada en comparación con el control negativo (100 $\mu$ L de NaCl 0.9%), pero sin diferencias significativas entre los grupos vacunados. Esto se debe a que la cepa *M. bovis* por si sola es capaz de inducir una respuesta inmune humoral y celular elevada. La respuesta inmune celular se evaluó midiendo los niveles de producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo de los animales vacunados, tras ser estimuladas con 8  $\mu$ g/mL de PLDr. Los niveles de IFN- $\gamma$  detectados para el grupo *M. bovis* no modificada fueron de 365 pg/mL, mientras que en el cultivo de las células de animales vacunados *M. bovis* pUS2000/PLD fueron de 420pg/mL y de 498pg/mL en las células del grupo que recibió una reactivación de la vacunación con 50 $\mu$ g de PLDr purificada. Para el caso de la IL-10 las células del grupo control produjeron 252 pg/mL, las del grupo vacunado con *M. bovis* pUS2000/PLD 1317pg/mL y en el cultivo de las células del grupo vacunado con *M. bovis* pUS2000/PLD+ PLDr fue de 590pg/mL. El nivel de protección conferida por estas formulaciones fue del 88% en los animales vacunados con *M. bovis* pUS2000/PLD+ 50 $\mu$ g de PLDr, de un 77% para el grupo *M. bovis* pUS2000/PLD y del 66% para el grupo *M. bovis* no modificado. La respuesta inmune protectora generada por esta vacuna de células enteras de *M. bovis* BCG modificada para expresar PLD, podría originar la activación de varias poblaciones de células T, debido a la variedad de antígenos (lípidos, proteínas y carbohidratos) de la formulación. Luego la re-inmunización con 50 $\mu$ g de la PLD obtenida vía recombinante estimula el aumento en la proliferación de células T específicas para este antígeno en particular.

Las vacunas de subunidades también se han desarrollado utilizando la proteína CP40 obtenida por vía recombinante. Esta molécula se identificó en el sobrenadante de cultivo de *C. pseudotuberculosis* biovariedad *ovis*, siendo co-purificada junto con la toxina PLD durante la preparación de vacunas inactivadas. La preparación de las vacunas de PLD a partir de sobrenadantes de cultivo de *C. pseudotuberculosis* habitualmente contienen otros antígenos bacterianos indefinidos que podrían estar contribuyendo con



la respuesta inmune protectora. La proteína CP40 se detectó a través de ensayos de inmunoblot, en sueros de animales vacunados con Glanvac, por lo que se concluyó que de forma aleatoria esta proteína podría estar presente en formulaciones de la vacuna comercial Glanvac.

La inmunización de ovinos con 100 µg de CP40 obtenida vía recombinante confirió protección al 82% de los animales, con reducción de la formación de abscesos en pulmones. No se encontró relación entre la disminución en el desarrollo de lesiones pulmonares y el título de anticuerpos, por lo que se asumió que la respuesta celular fue la responsable de la protección ante la infección. En este caso los anticuerpos anti-CP40 podrían estar involucrados en la protección a través de mecanismos indirectos, como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. El suero de los animales vacunados se analizó mediante inmunoblot, mostrando una fuerte respuesta de anticuerpos específica, restringida a la proteína de 40 kDa.

La evaluación comparativa de 4 vacunas, que utilizaron como antígenos la proteína CP40 recombinante y la cepa CP09 atenuada. Las formulaciones se evaluaron combinando los antígenos y de forma individual, para determinar su capacidad inmunoprotectora ante el desafío con  $10^4$  UFC de la cepa virulenta MIC-6 en un modelo murino. La cepa viva atenuada de *C. pseudotuberculosis* CP09 en una concentración de  $10^6$  UFC no indujo respuesta inmune humoral en los animales vacunados, ni desafiados. Los grupos experimentales vacunados con CP40r y la cepa atenuada CP09 + CP40r, así como el grupo con una dosis de CP40r seguido de una re-inmunización con la cepa CP09, presentaron un aumento significativo en los niveles de IgG a los 30 días post-inmunización. Estas diferencias significativas se mantuvieron luego del desafío, excepto para el grupo inmunizado con CP40r donde no se observó un aumento ni diferencias significativas en los niveles de IgG1 a los 45 o 60 días. Tras el desafío, estos grupos mostraron un aumento significativo en los niveles de IgG2, siendo el máximo alcanzado por los animales inmunizados con CP40r. El isotipo IgG2 se asocia con una respuesta celular de Th1, células involucradas principalmente en la inmunidad contra patógenos intracelulares, activación de macrófagos y células T citotóxicas, producción de opsonización y activación del complemento. La formulación a base de CP40r protegió al 90% de los animales ante el desafío con la cepa virulenta, seguido del grupo vacunado con la cepa atenuada CP09 + CP40r con un 70%, mientras que la vacunación con CP40r seguido de la inmunización con CP09 solo protegió al 60% y la cepa CP09 solo al 50%. Estos resultados indican que las formulaciones con la proteína CP40 recombinante fueron más eficientes en la protección asociada a una respuesta celular Th1, en ausencia de un perfil Th2 después del desafío.

Se ha evaluado el efecto del uso de diferentes adyuvantes (saponina o adyuvante completo de Freud, ACF) junto con CP40 recombinante en un modelo murino. Los





animales inmunizados con CP40r / saponina mostraron valores elevados en los niveles completos de anticuerpos anti-CP40r IgG y de las subclases IgG2a, IgG2b e IgG3, con diferencia estadísticamente significativas con respecto al grupo control al día 60 después de la inmunización. El grupo vacunado con CP40r / ACF mostró una diferencia significativa en los niveles completos de IgG, IgG2a e IgG2b en el día 30 después de la inmunización. La producción de anticuerpos IgG2b fue significativamente diferente a partir del día 30, con producción estable junto a IgG3 en el día 60 después de la inmunización. Después del desafío hubo un aumento en el título de anticuerpos en el grupo vacunado con CP40r / saponina al día 30, así como en el grupo vacunado con CP40r / ACF, no mostrando diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Ambas vacunas confirieron protección en el 100% de los animales desafiados, a diferencia del grupo control negativo. Los resultados sugieren una tendencia hacia una respuesta de Th1, mientras que los isotipos asociados a respuestas de tipo Th2, como IgG1 e IgG3, no se detectaron o reaccionaron menos a la proteína recombinante. La proteína CP40 recombinante fue capaz de generar una respuesta inmune humoral y celular. También se ha evaluado el potencial de una proteína quimérica, conformada por la fusión de la proteína de unión a maltosa (MBP) como adyuvante intrínseco, PLD y CP40, como un nuevo inmunógeno contra LAC. Se determinó *in silico* la antigenicidad, el potencial alergénico, la predicción de epitopos B, la unión a receptores MHC y el acoplamiento al receptor Toll-Like 2. Se evaluó su efecto en ratones BALB/c (G1 – control, G2 – Saponina, G3 – MBP:PLD:CP40 y G4 – rPLD + rCP40). Se cuantificaron los niveles de IgG totales, las IgG1 y las IgG2a; así como también se determinó la producción de citoquinas después de la estimulación *in vitro* de los esplenocitos. Los ratones fueron desafiados 42 días después de la primera inmunización con una cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. El análisis *in silico* mostró que MBP:PLD:CP40 tiene potencial inmunogénico, no tiene propiedades alérgicas y puede acoplarse al receptor TLR2. La proteína quimérica MBP:PLD:CP40 estimuló la producción de anticuerpos IgG1 en una proporción cinco veces mayor que IgG2a, y TNF e IL-17 se expresaron significativamente en respuesta a los estímulos antigénicos. Cuando se usaron rPLD y rCP40 juntos para la inmunización, pudieron inducir IFN- $\gamma$  e IL-12, pero sin producción de anticuerpos detectable. Los grupos G3 y G4 presentaron una supervivencia del 57.14% y 42.86%, respectivamente, mientras que los ratones G1 y G2 no sobrevivieron 15 días después del desafío. MBP:PLD:CP40 protegió parcialmente a los ratones contra la infección por *C. pseudotuberculosis* y puede considerarse un nuevo inmunógeno contra LAC.

En otro trabajo se estudió la capacidad de las proteínas recombinantes SpaC, NanH, SodC, y PLD para desencadenar respuestas inmunes protectoras humorales y celulares contra la infección por *C. pseudotuberculosis* inducida experimentalmente en ovejas. Los antígenos fueron producidos en un sistema heterólogo y se purificaron mediante cromatografía de afinidad. El experimento incluyó tres grupos, que fueron



inmunizados de la siguiente manera: Grupo 1 (control): una mezcla de adyuvantes compuesto por la cepa T1 inactivada y Montanide™ISA 61 VG (T1M); Grupo 2: rSpaC, rSodC, rPLD y T1M; Grupo 3: rNanH, rSodC, rPLD y T1M. Todos los grupos fueron inmunizados dos veces (días 0 y 30) y desafiados el día 90 del experimento. Las respuestas inmunes humorales y celulares se evaluaron mediante ELISA para la detección de anticuerpos IgG y el interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). Ambas formulaciones de vacunas con proteínas recombinantes (grupos 2 y 3) indujeron una respuesta inmune humoral IgG significativa. Las proteínas rSodC, rPLD y rNanH fueron más inmunogénicas, induciendo niveles significativos de anticuerpos IgG después de la primera dosis de la vacuna o después del desafío, manteniendo niveles constantes hasta el final del experimento. Sin embargo, no fue posible diferenciar entre la respuesta celular inducida por las vacunas.

Ambas moléculas también se han utilizado para el desarrollo de medios diagnósticos de tipo ELISA. Las proteínas recombinantes PLD, CP40, PknG, DtxR y Grx se utilizaron como antígenos para el desarrollo de inmunoensayo de tipo ELISA, para el diagnóstico de 130 muestras de suero de cabra (65 positivas y 65 negativas de área no endémica) y 160 de ovejas (78 positivas y 82 negativas de área no endémica). Los mejores resultados para el diagnóstico con sueros de cabras se obtuvieron con la combinación de PLD y CP40 como antígenos en una proporción 1:1, para un 96.9% de sensibilidad y 98.4% de especificidad. Por otra parte, para el diagnóstico a partir de sueros de ovinos el ELISA más efectivo utilizó PLD como antígeno y presentó una sensibilidad del 91% y 98.7% de especificidad.

Otros investigadores evaluaron la PLDr individualmente o combinada con las proteínas rCP01850 o rCP09720 para la detección mediante ELISA de LAC en ovejas. Se analizaron un total de 40 muestras de suero positivos y 25 negativos utilizando proteínas recombinantes. Los ELISA utilizando PrLD (E1), rPLD+rCP01850 (E2) y rPLD+rCP09720 (E3) mostraron 90, 92,5 y 97,5 % de sensibilidad y 92, 72 y 92 % de especificidad, respectivamente. El área bajo las curvas características operativas del receptor para E1, E2 y E3 fue 0,925, 0,882 y 0,990, respectivamente. El ELISA utilizando rPLD +rCP09720 demostró la mejor sensibilidad y especificidad. Por tanto, la combinación de estas proteínas recombinantes en ELISA indirecto tiene potencial para el diagnóstico de LAC en ovejas.

Por otra parte, nuevos antígenos de *C. pseudotuberculosis* se han detectado mediante estudios *in silico* utilizando herramientas bioinformáticas. Entre los que se pueden destacar la proteína ribonucleasa y la subunidad de transporte de ascorbato (PTS), las cuales fueron seleccionadas para su expresión heteróloga en *E. coli* utilizando el plásmido de expresión pAE. En este trabajo en paralelo se expresó CP40 y los nuevos antígenos, todos se utilizaron para la detección de anticuerpos mediante ELISA a partir



de 49 sueros positivos y 26 sueros negativos. Las proteínas solas mostraron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96.2%, 92.3% y 88.5% para PTSr, Ribonucleasa y CP40r, respectivamente. Cuando se combinaron las proteínas, mostraron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 84.6%, 92.3%, 88.5% y 92.3% para PTSr/CP40r, Ribonucleasa/CP40r, PTSr/Ribonucleasa y PTSr/Ribonucleasa/CP40r, respectivamente. Los resultados de este estudio muestran una excelente correlación de sensibilidad y especificidad con todas las proteínas.

#### **Linfadenitis caseosa: Vacunas en México**

Varios estudios demuestran la presencia del patógeno afectando las producciones de pequeños ruminantes en territorio mexicano. En el estado de Jalisco, se reporta una frecuencia de LAC de un 33.3% (57 muestras positivas) de un total de 160 muestras analizadas. Los aislamientos positivos se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas y la detección de los genes *16S ARNr*, *rpoB*, *pld*, *fag A*, *fag B*, *fag C*, *fag D* y *hsp60*. Además, se portan la secuencia de seis genomas completos de cepas de origen mexicano del biovar *ovis* y biovar *equi*, lo que constituye un precedente para el estudio de los principales factores de virulencia que determinan la patogenicidad de la enfermedad. También se ha estudiado la secuencia completa de los genes *pld* y *cp40*, utilizando como material genético el ADN total de un aislado (2J-L) de *C. pseudotuberculosis* obtenido de una oveja del Estado de Jalisco. El análisis de las secuencias reveló 99% de similitud con relación a otros genes *pld* y *cp40* reportados en las bases de datos. El estudio filogenético basado en la secuencia de ambos genes indicó que el aislamiento 2J-L se agrupo cercano a las cepas mexicanas MEX29 y MEX25.

*C. pseudotuberculosis ovis* se identificó mediante PCR Cuádruplex en 30 de 59 muestras de abscesos cutáneos de ovejas del Estado de Jalisco. Por otra parte en la misma región se identificó *C. pseudotuberculosis* en 19 muestras de abscesos de corderos, siendo un primer reporte de esta enfermedad afectando en México a animales jóvenes. Debido a la presencia de este agente patógeno en el territorio mexicano es prioritario el desarrollo de investigaciones para su control y futura erradicación. Las vacunas comerciales aún no están disponibles en México, por ello existe la necesidad de trabajar en el desarrollo de una vacuna, a partir de aislados autóctonos, que permita una protección completa y eficaz.

En este sentido se evaluó el efecto inmunoprotector de una cepa de *C. pseudotuberculosis* atenuada, mutante del gen *aroA*. La supervivencia intracelular de la cepa mutante *aroA* y la cepa de tipo salvaje de *C. pseudotuberculosis* se evaluó en la línea celular de macrófagos murino J774A.1 utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 1:1 con los siguientes tiempos de infección: 30 min, y 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h. La mayor diferencia en la supervivencia intracelular del mutante se observó 30 minutos después de la infección. La vacuna se aplicó en ratones BALB/c vía subcutánea, siendo



la progresión de la lesión producida en el sitio de inoculación al día 14, más grave en aquellos animales que fueron vacunados con la cepa salvaje. Un análisis de la virulencia residual en el modelo murino no reveló bacteria en ratones vacunados con la cepa atenuada al día 28 después de la vacunación. Los ratones vacunados con el mutante mostraron una protección del 50% frente al desafío intraperitoneal, superando al grupo control (41,67%). Por primera vez se evaluó en México una cepa de *C. pseudotuberculosis* atenuada como vacuna, así como también el estudio contribuyó al conocimiento de la respuesta inmune frente a *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

En otro estudio se evaluó el efecto de una vacuna de cultivos totales inactivados en un modelo ovino. Se inmunizó vía subcutánea con la bacterina elaborada con 2 aislados obtenidos del estado de Jalisco. En la necropsia sólo se encontraron lesiones en pulmón y nódulo linfoide en 3 de los 4 animales del grupo desafiado; de estas lesiones se reaisló la bacteria *C. pseudotuberculosis* y se identificó mediante PCR Múltiple. Con relación a la prueba de ELISA se presentaron incremento de absorbancias el día de la revacunación; sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos. Los animales vacunados y desafiados no presentaron lesiones aunque no incrementaron de manera significativa los anticuerpos en comparación con los animales del grupo desafiado, por lo cual se recomienda seguir con los estudios de dicha bacterina para poder determinar la respuesta inmune que está generando.

Otro grupo de investigadores, evaluaron una vacuna de tipo bacterina-toxoide, elaborada a partir de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislada en México, de origen ovino. Las regiones incluidas en el estudio para la evaluación del formulado vacunal fueron Veracruz, Puebla y Yucatán. Se incluyeron 8 unidades de producción ovina donde 600 animales fueron inmunizados. En estas granjas se había reportado la enfermedad previamente con un 6% de animales afectados. Los resultados mostraron una diferencia en el título de anticuerpos entre los animales vacunados y no vacunados, e incrementaron esta diferencia entre grupos al ser expuestos a la bacteria causante de la LAC, por vía subcutánea y vía aerógena. Se desarrollaron pequeñas lesiones, en el sitio donde se inoculó la bacteria de desafío y la incidencia (número de casos nuevos después de la vacunación fue del 1.5% en un lapso de dos años de iniciado el programa de vacunación. Los resultados indican que la vacuna desarrollada es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en los ovinos, pero al ser una vacuna convencional aun presenta desventajas, como la formación de abscesos no deseados. Es por ello que se continúa investigando para el desarrollo de un formulado vacunal que permita un control eficaz, siendo las vacunas de subunidades recombinantes una opción alentadora para el control de la LAC.





### Conclusiones

Hasta la fecha los resultados más alentadores para el desarrollo de nuevas vacunas y medios diagnósticos contra LAC se han obtenido con formulaciones que utilizan como antígeno la exotoxina PLD o la endoglicosidasa CP40. El empleo de la tecnología del ADN recombinante constituyen una alternativa eficiente para la obtención de estos antígenos en sistemas heterólogos. Cabe destacar que se ha demostrado tanto *in silico*, *in vitro*, así como *in vivo* el potencial de estas moléculas para activar la respuesta inmune humoral y celular, por lo que se consideran antígenos principales para el desarrollo de nuevas vacunas y medios diagnósticos.

### Referencias

- Angius, F., Ilioaia, O., Amrani, A., Suisse, A., Rosset, L., Legrand, A., Abou-Hamdan, A., Uzan, M., Zito, F., Miroux, B. (2018). A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins. *Scien Reports*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26668-y>.
- Antunez-Núñez, L. D. (2023). Caracterización molecular de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis de ovejas y cabras del estado de Jalisco [Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional UAEMex. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/138900>.
- Barral, T.D., Mariutti, R.B., Arni, R.K., Santos, A.J., Loureiro, D., Sokolonski, A.R., Azevedo, V., Borsuk, S., Meyer, R., Portela, R.D. (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microb Biotechnol*, 12(6), 1313-1323. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13454>.
- Barral, T.D., Kalil, M.A., Mariutti, R.B., Arni, R.K., Gismene, C., Sousa, F.S., Collares, T., Seixas, F.K., Borsuk, S., Estrela-Lima, A., Azevedo, V., Meyer, R., Portela, R.W. (2022). Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 106(24), 8035-805. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12279-1>.
- Bastos, B.L., Dias, P.R.W., Dorella, F.A., Ribeiro, D., y Seyffert, N. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunologic*, 4,1-15. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.S4-005>.
- De Pinho, R.B., de Oliveira-Silva, M.T., Brilhante-Bezerra, F.S., Borsuk, S. (2021). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105, 2287–2296. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11191-4>.



- Droppa-Almeida, D., Vivas, W.L., Silva, K.K., Rezende, A.F., y Simionatto, S. (2016). Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine*, 34(8), 1091–1096. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.064>.
- Droppa-Almeida, D., Ferreira, C.S., Brito, I., Borsuk, S., Rodríguez, J.A.L., Lima-Verde, I.B., Padilha, F.F. (2021). In Silico Screening of Putative *Corynebacterium pseudotuberculosis* Antigens and Serological Diagnosis for Caseous Lymphadenitis in Sheep by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Vet Med Int*, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2021/9931731>.
- Faeza, N.M.N., Jesse, F.F.A., Hambali, I.U., Odhah, M.N., Umer, M., Wessam, M.M.S., Mohd-Azmi, M. L., Wahid, A. H. (2019). Responses of testosterone hormone concentration, semen quality, and its related pro-inflammatory cytokines in bucks following *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its mycolic acid infection. *Trop Anim Health Prod*, 51(7), 1855-1866. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01878-2>.
- Flores-Pérez, G. (2023). Aislamiento e identificación molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis obtenidos de lesiones abscedativas superficiales en corderos del estado de Jalisco, México [Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional UAEMex. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/138896>.
- Fontaine, M.C., Baird, G., Connor, K.M., Rudge, K., Sales, J., y Donachie, W. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24, 5986–5996. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.005>.
- García, P.C. (2017). Evaluación de un inmunógeno para el control de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos [Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional UAEMex. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/68375>.
- González, A., y Fillat, M. F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Educ Bioq*, 37(1), 14-27. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2018/reb181c.pdf>.
- Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A. A., Jiménez-Gutiérrez, L. R., Sotelo-Mundo, R. R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Revista CBS*, 15(3), 8-17. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.152>.
- Hodgson, A. L. M., Bird, P., Nisbett, I. T. (1990). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol*, 172, 1256–1261. <https://doi.org/10.1128/jb.172.3.1256-1261.1990>.



- Ibarra-Zazueta, C., Arellano-Reynoso, B., Hernández-Castro, R., Palomares-Reséndiz, E. G., Díaz-Aparicio, E. (2016). Evaluation of the *aroA* mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in cellular and murine models. *Veterinaria México OA*, 3(4). <https://doi.org/10.21753/vmoa.3.4.366>
- Silva-Leal, K., de Oliveira-Silva, M. T., Silva-Rezende, A. F., Brilhante-Bezerra, F. S., Begnini, K., Seixas, F., Collares, T., Dellagostin, O., Wagner-Portela, R., Ariston de Carvalho-Azevedo, V. & Borsuk, S. (2018). Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine*, 36(25), 3578–3583. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.049>.
- Li, Z., Nimitz, M., Rinas, U. (2014). The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-45>.
- Murgía-Olmedo, M. L., y Morales- Álvarez, J. F. (2017). Control y prevención de la Linfadenitis caseosa en ovinos. Folleto para productores Núm. 7. Mérida, Yucatán, México. ISBN: 978-607-37-0825-8. [https://vun.inifap.gob.mx/VUN\\_MEDIA/BibliotecaWeb/\\_media/\\_folletoproductores/4158\\_4863\\_Control\\_y\\_prevenci%c3%b3n\\_de\\_la\\_linfadenitis\\_caseosa\\_en\\_ovinos.pdf](https://vun.inifap.gob.mx/VUN_MEDIA/BibliotecaWeb/_media/_folletoproductores/4158_4863_Control_y_prevenci%c3%b3n_de_la_linfadenitis_caseosa_en_ovinos.pdf).
- Odhah, M.N., Jesse, F.F.A., Lawan, A., Idris, U.H., Marza, A.D., Mahmood, Z.K., Yusuf, A., Arsalan, M., Wahid, A.H. Mohd-Azmi, M.L., Zamri-Saad, M. (2018). Responses of haptoglobin and serum amyloid A in goats inoculated intradermally with *C. pseudotuberculosis* and mycolic acid extract immunogen. *Microb Pathog*, 117, 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.038>.
- Odhah, M.N., Jesse, F.F.A., Teik, C.E.L., Chung, E. L. T., Mahmood, Z., Wahid- Haron, A., H.A., Mohd, L.M.A., Zamri-Saad, M. (2019). Clinico-pathological responses and PCR detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. *Microb Pathog*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103628>.
- Ortiz, G.A. (2016). Producción de una bacterina para Linfadenitis caseosa y la evaluación de su composición a través de electroforesis [Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional UAEMex. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/66324>.
- Parise, D., Parise, M., Viana, M.V.C., Muñoz, B.A.V., Cortés-Pérez, Y.A., Azevedo, V., y otros (2018). First genome sequencing and comparative analyses of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains from Mexico. *Stand in Genomic Sci*, 13(21). <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0325-z>.



- Rodríguez-Domínguez, M.C.; Montes de Oca Jiménez, R., Barbabosa-Pliego, A., Díaz - Aparicio, E., Varela-Guerrero, J. A., Tenorio-Borroto, E. (2022). Aislamiento, Clonaje y análisis filogenético de pld y cp40, factores de virulencia de un aislado mexicano de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*. *Trop Subtrop Agroecosystems*, 25, 1-12. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.3768>.
- Silva, J.W., Droppa-Almeida, D., Borsuk, S., Azevedo, V., Portela, R.W.I. (2014). *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against Caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res*, 10, 965. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0304-6>.
- Silva, M.T.O., Bezerra, F.S.B., de Pinho, R.B., Begnini, K.R., Seixas, F.K., Collares, T., Portela, R. D., Azevedo, V., Dellagostin, O., Borsuk, S. (2018). Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. *Vaccine*, 36(1), 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.029>.
- Silva, M.T.O., Bezerra, F.S.B., de Pinho, R.B., de Santana- Ferreira, C., Vivas, W.L., Portela, R.W.D., Azevedo, V.A.C., Borsuk, S. (2019). The combination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rPLD, rCP01850 and rCP09720 for improved detection of caseous lymphadenitis in sheep by ELISA. *J Med Microbiol*, 68(12), 1759-1765. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001096>.
- Studier, W.F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., y Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Gene Express Technol*, 185, 60-89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85008-c.60-89](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85008-c.60-89).
- Studier, W.F. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Express Purific*, 41(1), 207-234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.
- Varela, G.J.A., Montes de Oca, J.R., Acosta, J.D., Hernández, F.L., Morales, E.V., Monroy, S.G.H. (2018). First report of isolation and molecular characterization of the pathogenic *Corynebacterium pseudotuberculosis* from of sheep and goats in Mexico. *Microb Pathog*, 117, 304-309 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.031>.
- Walker, J., Jackson, H.J., Wilson, M.J., Eggleton, D.G., Meeusen, E. N. T., Brandon, M.R. (1994). Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect Immunol*, 62(6), 2562-2567. <https://doi.org/10.1128/iai.62.6.2562-2567.1994>.





---

Windsor, P.A. y Bush, R.D. (2016). Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? *Small Rumin Res*, 142, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.03.023>.