



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Estudio epidemiológico de la Linfadenitis Caseosa en
pequeños rumiantes en la región de Alto Alentejo
(Portugal) y valoración de técnicas moleculares y
serológicas para el diagnóstico de la enfermedad**

TESIS DOCTORAL
Lina Luis Salgueiro Costa

Doctorado en Biociencias y ciencias agroalimentarias

Mayo 2021

TITULO: *ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LINFADENITIS CASEOSA EN PEQUEÑOS RUMIANTES EN LA REGIÓN DE ALTO ALENTEJO (PORTUGAL) Y VALORACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD*

AUTOR: *Lina Luís Salgueiro Costa*

© Edita: UCOPress. 2021
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Biociencias y ciencias agroalimentarias

Estudio epidemiológico de la Linfadenitis Caseosa en pequeños rumiantes en la región de Alto Alentejo (Portugal) y valoración de técnicas moleculares y serológicas para el diagnóstico de la enfermedad

Epidemiological study on Caseous Lymphadenitis in small ruminants in the Alto Alentejo region (Portugal) and evaluation of molecular and serological techniques in the diagnosis of the disease

Autora: Lina Luis Salgueiro Costa

Directores: Dr. Alfonso Maldonado García y Dra. Belén Huerta Lorenzo

Mayo 2021



TÍTULO DE LA TESIS:

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LINFADENITIS CASEOSA EN PEQUEÑOS RUMIANTES EN LA REGIÓN DE ALTO ALENTEJO (PORTUGAL) Y VALORACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

DOCTORANDO/A: LINA LUIS SALGUEIRO COSTA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis presentada por la doctoranda Dña. Lina Luis Costa Salgueiro, titulada en Medicina Veterinaria por la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Lisboa (Portugal), se ha realizado dentro de la línea de investigación “Diagnóstico y control de enfermedades” del departamento de Sanidad Animal. Este trabajo de tesis doctoral es el primer estudio de seroprevalencia de Linfadenitis Caseosa (LC) realizado en la principal región ganadera de Portugal en el cual se planteó una validación de una prueba ELISA comercial para la detección de animales portadores asintomáticos, a fin de aplicarla al estudio epidemiológico de la LC en la región del Alto Alentejo (Portugal) y, a largo plazo, en los programas nacionales de control y erradicación de la enfermedad. El proyecto de investigación planteado supuso la toma de muestras y colección de información para el estudio epidemiológico en explotaciones de pequeños rumiantes portuguesas y un matadero regional, bien como el aprendizaje y realización de técnicas de diagnóstico molecular y serológico con trabajo de laboratorio intenso.

Los resultados obtenidos, de notable calidad científica e importancia epidemiológica, han sido aceptados para su divulgación en congresos de ámbito internacional (World Buiatrics Congress - Madrid), y publicados en la revista científica Veterinary Medicine and Science, indexada en Journal of Citation Reports (JCR) dentro del tercer cuartil. Asimismo, otro de los artículos derivados de la tesis se encuentra publicado en la revista Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry (Revista referenciada en el NCBI DBs). Los resultados hallados confirman la importancia sanitaria de la Linfadenitis caseosa en los pequeños rumiantes en Portugal, así como la utilidad de la técnica ELISA en la detección de casos subclínicos y como prueba de cribado en programas de lucha. Consideramos que este trabajo reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 14 de mayo de 2021

Firma del/de los director/es

Firmado por MALDONADO GARCIA
ALFONSO RAFAEL - 30415870A el

Fdo.: Alfonso Maldonado García

HUERTA
LORENZO MARIA
BELEN -
52756051P

Firmado digitalmente por
HUERTA LORENZO MARIA
BELEN - 52756051P
Fecha: 2021.05.14 12:33:38
+02'00'

Fdo.: Belén Huerta Lorenzo

'Healing is a matter of time, but it is sometimes also a matter of opportunity.'

(Hippocrates)

Abstract

Caseous lymphadenitis (CL) or pseudotuberculosis is a pyogenic disease, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, affecting mainly small ruminants, although it has also been described in deer, cows, horses, pigs, and humans. Despite its worldwide distribution and its economic impact on sheep and goat production, its real prevalence and distribution are underestimated in countries where CL it is not considered a notifiable disease. The present work is the first seroprevalence study in CL carried out in Alto Alentejo, the main livestock region of Portugal, with the aim of (1) assessing the validity and usefulness of various serological and molecular diagnostic techniques, (2) conducting a cross-sectional survey of the seroprevalence of *C. pseudotuberculosis* in small ruminants, (3) conducting a preliminary study of the risk factors associated with seropositivity and (4) describing the clinical cases found. To meet this aim, serum samples were taken from 756 animals in 82 farms, as well as abscess and pus samples from 58 animals with skin and visceral pyogranulomatous lesions. Prior to the study and to improve the sensitivity of multiplex PCR for the identification of *C. pseudotuberculosis* from purulent samples, the validity of this test was determined after including a dilution (1:10) of the DNA samples. The results obtained showed no improvement in their diagnostic validity, so we consider that the dilution should only be applied in highly purulent lesions that are negative to the classical protocol. The comparison of the direct ELISA test (ELITEST CLA # CK105A[®]) with the multiplex PCR (reference test) showed a diagnostic sensitivity and specificity of 100% and 76.1%, respectively, with a Probability Ratio of 4.78 for positive results and greater than 100 for negative ones. On this basis, the ELISA would offer 100% certainty in discarding CL, regardless of the pre-test probability, but the credibility of positive results would only be $\geq 80\%$ when the real prevalence in the group was $\geq 46\%$.

The epidemiological study of *C. pseudotuberculosis* infection reflected a seroprevalence at the farm level (dispersion) of 75.4% (95% CI [66.4% -84.5%]), with 16.7% of affected small ruminants (95% CI [14.1% -19.4%]), finding significantly greater susceptibility in the caprine species (PR 4.0 95% CI [3.31-4.84]), in dairy animals (PR 2.91 95% CI [2.49 -3.42]) and in those raised in a non-extensive production regime (PR 4.19 95% CI [3.67-4.79]) and / or in medium and large farms. Finally, the pathological study confirmed the importance of the visceral form of the disease, especially in sheep species.

The results found in this thesis confirm an actual problem and point out the importance of CL in small ruminants in Portugal, as also the usefulness of the direct ELISA technique in the detection of subclinical cases and as a screening test in disease control programs.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; caseous lymphadenitis; sheep; goats; PCR; ELISA; seroprevalence; risk factors; Portugal.

Resumen

La Linfadenitis caseosa (LC) o pseudotuberculosis es una enfermedad piógena, causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que afecta principalmente a pequeños rumiantes, si bien también se ha descrito en ciervos, vacas, caballos, cerdos y humanos. A pesar de su distribución mundial y su impacto económico en la producción ovina y caprina, su prevalencia real y distribución están subestimadas en aquellos países donde no se considera una enfermedad de declaración obligatoria. El presente trabajo es el primer estudio de seroprevalencia de LC realizado en el Alto Alentejo, principal región ganadera de Portugal, con el objetivo de (1) evaluar la validez y utilidad de diversas técnicas de diagnóstico serológico y molecular, (2) realizar una encuesta transversal de la seroprevalencia de *C. pseudotuberculosis* en los pequeños rumiantes, (3) realizar un estudio preliminar de los factores de riesgo asociados a la seropositividad y (4) describir los casos clínicos encontrados. Para ello, se tomaron muestras de suero a 756 animales procedentes de 82 explotaciones, así como muestras de abscesos y pus a 58 animales con lesiones piogranulomatosas cutáneas y viscerales. A fin de mejorar la sensibilidad de la PCR múltiple para la identificación de *C. pseudotuberculosis* a partir de muestras purulentas, previamente al estudio se determinó la validez de esta prueba tras incluir una dilución (1:10) de las muestras de ADN. Los resultados obtenidos no mostraron ninguna mejora en su validez diagnóstica, por lo que consideramos que la dilución sólo debería aplicarse en lesiones muy purulentas que resulten negativas al protocolo clásico. Por su parte, la comparación del test ELISA directo (ELITEST CLA # CK105A[®]) con la PCR múltiple (prueba de referencia) mostró una sensibilidad y especificidad diagnósticas del 100% y el 76,1%, respectivamente, con una Razón de Probabilidad de 4,78 para los resultados positivos y superior a 100 para los negativos. En base ello, el ELISA ofrecería una certeza del 100% al descartar la LC, independientemente de la probabilidad pre-prueba, pero la credibilidad de los resultados positivos sólo sería $\geq 80\%$ cuando la prevalencia real en el colectivo fuese $\geq 46\%$.

El estudio epidemiológico de la infección por *C. pseudotuberculosis* reflejó una seroprevalencia a nivel de granja (dispersión) del 75,4% (IC95% [66,4%-84,5%]), con un 16,7% de la cabaña ovina y caprina afectada (IC95% [14,1%-19,4%]), encontrando una susceptibilidad significativamente mayor en la especie caprina (RP 4,0 IC95% [3,31-4,84]), en los animales de aptitud lechera (RP 2,91 IC95% [2,49-3,42]) y en aquellos criados en régimen de producción no extensivo (RP 4,19 IC95% [3,67-4,79]) y/o en granjas de mediano y gran tamaño. Finalmente, el estudio patológico confirmó la importancia de la forma visceral, especialmente en la especie ovina.

Los resultados hallados en esta Tesis confirman la importancia sanitaria de la Linfadenitis caseosa en los pequeños rumiantes en Portugal, así como la utilidad de la técnica ELISA directa en la detección de casos subclínicos y como prueba de cribado en programas de lucha.

Palabras clave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; linfadenitis caseosa; ovino; caprino; PCR; ELISA; seroprevalencia; factores de riesgo; Portugal.

Aos Anjos e Estrelinhas no Céu que com Jesus, me guiam todos os dias,

Aos meus Queridos Filhos Benjamim, Rafael e Alice, razão do meu ser e do meu viver,

Ao meu Amor Hélio, luz dos meus olhos e sol dos meus dias,

*Aos meus Queridos Pais Ana e João, em vós reside a minha essência, a minha admiração
e gratidão eternas,*

Ao meu Querido Irmão Fernando, companheiro de coração e de toda a vida,

Aos meus Queridos cunhados(as) e Queridos sobrinhos(as), o orgulho da tia Lina,

*E aos meus Queridos sogros e amigos Ana Maria & Albino Correia, para mim a Benção
e o Amor de uma segunda família,*

A todos vós,

De coração, dedico esta tese.

Lista de siglas y términos específicos

<i>Sigla</i>	<i>Significado</i>
Bp	Pares de bases
DGADR	<i>Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Regional</i>
DGAV	<i>Direção Geral de Alimentação e Veterinária</i>
DIV	<i>Divisão de Intervenção veterinária</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DOP	<i>Denominação de Origem Protegida</i>
DSMZ	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)</i>
DT	<i>Diphtheria toxin</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
Fw	<i>Forward</i>
IG	<i>Indicação Geográfica</i>
IGP	<i>Indicação Geográfica Protegida</i>
INE	<i>Instituto Nacional de Estatística</i>
INIAV	<i>Instituto Nacional de Investigação Alimentar e de Veterinária</i>
LC	Linfadenitis caseosa
Ng	Nanogramos
nM	Nanomolares (concentración de primers)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
mPCR	<i>Multiplex PCR</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
OSD	<i>Oedematous skin disease</i>
Rv	<i>Reverse</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAE buffer	Tampón Tris – Acetato – EDTA
Tm	Temperatura de emparejamiento
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

ÍNDICE

Abstract	i
Resumen	ii
Lista de siglas y términos específicos	iv
Índice	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	ix
CAPÍTULO I: Introducción y justificación	1
CAPÍTULO II: Revisión bibliográfica	7
2.1. Sector ovino y caprino en España y Portugal	7
2.2. Etiología	14
2.3. Epidemiología	17
2.4. Importancia zoonótica	26
2.5. Importancia económica	28
2.6. Patogenia	30
2.7. Patología	34
2.8. Diagnóstico diferencial	43
2.9. Diagnóstico laboratorial	44
2.10. Tratamiento y prevención	47
CAPÍTULO III: Objetivos	53
CAPÍTULO IV: Material y métodos general	55
4.1. Caracterización de la región de estudio	55
4.2. Plan de muestreo	56
4.3. Cuestionario	58
4.4. Prueba de ELISA	58
4.5. Prueba PCR	61
CAPÍTULO V: Valoración de técnicas moleculares y serológicas para el diagnóstico de la Linfadenitis caseosa	67
5.1. Valoración de la especificidad y la sensibilidad analíticas de la PCR optimizada para la identificación de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	68
5.2. Validez y utilidad diagnóstica de la PCR múltiple optimizada y del ELISA comercial <i>ELITEST CLA#CK105A</i>[®] en la detección de la infección por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	71
5.3. Discusión.....	76

CAPÍTULO VI: Estudio epidemiológico de la Linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes en la región de Alto Alentejo, Portugal	79
6.1. Estudio de seroprevalencia	80
6.2. Descripción de los casos positivos detectados mediante PCR	84
6.3. Discusión	87
CONCLUSIONES	91
AGRADECIMIENTOS	93
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	I
ANEXO 1: Cuestionario	II
ANEXO 2: Resultados de la encuesta de seroprevalencia	III
ANEXO 3: Costa L, Huerta B, Galán-Relaño Á, Gómez-Gascón L, Almeida A, Viegas I, Maldonado A. (2020) Utility assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks. Vet Med Sci. 2020; 00:1–8. https://doi.org/10.1002/vms3.297.....	XXIV
ANEXO 4: Costa L, Maldonado A, Huerta B, Almeida A. (2019) Optimization of a Conventional PCR Assay for the Identification <i>Corynebacterium Pseudotuberculosis</i> from Pyogenic Lesions. J Vet Sci Ani Husb 7(2): 201. ISSN: 2348-9790.....	XXV
ANEXO 5: Lina Costa; Alfonso Maldonado; Belén Huerta. (2019) Estudio Descriptivo sobre la Pseudotuberculosis en Pequeños Rumiantes en la Región del Alto Alentejo (Portugal) y Determinación de la Utilidad de la Técnica de Diagnóstico ELISA (ELITEST CLA # CK105A®). Presentación de Poster en el VII Congreso científico de investigadores en formación de la Universidad de Córdoba.....	XXVI
Anexo 6: Lina Costa (2016). LINFADENITE CASEOSA NO ALTO ALENTEJO, PORTUGAL – Estudo preliminar de prevalência da doença em rebanhos de pequenos ruminantes afetados e Otimização da prova de PCR Clássico no diagnóstico e identificação de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>. PUBLICAÇÃO ZOETIS – SAÚDE ANIMAL – PORTUGAL. http://hdl.handle.net/10400.26/18564.....	XXVII

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número (%) de pulmones decomisados debido a afecciones pulmonares en bovinos, ovinos y caprinos (Adaptado de Mellau et al., 2010).....	5
Tabla 2: Evolución del número total de explotaciones de pequeños rumiantes y del número total de animales de las especies ovino y caprino en Portugal (Adaptado de PISA.net, 2020).....	12
Tabla 3: “Manual of Systematic Bacteriology” (Adaptado de Bergey, 1923).....	16
Tabla 4: Cuadro resumen de los datos de prevalencia de la linfadenitis caseosa (LC) en Europa y en el mundo (adaptado de Costa, 2016).....	19
Tabla 5: Análisis de pan-genoma de 15 cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (Soares et al., 2013).....	39
Tabla 6: Muestreo para la detección de infección en las explotaciones seleccionadas...	57
Tabla 7: Relación de muestras analizadas.....	57
Tabla 8: Categorización / Información cuestionario.....	58
Tabla 9: Procedimiento de la prueba.....	60
Tabla 10: Resultados positivos obtenidos en la PCR convencional y PCR optimizada para cada uno de los segmentos de ADN estudiados.....	72
Tabla 11: Comparación de los resultados obtenidos con la PCR optimizada y la PCR convencional.....	74
Tabla 12: Tabla de contingencia de los resultados de validación del ELISA comercial..	75
Tabla 13: Resultados de seroprevalencia por tipo de explotación.....	81
Tabla 14: Análisis comparativo del tamaño de las explotaciones negativas y positivas al ELISA.....	81
Tabla 15: Resultados de seroprevalencia obtenidos en los animales analizados.....	82

Tabla 16: Distribución de las muestras positivas a *C. pseudotuberculosis* según la localización de la lesión y la especie animal afectada.....85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfica representativa del número de explotaciones de ovejas con diagnóstico de LC en Reino Unido. Adaptado de “Veterinary Diagnosis Analysis (VIDA): diagnosis of caseous lymphadenitis in UK sheep flocks” (Sargison, 2008).....	4
Figura 2: Gráfica representativa de la producción de ovinos y caprinos (en número total de animales) en los principales países productores de pequeños rumiantes de la Unión Europea (FAOStat, 2018).....	8
Figura 3: Gráfica representativa de la reducción de la producción de carne de ovino (en toneladas) en los últimos 10 años de registro existente, en Portugal y España (FAOStat, 2013).....	9
Figura 4: Gráfica representativa del total de cabras en 2014 en las principales regiones agrícolas de Portugal (Estadística PORTUGAL, 2014).....	9
Figura 5: Gráfica representativa del número total de ovinos en 2014 en las principales regiones agrícolas de Portugal (Estadística PORTUGAL, 2014).....	10
Figura 6: Gráfica representativa de la producción de leche de cabra en 5 regiones agrícolas de Portugal, entre 2010 y 2014 (Estadística PORTUGAL, 2014).....	10
Figura 7: Gráfica representativa de la producción de leche de oveja en 5 regiones agrícolas de Portugal, entre 2010 y 2014 (Estadística PORTUGAL, 2014).....	11
Figura 8: Gráfica representativa de la evolución del número total de ovinos y caprinos en los últimos años, en Portugal (FAOStat, 2018).....	12
Figura 9: Descarga de pus caseosa en la región cervical en un paciente humano (Jiao et al., 2012).....	27
Figura 10: Imagen histopatológica del pulmón con infección por <i>C. pseudotuberculosis</i> . (Odhah et al., 2019).....	32
Figura 11: Pulmón con infección por <i>C. pseudotuberculosis</i> (Odhah et al., 2019).....	32

Figura 12: Pulmón con infección por <i>C. pseudotuberculosis</i> (ácido micólico) (Odhah et al., 2019).....	33
Figura 13: Vista microscópica del nódulo linfático preescapular infectado con <i>C. pseudotuberculosis</i> . (Zavoshti et al., 2012).....	33
Figura 14: Absceso superficial localizado en el nódulo linfático mandibular (Costa, 2016).....	34
Figura 15: Absceso en el nódulo linfático parotídeo por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> . (Malone et al., 2006).....	35
Figura 16: Microabscesos pulmonares y neumonía exudativa / purulenta en caprino por <i>C. pseudotuberculosis</i> (Costa, 2016).....	36
Figura 17: Abscesos en pulmones ovinos por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (Malone et al., 2006).....	36
Figura 18: Linfadenitis mediastínica purulenta (a) y cadena ganglionar mediastínica afectada (b) (Velasco y Fernández, 2007).....	37
Figura 19: Lesiones <i>post-mortem</i> de un ovino infectado con <i>C. pseudotuberculosis</i> (Costa, 2016).....	37
Figura 20: Imagen (de necropsia) recogida en un brote de mamitis por <i>C. pseudotuberculosis</i> (Costa, 2016).....	38
Figura 21: (a) e (b) Forma clínica caquetizante (visceral) (Costa, 2016).....	38
Figura 22: “Ganglio en forma de cebolla” (a) e (b) (Velasco y Fernández, 2007).....	40
Figura 23: Nódulo linfático preescapular de una oveja infectada por <i>C. pseudotuberculosis</i> . (Velasco y Fernández, 2007).....	41
Figura 24: Abscesos de órganos de gamuza infectados con <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> . (Domenis et al., 2018).....	43
Figura 25: Mapa de la subregión del Alto Alentejo, Portugal. (Mapa adaptado de http://pt.wikipedia.org y http://www.portalegredigital.biz/pt).....	56

Figura 26: Reactivos del ELITEST CLA # CK105A®	59
Figura 27: Lectura de las placas ELISA.....	59
Figura 28: Pruebas de PCR realizadas con cada una de las muestras de ADN.....	62
Figura 29: Imagen de electroforesis para evaluar la especificidad analítica de la prueba de PCR modificada para <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	70
Figura 30: Imagen de electroforesis para evaluar la sensibilidad analítica de la PCR para <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	70
Figura 31: Resultados de PCR.....	73
Figura 32: Resultados de PCR.	73
Figura 33: Gráfica de los valores Predictivos Positivos del ELITEST obtenidos en base a los resultados de S y E y la prevalencia real de la zona (probabilidad pre-prueba).....	75
Figura 34: Gráfica representativa de la seroprevalencia real de LC en los animales analizada con respecto a las variables especie, aptitud, producción y tamaño de explotación.....	83
Figura 35: Absceso subcutáneo en el nódulo linfático submandibular (forma adenítica superficial) de LC en caprino.....	85
Figura 36: Piogranulomas de LC en pulmón (forma adenítica visceral) de ovino.....	85
Figura 37: Forma diseminada (caquetizante) de LC en ovino.....	86
Figura 38: Frecuencia de presentación de las formas clínicas y localización de las lesiones positivas a <i>C. pseudotuberculosis</i>	86

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (también denominado *C. ovis*) es la causa de Linfadenitis Caseosa (LC), un proceso infeccioso muy contagioso de curso crónico y caquetizante que afecta principalmente a ovejas y cabras. La bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* además de afectar a pequeños rumiantes, también se encontró en infecciones ocasionales en ganado vacuno, caballos, rumiantes salvajes, búfalos, cerdos y hombre (Clark et al., 1972; Stauber et al., 1973; Shpigel et al., 1993; Bartolomé et al., 1995; Peel et al., 1997; Join-Lambert et al., 2006; Baird y Fontaine, 2007; Paton, 2010; Rocha, 2011; Torres et al., 2013; Colom-Cadena et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Guedes et al., 2015; Heggelund et al., 2015; Matos et al., 2015; Spier y Azevedo, 2016). Se caracteriza por la formación de abscesos en uno o más nódulos linfáticos (Paton, 2010; Aquino de Sá et al., 2013). Menos frecuentemente, puede resultar en neumonía, hepatitis, mastitis, artritis, orquitis, abortos, nacimientos prematuros, infertilidad y mortalidad perinatal en estas especies (Paton, 2010; Mendonça, 2012; Latif et al., 2015; Costa; 2016; Latif et al., 2016; Mahmood et al., 2016).

Con el tiempo esta enfermedad ha recibido diferentes nombres, “pseudotuberculosis”, “apostema de los ovinos” y “enfermedad de Preisz-Nocard” pero el nombre científico preferido es Linfadenitis caseosa (Cabi.org , 2019). La LC fue descrita por primera vez en el año **1888** por el veterinario francés Edmond Isidore Etienne Nocard, quien recuperó la bacteria de un caso de linfangitis bovina (Belchior et al., 2006), un poco más tarde en Hungría por Preisz y Guinard con aislamiento del *Corynebacterium* en una lesión renal en ovinos (1891) y por Nocard nuevamente y 5 años más tarde en equinos (1896) (Hosseinzadeh et al., 1996; Baird y Fontaine, 2007). A partir de 1896 lo bacteriólogo húngaro Preisz y el veterinario francés Nocard hicieron un cuidadoso estudio sobre el bacilo, razón por la cual por años se denominó “bacilo de Preisz-Nocard” (Belchior et al., 2006; Baird y Fontaine, 2007). Presumiblemente la enfermedad se ha difundido globalmente por ovejas exportadas por los colonos del siglo XVIII (Baird y Fontaine, 2007) y desde su reconocimiento, ha sido notificada en Australia, Nueva Zelanda, África del Sur, Oriente Medio, América del Norte y América del Sur, y la mayoría de los países del norte y sur de Europa (Dercksen et al., 2000; Fontaine y Baird, 2008; O’Reilly et al.,

2008; Windsor, 2011; Zavoshti et al., 2012). En Portugal la enfermedad se describió por primera vez en 1968 por el Profesor Jacinto Ferreira y el mismo autor refiere el tratamiento quirúrgico de la Linfadenitis en caballos, en 1957 (Ferreira, 1968).

Se considera una de las enfermedades de las ovejas y cabras más importantes, en términos económicos, en Estados Unidos, Canadá, Brasil y Australia, países donde la enfermedad es endémica y presenta altas tasas de prevalencia (Çetinkaya et al., 2002; Paton et al., 2003; Pavan et al., 2012; Debien et al., 2013; Windsor, 2011; Windsor, 2014; Latif et al., 2016; Mahmood et al., 2016; de Farias et al., 2019). Las pérdidas económicas provocadas por la LC derivan del aumento de las horas de trabajo en la inspección de canales afectadas, en la limpieza y desinfección de material y equipamiento infectado (material empleado para esquila, identificación animal, ...), de la elevada tasa de decomisos de órganos, piezas y canales completas en matadero, la muerte de los animales afectados por la forma sistémica, la disminución de la producción de leche y lana, la infertilidad y disminución del rendimiento reproductivo resultante del "Síndrome de la oveja flaca" (Stanford et al., 1998; Çetinkaya et al., 2002; Baird y Fontaine, 2007; Al-Gaabary et al., 2010; Chikhaoui y Khoudja, 2013; Latif et al., 2016; Mahmood et al., 2016). Las pérdidas son particularmente graves en las fincas de ovejas, y especialmente evidentes en pequeños productores (Aquino de Sá et al., 2013). La LC se considera actualmente como una enfermedad "iceberg" (Gascoigne et al., 2020), o sea, se caracteriza por un inicio insidioso y lento con efectos a largo plazo limitando el rendimiento productivo en una proporción elevada de animales, los cuales suelen exhibir sintomatología a cualquier momento de la infección.

En Europa, hasta hace unos años, existía muy poco interés en la LC, si bien, en los últimos años se ha observado una preocupación creciente por parte de varios países debido al impacto económico que supone esta enfermedad en la industria ganadera de los pequeños rumiantes (Windsor, 2011; Smith, 2015). Aunque la enfermedad ha sido reportada en países anteriormente libres de la LC, probablemente debido a la importación de animales infectados, son muchas las regiones de Europa, como Portugal, en las que se desconoce la prevalencia, factores de riesgo e importancia económica de la Linfadenitis caseosa.

La situación sanitaria de los rebaños de pequeños rumiantes en Portugal ha mejorado a lo largo de los años, con respecto a enfermedades animales sujetas a acciones oficiales de control o erradicación. Sin embargo, los esfuerzos de control de enfermedades no

sometidas a declaración obligatoria, como la LC, son pequeños y se limitan a los realizados por organizaciones ganaderas y criadores de razas puras y autóctonas.

En base a ello, en este trabajo de tesis doctoral se planteó una validación de una prueba ELISA comercial para la detección de animales portadores asintomáticos, a fin de aplicarla al estudio epidemiológico de la LC en la región del Alto Alentejo (Portugal) y, a largo plazo, en los programas nacionales de control y erradicación.

La actual prevalencia de Linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes esta subestimada, por el hecho de que no se trata de una enfermedad de notificación oficial en muchos países, como Portugal y España, y también porque los propietarios de las fincas no están informados de su impacto económico, no recurriendo a apoyo veterinario en los casos de los abscesos superficiales. Sin embargo, se trata de una enfermedad con importantes implicaciones no sólo económicas, sino también sanitarias.

- Sanitaria: se trata de una zoonosis que afecta a personas con mucho contacto con pequeños rumiantes (profesional u ocupacional), en las cuales la infección se hace a través de heridas abiertas e inhalación de polvo contaminado (esquiladores, matarifes, veterinarios, investigadores, etc.). También puede producirse el contagio por la ingestión de leche, situación más frecuente en países en desarrollo y donde no exista un control sanitario de los productos de origen animal. La infección en el hombre es rara, dando normalmente lugar a una linfadenitis con un curso largo y recurrente, con la posibilidad de convertirse en una enfermedad grave que requiera hospitalización, terapia antibiótica prolongada e incluso cirugía.

- Económica: siendo una enfermedad crónica e insidiosa con posibilidad de presencia de animales asintomáticos, la estimativa de sus daños económicos no es fácil de realizar. Este daño económico deriva principalmente de los siguientes puntos:

- Por ser una enfermedad de difícil diagnóstico es comúnmente un hallazgo de matadero, lo que obliga al decomiso de las canales, o de necropsia, determinando restricciones en el comercio de esas canales.
- Es responsable por un acortamiento de la vida útil de los animales enfermos y disminución de los índices productivos, provocando también un retraso en la edad de alcanzar la madurez sexual y manifestaciones de mortalidad perinatal con abortos esporádicos.

- La ineficacia del tratamiento antibiótico se debe a las características de la lesión y la dificultad para llegar al interior del absceso, lo que obliga al sacrificio de los animales enfermos.
- Al no existir procedimientos adecuados de inmunización, el comercio de animales en vida se ve limitado: el intercambio comercial puede encontrarse restringido tanto en el ámbito internacional como dentro de un mismo país.
- La LC puede originar pérdidas económicas graves en criadores de ovejas de raza seleccionada y con pedigree, aumentando la posibilidad de diseminación de la enfermedad entre los colectivos comerciales de reproductores, conduciendo a un decomiso de corderos en matadero aún más grande.

La verdadera prevalencia de la infección en ovejas en los países europeos no se ha estimado, parcialmente debido a la no existencia de una prueba de diagnóstico fiable para la detección de la infección en animales vivos. Pero hay datos de algunos países en que se verifica el aumento del número de casos en las anteriores décadas (Fig. 1).

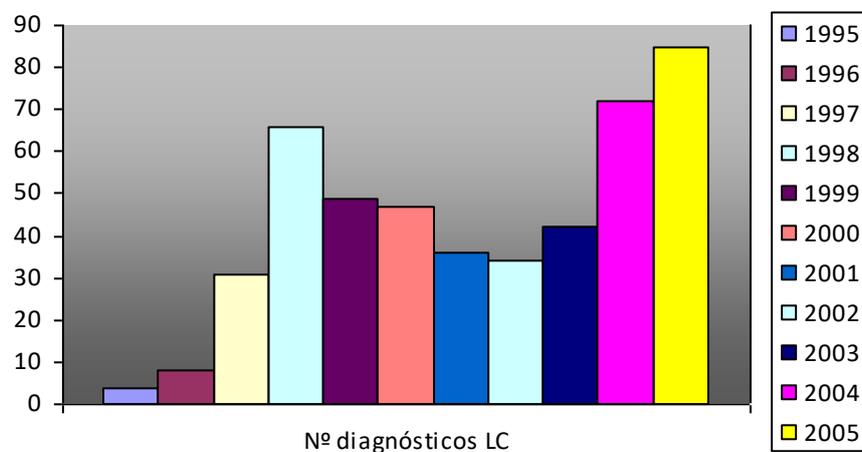


Figura 1: Gráfica representativa del número de explotaciones de ovejas con diagnóstico de LC en Reino Unido. Adaptado de “Veterinary Diagnosis Analysis (VIDA): diagnosis of caseous lymphadenitis in UK sheep flocks” (Sargison, 2008).

Muchos estudios confirman la importancia sanitaria y económica de esta enfermedad. En una encuesta a gran escala realizada en matadero, en Tanzania (Mellau et al., 2010), con el objetivo de determinar la prevalencia de enfermedades que afectan al pulmón conduciendo al decomiso de órganos y canales, se registró una prevalencia de abscesos

pulmonares muy elevada, principalmente en ovinos y caprinos (Tabla 1). Siendo la LC una de las principales causas de abscesos pulmonares en estas 2 especies, se puede concluir que existe una pérdida económica sobre la producción de pequeños rumiantes y que es importante desarrollar programas de control y erradicación, con el objetivo de disminuir su prevalencia.

Tabla 1: Número (%) de pulmones decomisados debido a afecciones pulmonares en bovinos, ovinos y caprinos (Adaptado de Mellau et al., 2010).

	Número (%) de pulmones decomisados		
	Bovinos (<i>n</i> =15.245)	Ovinos (<i>n</i> =4768)	Caprinos (<i>n</i> =3192)
Abscesos	1249 (8,2)	681 (14,3)	512 (16,0)

En los últimos 20 años ha habido un aumento de la inversión de las autoridades oficiales de los países desarrollados en programas de control y erradicación de la enfermedad, especialmente en países donde la producción de ganado ovino y caprino es importante para la economía del país. Estos programas deben basarse en el conocimiento de la prevalencia y los factores asociados a la aparición de la enfermedad, la aplicación de métodos de diagnóstico rápidos y fiables, y la implementación de medidas de lucha eficaces (Thrusfield y Christley, 2018).

La investigación desarrollada en este trabajo de Tesis aportará, por primera vez, información amplia y relevante sobre la epidemiología y el diagnóstico de la infección por *C. pseudotuberculosis* en el ganado ovino y caprino de Portugal.

CAPÍTULO II.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sector ovino y caprino en España y Portugal

La industria de los pequeños rumiantes ya sea en el sector cárnico o lácteo, es muy importante en muchos países, y en países en desarrollo suele ser la parte que más contribuye a la economía agraria nacional. En estos países la especie caprina ha sido descrita como la vaca del pobre (*Poor man's cow*), debido a su inmensa contribución a la economía de los pueblos más desfavorecidos. Las ovejas y las cabras, por ejemplo, constituyen la base principal de la producción de carne en la India (Pal y Chakravarty, 2020).

En el contexto europeo, y a pesar de que el desarrollo de los países permite a la población utilizar otros productos, la explotación de pequeños rumiantes sigue siendo de enorme importancia, especialmente en las zonas más rurales, propias de los países de la península Ibérica.

El sector ovino y caprino representa en España el 12% de la Producción Final Ganadera, si se tiene en cuenta el conjunto del subsector cárnico y el lácteo. Con un censo ovino que en los últimos cinco años se encuentra estabilizado alrededor de los 16 millones de cabezas, España es el segundo país en importancia de la Unión Europea (UE), tras el Reino Unido (desde enero de 2020 ya no pertenece a la UE) (Fig. 2). Igualmente, y tras el censo de Grecia, España es el segundo país comunitario en censo de ganado caprino con unos 2.5 millones de animales (Estadística ESPAÑA, 2016). Debido al carácter extensivo de una parte importante del sector y a que es una actividad que se asocia a aquellas zonas donde no existen otras alternativas económicas, este sector tiene un papel primordial en la vertebración del territorio, en la conservación del entorno y en la generación de empleo en zonas rurales. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la capacidad de éste para adaptarse a los nuevos condicionantes de los mercados, aumentando el comercio con países terceros, así como promocionando y valorizando la calidad de los productos obtenidos en España (www.mapa.gob.es).

Portugal continental tiene un total de 2 millones de ovejas y 380 mil cabras, mientras que en las islas el número de ovejas es de 3 mil en Madeira y 4 mil en las Azores (Estadística Portugal, 2014). Las cifras del 2018 de la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) sitúan a Portugal entre los 10 países con mayor producción de pequeños rumiantes de la Unión Europea (considerando el Reino Unido) (Fig. 2).

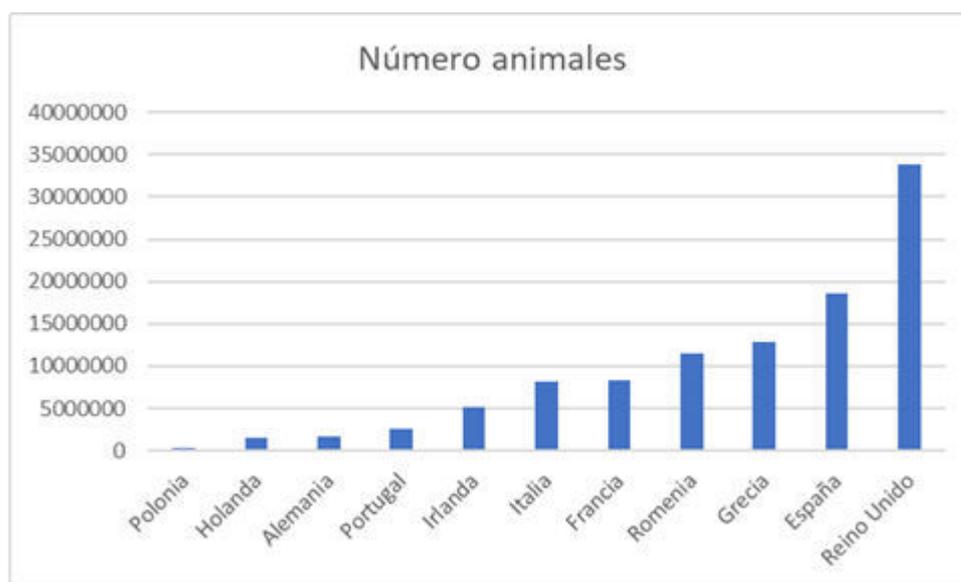


Figura 2: Gráfica representativa de la producción de ovinos y caprinos (en número total de animales) en los principales países productores de pequeños rumiantes de la Unión Europea (FAOStat, 2018).

Cabe señalar que en 2013 la producción total (toneladas de carne) fue mucho menor que en años anteriores, cuando Portugal produjo el doble. Estos registros también muestran una reducción global de la producción de carne de ovino en los últimos 10 años de registro existente, concretamente en Portugal y España (Fig. 3) (FAOStat, 2013).

El Alentejo es la región del país con el mayor número de cabras y ovejas, con un total de aproximadamente 97.000 cabras y más de 1 millón de ovejas (la mitad de la población ovina nacional y una cuarta parte de la población caprina nacional se encuentra en el Alentejo) (Fig. 4 y 5, respectivamente). En esta región de Portugal, el 80% de las ovejas son de aptitud cárnica y el 20% de aptitud láctica (Estadística PORTUGAL, 2014).

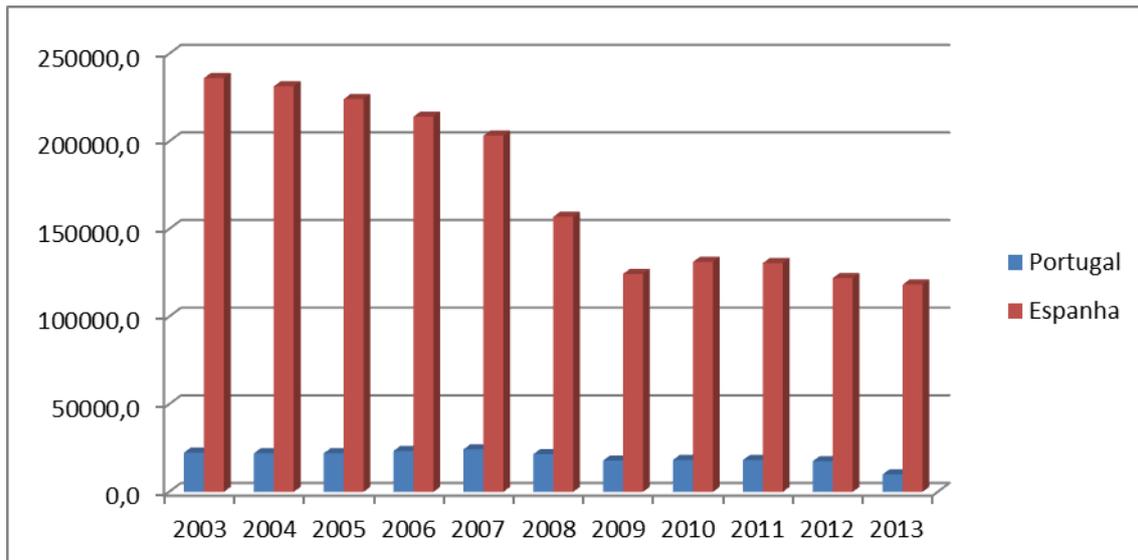


Figura 3: Gráfica representativa de la reducción de la producción de carne de ovino (en toneladas) en los últimos 10 años de registro existente, en Portugal y España (FAOStat, 2013).

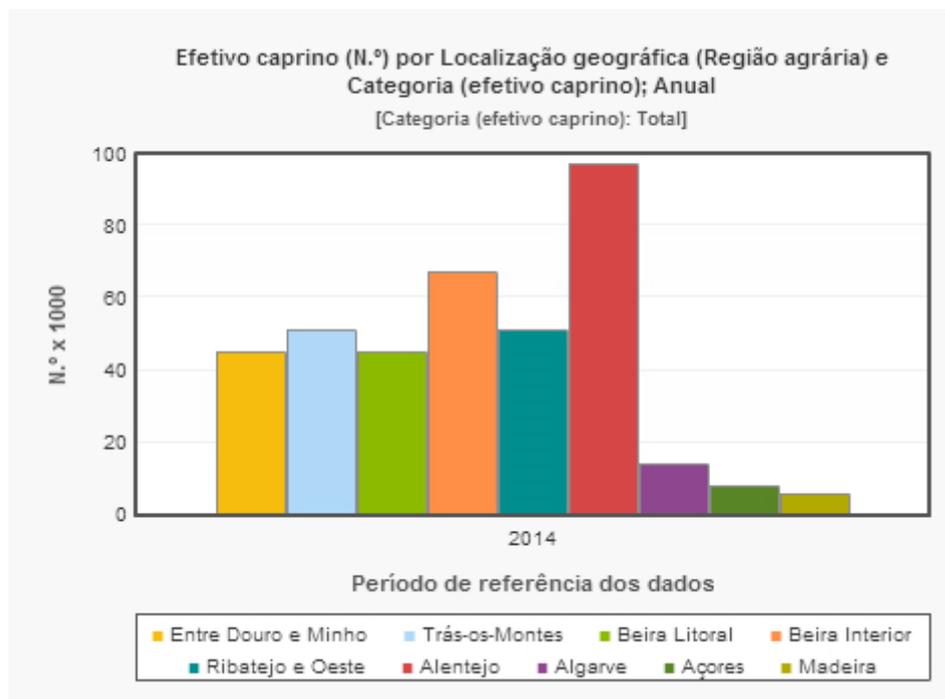


Figura 4: Gráfica representativa del total de cabras en 2014 en las principales regiones agrícolas de Portugal (Estatística PORTUGAL, 2014).

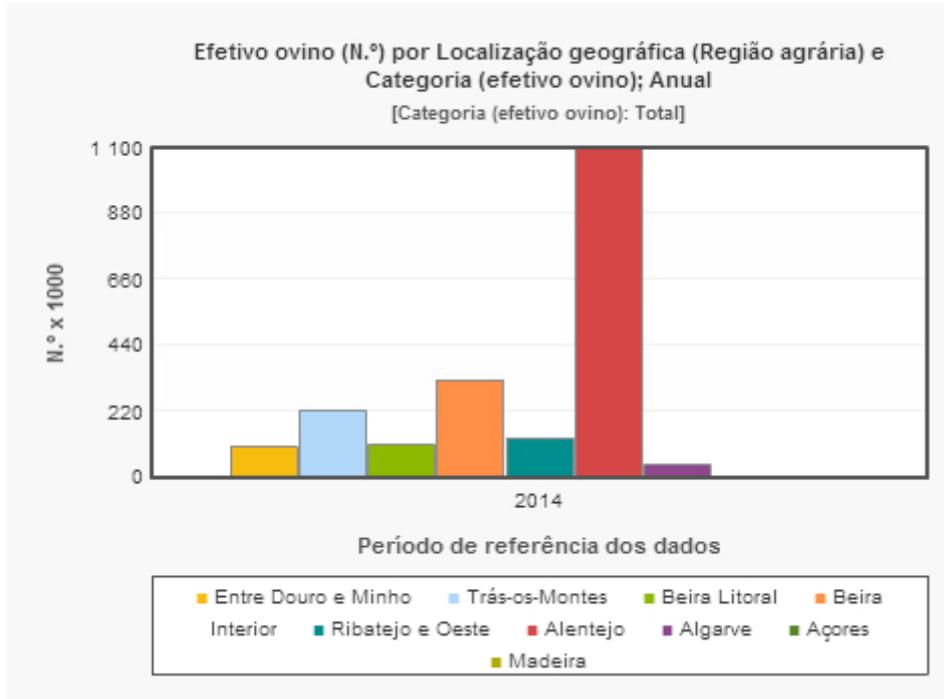


Figura 5: Gráfica representativa del número total de ovinos en 2014 en las principales regiones agrícolas de Portugal (Estadística PORTUGAL, 2014).

La región de Alentejo es el principal productor de leche de cabra y el segundo productor de leche de oveja del país (Fig. 6 y 7, respectivamente) (Estadística PORTUGAL, 2014).

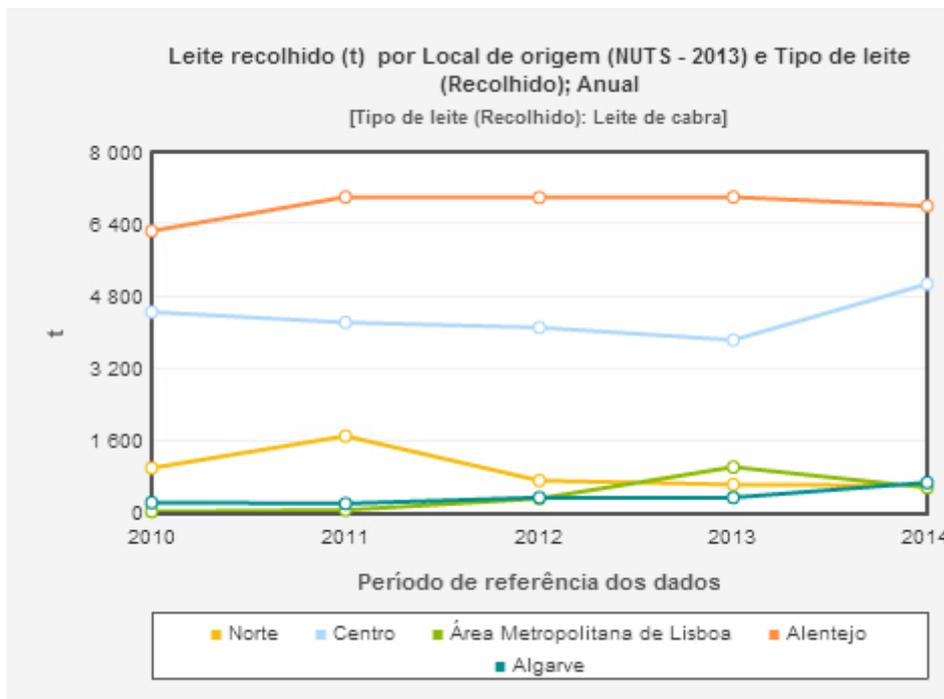


Figura 6: Gráfica representativa de la producción de leche de cabra en 5 regiones agrícolas de Portugal, entre 2010 y 2014 (Estadística PORTUGAL, 2014).

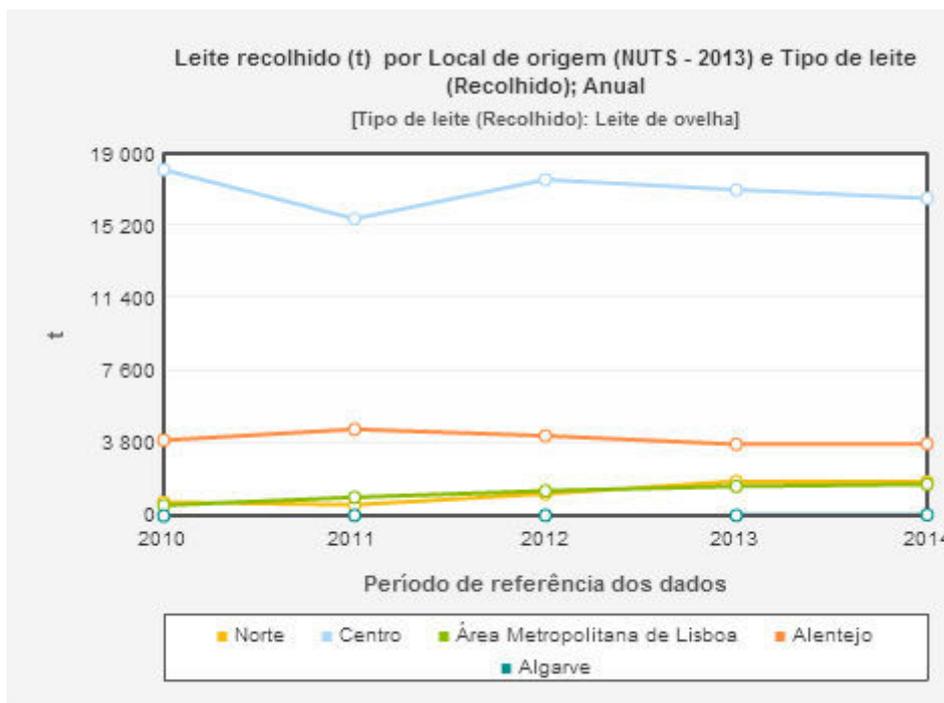


Figura 7: Gráfica representativa de la producción de leche de oveja en 5 regiones agrícolas de Portugal, entre 2010 y 2014 (Estadística PORTUGAL, 2014).

La producción de pequeños rumiantes lecheros y cárnicos en el Alto Alentejo representa una parte importante de la producción ganadera en la región y en el país, con un total de 250.000 ovejas y 25.000 cabras (Estadística PORTUGAL, 2009).

La producción anual de carne, cordero certificado (*Borrego do Nordeste Alentejano* IG-Indicación Geográfica), en la región en estudio, es de 128 toneladas, siendo la segunda región certificada más grande en la producción de esta carne en Portugal. En cuanto a la producción de queso de oveja, el Alto Alentejo es la región con mayor producción de queso certificado en el país, registrando el queso *Nisa* DOP (Denominación de Origen Protegida) una producción anual de 120,3 toneladas.

En Portugal, en los últimos años se ha producido un abandono de la actividad por parte de pequeños y medianos productores de ovejas y cabras, debido a la baja rentabilidad y pequeña dimensión de la explotación, reducción del apoyo a la producción, nuevos requisitos sanitarios, edad avanzada de los ganaderos y reducido interés de los jóvenes agricultores en el sector agrario (Estadística PORTUGAL, 2011; Rente, 2014; Matos, 2015a). De hecho, al contrario de lo que ocurre en todo el mundo, se ha observado un desinterés por la cría de ovejas y cabras, con la consecuente disminución del número de

explotaciones y animales (FAOStat, 2015; Cabo et al., 2017). Sin embargo, la población nacional de pequeños rumiantes se ha mantenido estable, mientras disminuye progresivamente el número de explotaciones, lo que indica una cierta concentración del sector (Tabla 2 y Fig. 8).

La población autóctona va acompañada de una tendencia decreciente a nivel nacional y en 2013, era solo el 5% y el 11% del rebaño de ovejas y cabra nacional, respectivamente. Esta pérdida de efectivo también se refleja en la producción y comercialización de sus productos certificados (Cabo et al., 2017).

Tabla 2: Evolución del número total de explotaciones de pequeños rumiantes y del número total de animales de las especies ovino y caprino en Portugal (Adaptado de PISA.net, 2020).

Peq. rumiantes	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Nº explotaciones	69.005	66.051	64.330	62.497	60.958	59.236	58.591
Nº animales	2.476.829	2.378.815	2.267.714	2.227.202	2.280.744	2.331.381	2.298.938

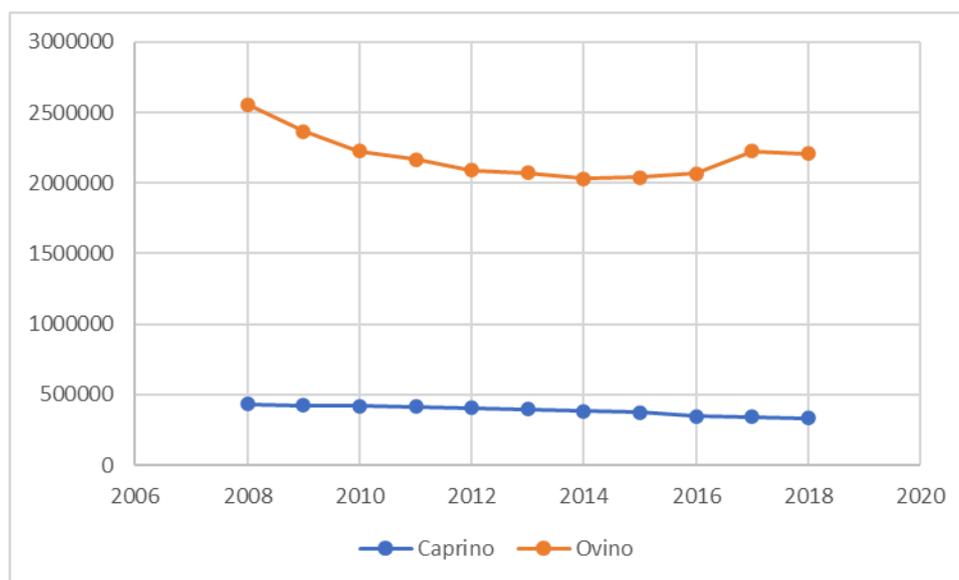


Figura 8: Gráfica representativa de la evolución del número total de ovinos y caprinos en los últimos años, en Portugal (FAOStat, 2018).

El efectivo ovino no ha cambiado significativamente desde 2009 (-2%), pero el tamaño medio de los rebaños aumentó de 43 a 51 cabezas por explotación en 2019, debido al aumento del efectivo en explotaciones con más de 500 cabezas (+ 12%) y el abandono de pequeños productores, con rebaños de menos de 10 ovinos, cuyo número disminuyó un 19%. La disminución del efectivo caprino fue más evidente que la de ovino, registrándose una disminución del 12%. También hubo un mayor abandono de la actividad, ya que el 30% de las fincas que criaban cabras desaparecieron en 2009. Sin embargo, este abandono se dio exclusivamente en pequeños productores, ya que los grandes rebaños, con más de 500 cabras, aumentaron tanto en número de animales (+ 28%) como en efectivo (+ 34%), contribuyendo así al crecimiento del tamaño medio de 13 a 16 cabezas por explotación en 2019. A diferencia de la producción ovina, que está muy concentrada en el Alentejo (53%), la producción caprina tiene una mayor dispersión territorial (Estadística PORTUGAL, 2019).

La tendencia actual se considera preocupante lo que conlleva a fomentar medidas y programas regionales y nacionales para contrarrestarlo.

En un futuro próximo será fundamental impulsar la denominada agricultura familiar con enfoque en las pequeñas explotaciones y un fuerte apoyo en el ámbito de la sanidad animal y en el diagnóstico y control de enfermedades. La Década de la Agricultura Familiar de las Naciones Unidas 2019-2028 tiene como objetivo arrojar nueva luz sobre lo que significa ser un agricultor familiar en un mundo que cambia rápidamente y destaca más que nunca el importante papel que desempeñan en la erradicación del hambre y en la configuración de nuestro futuro de la alimentación. La agricultura familiar ofrece una oportunidad única para garantizar la seguridad alimentaria, mejorar los medios de vida, gestionar mejor los recursos naturales, proteger el medio ambiente y lograr el desarrollo sostenible, especialmente en las zonas rurales. Gracias a su sabiduría y cuidado de la tierra, los agricultores familiares son los agentes de cambio que necesitamos para lograr el Hambre Cero (*Zero Hunger*), un planeta más equilibrado y resiliente, y los Objetivos de Desarrollo Sostenible (*Sustainable Development Goals*) (FAO, 2014).

El presente trabajo se desarrolló en la zona rural más extensa de Portugal continental y gran parte del trabajo de recolección de muestras y datos se llevó a cabo en el campo, junto a ganaderos y agricultores familiares.

El potencial ganadero de estas zonas y de la gente que las habitan es enorme y en países pequeños como Portugal, la valorización del sector primario de la economía debe ser la apuesta de futuro de los gobiernos nacionales y regionales.

2.2. Etiología

La LC es una enfermedad de etiología bacteriana con una evolución crónica causada por el agente *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Inicialmente el microorganismo se conoció como bacilo de Preisz-Nocard y tras varias denominaciones, en 1923 pasó a llamarse *Corynebacterium ovis* y finalmente en 1948 se denominó oficialmente *Corynebacterium pseudotuberculosis*. La etimología de la palabra "*corynebacterium*" es de origen griego y hace referencia a la morfología y agrupación de la bacteria, un bacilo Gram positivo irregular, pleomórfico que adopta formas diversas como de empalizada, letras en alfabeto chino, en parejas, predominando la forma de porra o de maza (*Coryne*); por otra parte el término "*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 (Belchior et al., 2006).

El agente de la LC es un *actinomicete* Gram positivo, pero otros agentes tales como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Anthrobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Moraxella* spp. y *Pasteurella* spp., han sido aislados a partir de nódulos linfáticos infectados (Hosseinzadeh et al., 1996; Fontaine y Baird, 2008; Zavoshti et al., 2012). En un estudio realizado en matadero en la provincia de Tanta, Egipto (Al-Gaabary et al., 2010) un total de 282 casos (228 ovejas y 54 cabras) presentaban lesiones típicas de LC, aislándose el patógeno *C. pseudotuberculosis* en 254 de los casos (216 ovejas y 38 cabras), lo que representa una frecuencia de aislamiento de un 90,07%. En el mismo estudio, *C. pseudotuberculosis* se aisló como patógeno único en 219 casos (77,65%), y en infección mixta con *Staphylococcus* spp. en 35 casos (12,41%). Por otro lado, las especies de *Staphylococcus* spp. se aislaron como patógeno único en solo 28 casos, representando 9,92%. En un trabajo desarrollado en Canadá (Debien et al., 2013) se identificó (por aislamiento bacteriológico) *Corynebacterium pseudotuberculosis* en 37 de los 54 animales con abscesos. De los 17 animales restantes que eran negativos a esta bacteria, se aisló, el agente *Trueperella* (*Arcanobacterium*) en 6 casos, *Pasteurella*

multocida en 1 caso y, en 10 casos no se observó ningún aislamiento bacteriológico, hecho que es consistente con la posibilidad de haber abscesos "estériles" o por lo menos con una baja carga microbiológica.

El *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Actinomycetales: Corynebacteriaceae*) es un bacilo intracelular facultativo, pleomórfico, no-móvil, no esporulado, con fimbrias y con tamaños que oscilan entre 0,5-0,6 μm y 1,0-3,0 μm , muy resistente en el medio externo, lo que parece vincularse a la existencia de un componente lipídico de su membrana, muy eficaz frente a la desecación (Quinn et al., 2011). Esta propiedad le da casi el carácter de enfermedad telúrica pudiendo dar lugar, por tanto, a infecciones de origen exógeno, principalmente si tenemos en cuenta que, aunque estos microorganismos sean sensibles a la luz solar y al calor, también pueden permanecer viables durante meses en la oscuridad y sobrevivir a temperaturas de hasta 60°C bajo cero (Brown et al., 1987; Quinn et al., 2011; Almeida et al., 2016).

El grupo CMNR es un grupo genérico de la familia *Actinomycetales* que incluye varios géneros con impacto en la salud animal y humana, que incluye: *Corynebacterium* (C), *Mycobacterium* (M), *Nocardia* (N) y *Rhodococcus* (R). Las bacterias del grupo CMNR presentan características en común, incluyendo un elevado contenido genómico en bases G/C (52,85%) y una pared celular específica con una estructura compuesta por ácido micólico, peptidoglicanos y arabinogalactina (Dorella et al., 2006 citado por Bezos et al., 2015; Almeida et al., 2016).

La Pseudotuberculosis afecta fundamentalmente a los pequeños rumiantes, formando parte de un grupo de enfermedades, todas ellas consuntivas, producidas por especies de géneros incluidos en el grupo 20 del "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" (Bergey, 1923) (Tabla 3).

Tabla 3: “Manual of Systematic Bacteriology” (Adaptado de Bergey, 1923).

Género	Especie	Biotipo	Enfermedad	Hospedador
<i>Corynebacterium</i>	<i>Diphtheriae</i>		Difteria	Hombre
	<i>Pseudotuberculosis</i>	I	Linfoadenitis caseosa	Pequeños rumiantes
		II	Linfangitis ulcerativa	Equino
	<i>Renale</i>		Pielonefritis y cistitis	Bovino
	<i>Cystitidis</i>		Cistitis hemorrágica	Bovino
	<i>Pilosum</i>		Pielonefritis y cistitis	Bovino
	<i>Ulcerans</i>		Mamitis	Bovino
<i>Actinomyces</i>	<i>Bovis</i>		Actinimicosis	Bovino
<i>Archanobacterium</i>	<i>Pyogenes</i>		Piobacilosis	Porcino
<i>Eubacterium</i>	<i>Suis</i>		Pielonefritis, cistitis y metritis	Porcino

Corynebacterium diphtheriae, *ulcerans* y *pseudotuberculosis* constituyen un grupo de microorganismos “toxigénicos” que están relacionados con diferentes procesos infecciosos en animales y humanos (Torres et al., 2013).

Se consideran dos biotipos de *C. pseudotuberculosis*, clasificados así en base a la capacidad de reducción del nitrato: cepas nitrato-negativas que son referenciadas como el serotipo I (biotipo *ovis*) y cepas nitrato-positivas que son clasificadas como serotipo II (biotipo *equi*). Los biotipos aislados de ovejas y cabras son normalmente nitrato-negativos, mientras que las estirpes aisladas de caballos son típicamente nitrato-positivas; los aislados de origen bovino son variables (Soares et al., 2013; Torres et al., 2013). La OSD (*Oedematous skin disease*) es una enfermedad endémica de los búfalos en Egipto y el *C. pseudotuberculosis* serotipo II (biotipo *equi*; nitrato positivo) se considera la causa primaria (Selim, 2001).

El gen de la toxina *Diphtheria toxin* (DT) está codificado por un bacteriófago capaz de infectar el *Corynebacterium diphtheriae*, el *Corynebacterium ulcerans* y el *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Wong y Groman, 1984; Pappenheimer, 1993 citados por Torres et al., 2013).

Originariamente la clasificación del *Corynebacterium pseudotuberculosis* se basaba en sus características morfológicas y bioquímicas, pero la quimiotaxonomía ha revelado la

existencia del ácido mesodiaminopimelico en su pared celular. Los peptidoglicanos, arabinosa y galactosa son los principales glúcidos de la pared celular, así como los ácidos micólicos de cadena corta. La utilización de secuencias parciales de genes *rpoβ*, que codifican a la subunidad β de la ARN polimerasa, también han resultado útiles en la identificación y clasificación de las especies del género *Corynebacterium* (Gyles et al., 2010).

Muy recientemente técnicas moleculares de tecnología genómica y filogenética, como la secuenciación multilocular (Sellyei et al., 2017) y la evaluación de *ERIC-PCR* (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – PCR*) (Dorneles et al., 2014) se han desarrollado con la intención de identificar y clasificar diferentes cepas del *C. pseudotuberculosis*, con evidencia de diferencias genéticas importantes entre los biotipos *ovis* y *equi* (Soares et al., 2013; Sellyei et al., 2017) y una diversidad genética prominente entre *C. pseudotuberculosis* de diferentes hospedadores y países (Dorneles et al., 2014).

El análisis del pangenoma de 15 cepas del *C. pseudotuberculosis* se completó recientemente (Soares et al., 2013) y los autores Almeida et al. (2016) describieron la secuencia del genoma de una cepa altamente virulenta del *C. pseudotuberculosis*, la cepa VD 57 (*Cp_VD57*) (Almeida et al., 2016). Los mecanismos de modificación de los nucleótidos responsables de que una cepa sea más virulenta que otra, no han sido identificados y actualmente una de las áreas de investigación en *C. pseudotuberculosis* más importantes es la definición de los genes que se expresan de forma diferenciada en cultivos bacteriológicos y en el interior de las lesiones granulomatosas (Almeida et al., 2016).

2.3. Epidemiología

La pseudotuberculosis, al no ser una enfermedad de declaración obligatoria, presenta una prevalencia generalmente subestimada. En zonas pobres y con pocos recursos económicos, donde el principal sector de subsistencia es la ganadería, los ganaderos y veterinarios no están sensibilizados y los casos de LC no son declarados ni investigados, siendo total el desconocimiento de su verdadera importancia (Belchior et al., 2006; Gómez-Gascón et al., 2013; Kumar et al., 2013).

Por otro lado, su impacto en la economía de países con numerosas explotaciones de pequeños rumiantes y los estudios recientemente publicados demostraron que existe una fuerte expansión de la LC (Connor et al., 2000; Çetinkaya et al., 2002; Guimarães et al., 2011a; Pavan et al., 2012; Costa, 2016; Alves et al., 2020; Ruiz et al., 2020). En Reino Unido por ejemplo la enfermedad está presente desde 1980 y se considera actualmente endémica en esta nación (Gascoigne et al., 2020).

En la tabla 4 se presentan datos de prevalencia de LC en los últimos 30 años y en diferentes partes del globo. En este cuadro resumen el valor estimado de la prevalencia varía de una región a otra y según el método de diagnóstico utilizado para detectar los animales afectados (detección macroscópica de abscesos, aislamiento bacteriológico del agente *Corynebacterium pseudotuberculosis*, serología o PCR). Aun considerando que los resultados se obtuvieron en base a diferentes técnicas diagnósticas, y que no sea posible tener una valoración real de la evolución de la prevalencia de LC a lo largo de los años, se puede observar que la prevalencia de la enfermedad ha tendido a aumentar hasta los días de hoy. Otro hallazgo interesante en este resumen es el hecho de que la frecuencia de la enfermedad es más elevada cuando se presentan los datos en referencia a la dispersión de la infección en rebaños (Pavan et al., 2012; de Farias et al., 2019) (Tabla 4).

Tabla 4: Cuadro resumen de los datos de prevalencia de la linfadenitis caseosa (LC) en Europa y en el mundo (adaptado de Costa, 2016).

País/Región	Estudio/Año/Técnica analítica	Especie	Valor estimado de la prevalencia de LC
Brasil	de Farias et al./2019/Serología (dispersión en rebaños y prevalencia en animales)	Caprino	87.8% y 30.3%
Portugal/Alto Alentejo	Costa /2016/PCR	Ovino y Caprino	17.24%
Etiopía	Abebe y Tessema/2015/Aislamiento microbiológico	Ovino y Caprino	72%
Corea	Jung et al./2015/Serología	Caprino	57.3%
Argelia	Chikhaoui et al./2013/Aislamiento microbiológico	Ovino	53.6%
España/Andalucía	Gómez-Gáscon et al./2013/Aislamiento microbiológico	Ovino y Caprino	38%
Canadá/Quebeque	Debien et al./2013/Evaluación macroscópica de abscesos	Caprino	24.3%
Australia	Windsor/2011/Evaluación de mataderos y encuestas a productores	Ovino	26%
Argentina/Patagonia	Pavan et al./2012/Serología (dispersión en rebaños)	Ovino y Caprino	70%
Brasil	Pavan et al./2012/Serología (dispersión en rebaños)	Caprino	78%
Egipto	Al-Gaabary et al./2010/Evaluación macroscópica de abscesos y análisis bacteriológico	Ovino y Caprino	26.92% y 25.05%
Irlanda	Malone et al./2006/Aislamiento microbiológico	Ovino	40.4%
Canadá/Quebeque	Arsenault et al./2003/Aislamiento microbiológico	Ovino	21%
Turquia	Çetinkaya et al./2002/Aislamiento y PCR	Caprino y Ovino	16 – 63%
Canadá/Alberta	Stanford et al./1998/Serología	Ovino	23%
Japón	Chikamatsu et al./1989/Serología	Ovino	39.3%
Brasil/Nordeste	Brown et al. /1987/Evaluación macroscópica de abscesos	Caprino	14%

Un estudio realizado en la provincia de Quebec, Canadá (Debien et al., 2013) que tenía como objetivo determinar las principales causas de muerte en 13 explotaciones de cabras, verificó que entre las principales causas de muerte en colectivos de cabras están la Enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D (17,1%), la neumonía (13,8%), la Paratuberculosis (10,5%), la Listeriosis (6,6%), la Toxemia de gestación (5,3%), la Artritis encefalitis caprina (4,6%) y la Linfadenitis caseosa (3,9%). El mismo estudio concluyó que la LC, a pesar de no ser una causa importante de muerte existe una elevada prevalencia en el sector caprino (24,3%) y la forma visceral (con abscesos internos) está presente en un 54.1% de los casos. En este trabajo (Debien et al., 2013), de las 152 cabras a las que se le realizó la necropsia, 54 (35,5%) tenían al menos un absceso y se aisló *Corynebacterium pseudotuberculosis* en 37 de las 54 (68,5%) cabras con abscesos. La LC fue la enfermedad más frecuente diagnosticada en este estudio, afectando a un 24,3% de los animales sacrificados y once de las 13 explotaciones participantes (84,6%) tenían al menos un animal afectado por esta enfermedad.

En estudios desarrollados en España se verifica que la LC se ha mantenido en los últimos años sin alteraciones en su prevalencia (Gómez-Gascón et al., 2013) y un trabajo reciente en este país (Ruiz et al, 2020) registra una prevalencia de LC por observación macroscópica de lesiones compatibles y confirmación por aislamiento del *C. pseudotuberculosis*, del 29,52% (147/498).

En Portugal, no existen estudios previos sobre la prevalencia y la importancia económica de la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en pequeños rumiantes a nivel nacional o regional. Sin embargo, la forma clínica de la enfermedad caracterizada por abscesos subcutáneos, a menudo descrita como "Enfermedad de los quistes", es reconocida en la mayoría de los efectivos, tanto por los productores como por los médicos veterinarios. Se ha concluido, de forma empírica, que en los efectivos ovinos y caprinos cuando un animal presenta abscesos superficiales existen al menos 6 animales con abscesos internos (Costa, 2016) y la presencia de abscesos en los nódulos superficiales es altamente sugestiva de la presencia de LC en un rebaño, particularmente si muchos animales del grupo están afectados de forma similar (Al-Gaabary et al., 2010).

Un trabajo previo realizado en 4 explotaciones con ovejas y cabras de Lisboa, a partir de abscesos localizados en los nódulos linfáticos submaxilar, retrofaríngeo lateral, pre-escapular, supra-mamario y poplíteo, refirió el aislamiento de *Corynebacterium*

pseudotuberculosis en 5 de las 11 (45%) ovejas y 2 de las 3 (66,7%) cabras analizadas (Boinas et al., 2000). Este trabajo se centró en la investigación del agente infeccioso en lesiones externas, sin embargo, el principal problema radica en la detección de cuadros subclínicos y en las manifestaciones sistémicas de la enfermedad, que son menos detectadas, y a la vez son las principales causas de las pérdidas económicas asociadas a la LC. Así, estudios llevados a cabo en la región de Tras-os-Montes (Portugal) sobre la mortalidad perinatal en pequeños rumiantes, identificaron el género *Corynebacterium* spp. a partir de abortos, nacidos muertos y lesiones pulmonares de recién nacidos (junto a *Pasteurella* spp., *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus bovis* y *Clostridium perfringens*); los autores no determinaron la especie de *Corynebacterium* implicada (Mendonça, 2012).

Sin embargo, y a pesar del interés aparente y la concienciación actual sobre la importancia de la LC en la producción nacional de pequeños rumiantes, no se están desarrollando estudios para profundizar en el conocimiento científico y epidemiológico de esta enfermedad en Portugal.

El desconocimiento del estado sanitario de los colectivos de rumiantes es un viejo problema en Portugal. Los planes de control y erradicación implementados sólo cubren las enfermedades de control oficial¹ y no es posible obtener datos o registros de otras enfermedades infectocontagiosas con importancia sanitaria y económica relevantes, como la Pseudotuberculosis, la Paratuberculosis, la Clamidiosis o la Leptospirosis. Sin embargo, para la exportación de corderos a terceros países, como Israel, Irán, Túnez o Arabia Saudí, es obligatoria la certificación de las explotaciones de origen como libres de LC en caso de venta para reproducción, y la no evidencia clínica de LC en los últimos 3 años para la venta de corderos para sacrificio (Dr^a Rita Amador – DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária - IV Jornadas Técnico-Veterinarias de Campo Branco, 20 y 21 de noviembre de 2015). A pesar del enorme interés por parte de estos países en el cordero portugués (el cual valora por encima de 5 euros por kilogramo en los animales con más de 60 kg de peso corporal), el incumplimiento de estas condiciones sanitarias

1

- Pequeños rumiantes: “Programa de Erradicação de Brucelose Ovina e Caprina e Plano de Vigilância, Controlo e Erradicação das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET’s)”.

- Bovinos: “Programa de Erradicação de Brucelose Bovina, Tuberculose Bovina e Leucose Enzoótica dos Bovinos e o Plano de Vigilância, Controlo e Erradicação das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET’s)”.

impide a los productores nacionales de los pequeños rumiantes exportar su producción (Costa, 2016).

En cuanto a los factores de riesgo asociados a la Linfadenitis Caseosa, la prevalencia en la especie ovina es significativamente más alta en hembras (19,67% y 6%) que en machos (12,42% y 4,8%), resultados de los estudios Al-Gaabary et al. (2009) y Chikhaoui y Khoudja (2013) respectivamente, y simultáneamente más alta en animales adultos que en jóvenes (Chikhaoui y Khoudja, 2013). Las hembras son criadas con finalidad reproductiva y por eso permanecen más tiempo en la explotación, por lo tanto, están expuestas durante periodos de tiempo más largos a factores de riesgo como el esquilado, el pasto seco y grosero, y la convivencia con animales infectados. Entre los primeros 6 meses de vida, los corderos reciben de la madre a través de la leche inmunoglobulinas, y éstas van disminuyendo hasta que desaparecen entre el primer y segundo año de vida, lo que explica una prevalencia más alta de LC en animales entre 1 y 2 años (47,36%) (Al-Gaabary et al., 2009) y 32,6% en animales mayores de 4 años (Chikhaoui y Khoudja, 2013).

Varios estudios de análisis de factores de riesgo para la LC avaluaran el drenaje natural de los abscesos superficiales como una variable (posible factor de riesgo) (Andrade et al., 2012; de Farias et al., 2019) y todos concluyen que animales de rebaños donde sus dueños dejaron que los abscesos se rompieran naturalmente se presentaron una probabilidad más elevada en padecer de linfadenitis caseosa (Andrade et al., 2012; de Farias et al., 2019). En un otro estudio reciente de factores de riesgo (Alves et al., 2020) las variables asociadas con una prevalencia más elevada de LC fueron ovejas de raza pura (Razón de prevalencia - PR = 1.189; P = 0.017), adquisición de carneros a partir de exposiciones de animales (PR = 1.192; P = 0.020), la separación de la descendencia de las ovejas (PR = 1.132; P = 0.048), el agua suministrada a las ovejas de los estanques (RP = 1.365; P = 0.002) y la eliminación tardía de los animales infectados (RP = 1.263; P = 0.027).

Al igual que sucede en la Difteria humana (*C. diphtheriae*) (Kombarova et al., 2001; Saikya et al., 2010 citados por Torres et al., 2013), *C. pseudotuberculosis* puede dar lugar a epidemias en los animales. El aumento del número de rebaños infectados puede ser resultado de factores ambientales que predisponen a la infección o factores relacionados con el hospedador, tales como una elevada susceptibilidad genética de algunas razas (Foley et al., 2004 citado por Torres et al., 2013; Smith, 2015).

Aunque las especies más susceptibles son los pequeños rumiantes, *Corynebacterium pseudotuberculosis* puede provocar infecciones ocasionales en otras especies, como vacuno (Shpigel et al., 1993; Baird y Fontaine, 2007; Rocha, 2011), caballo (Guedes et al., 2015; Spier y Azevedo, 2016), rumiantes salvajes (Clark et al., 1972; Stauber et al., 1973; Colom-Cadena et al., 2014; Matos et al., 2015; Domenis et al., 2018), búfalo (Torres et al., 2013), cerdo (Oliveira et al., 2014) y el hombre (Bartolomé et al., 1995; Peel et al., 1997; Join-Lambert et al., 2006; Paton, 2010; Heggelund et al., 2015).

Este patógeno se ha asociado con casos de linfadenitis en caballos y con linfangitis ulcerativa en bovinos (Baird y Fontaine, 2007) y se aisló en el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Stauber et al., 1973), antílopes (Clark et al., 1972) y cabra pirenaica (*Capra pyrenaica hispanica*) (Colom-Cadena et al. 2014). En Portugal, se han descrito también casos de linfadenitis granulomatosa en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) causados por una coinfección por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Matos et al., 2015). Los autores Domenis y et al. (2018) describen recientemente la LC en la gamuza alpina (*Rupicapra r. rupicapra*) basándose en una serie de 98 casos de infección por *C. pseudotuberculosis* confirmados por bacteriología y análisis de secuenciación genética (Domenis et al., 2018).

En países donde conviven estas especies salvajes con los rumiantes domésticos, como Portugal y España, puede preverse la transmisión del agente etiológico entre ambos y dificultar el control de la LC. Existen evidencias científicas de que la cohabitación entre los pequeños rumiantes domésticos y salvajes es un importante factor de riesgo en la prevalencia de enfermedades infecciosas (Márquez et al., 2013; Matos et al., 2015) alterando el panorama de distribución de enfermedades como la LC.

El modo de transmisión, la patogenia y el impacto económico de la enfermedad en **bovinos** está poco estudiada. A pesar del amplio espectro de hospedadores, la transmisión natural del *C. pseudotuberculosis* entre pequeños rumiantes y bovinos no es común, si bien en las infecciones en bovinos se han aislado ambos biotipos I y II (*ovis* y *equi*) (Soares et al., 2013).

La aparición de casos de LC en otras especies (diferentes a los pequeños rumiantes), como bovinos y caballos, es cada vez más frecuente, no sólo porque la presión diagnóstica es

mayor, sino porque existe una dispersión del agente etiológico al medio ambiente que desemboca en una mayor transmisión a otras especies. El estudio de un brote de *C. pseudotuberculosis* en **caballos** de todas las edades, sexo y razas en Kansas (USA) determinó que la enfermedad se desencadenó en condiciones climáticas de calor y sequía, bajo condiciones ambientales de baja humedad del suelo y fragmentación de pastos (finales de verano hasta finales de otoño, con un pico en el mes de noviembre), condiciones propicias para el desarrollo del agente etiológico en esta región (Boysen et al., 2015).

En Portugal, el primer caso de LC en **cerdos** de raza Porco Preto Alentejano (*Sus scrofa domesticus*) fue publicado en 2014 (Oliveira et al., 2014). La enfermedad afectó al 10% de los animales de las 2 explotaciones en estudio (con cerca de 600 cerdos cada una), y *C. pseudotuberculosis* fue la bacteria responsable, aislándose en cultivo puro en todas las muestras recogidas (Oliveira et al., 2014).

Este y otros trabajos vienen a demostrar que la LC es una enfermedad que, aunque reconocida hace más de cien años, está lejos de estar controlada. La posibilidad de diseminación cruzada entre hospedadores animales alerta sobre la importancia de implementar medidas de control y manejo sanitario que controlen la infección y eviten su dispersión.

La LC se introduce normalmente en un rebaño por medio de un portador asintomático procedente de una explotación infectada. Para la mayoría de los autores los animales con abscesos internos y/o lesiones pulmonares son la principal fuente de contagio (Baird y Fontaine, 2007; Paton, 2010; Windsor, 2011; Gómez-Gascón et al., 2013; de Farias et al., 2019). La rotura de abscesos en el nódulo linfático mediastínico y la creación de fístulas en los bronquios, con eliminación en los aerosoles, son la causa principal, especialmente en época de confinamiento (Windsor, 2014). Los animales afectados por la forma cutánea y con abscesos superficiales representan otra importante fuente de contagio, ya que a partir de estas lesiones se libera una gran cantidad de bacterias viables (10^6 y 5×10^7 células/g) a la piel y al vellón, que puede contaminar el medio externo e infectar a otros animales (Baird y Fontaine, 2007); siendo cierto que el microorganismo puede sobrevivir durante 6 meses o más en el medio ambiente (Underwood et al., 2015) y durante 55 días en la materia orgánica (Gascoigne et al., 2020). La contaminación, subsecuente, de

abrasiones en la piel y heridas de diversos orígenes con el material purulento, se sugiere como la principal vía de transmisión del agente etiológico (Kaba et al., 2001).

Además de la transmisión por contacto directo, se admite como forma indirecta de contagio el esquilado, la aplicación de medicamentos inyectables y la aplicación de dispositivos de identificación auricular o tatuajes, debido al manejo deficiente y la contaminación de los trabajadores y sus equipos (Guimarães et al, 2011a; Gómez-Gascón et al., 2013; Costa, 2016). Asimismo, autores como Baird y Fontaine (2007) sostienen que, aunque *C. pseudotuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa no formadora de esporos, su capacidad para sobrevivir largos periodos en el medio ambiente puede contribuir a la elevada transmisión de la LC en un rebaño.

En varios estudios realizados en Estados Unidos, Israel y Egipto, se ha referido un contagio indirecto de *C. pseudotuberculosis* a través de vectores como las moscas (*Musca domestica* y *Hippobosca equina*) (Torres et al., 2013). Este agente patógeno se puede encontrar en un 20% de las moscas alrededor de animales enfermos (Yeruham et al., 1996; Baverman et al., 1999; Selim, 2001; Spier et al., 2014 citados por Torres et al., 2013). De igual modo, la aparición de brotes de OSD (*Oedematous skin disease*) en búfalos en los meses de verano se ha relacionado con la mayor actividad reproductiva en estos meses de *H. equina*, el vector primario del agente causal de la enfermedad, *C. pseudotuberculosis* (Torres et al., 2013). Se necesitan estudios sobre la implicación del cambio climático en la ecología y evolución del *C. pseudotuberculosis* y otras bacterias transmitidas por el suelo (*soil-borne diseases*) y por vectores y con importancia en salud animal y en la salud pública.

Según O'Reilly et al. (2008) la diseminación dentro del rebaño se inicia con una epidemia de abscesos superficiales, seguida por un aumento de la frecuencia de abscesos en los pulmones, mediastino y nódulos linfáticos bronquiales (abscesos respiratorios), brote que eventualmente se vuelve endémico (Guimarães et al., 2011a). Entre los factores de riesgo para la adquisición de la infección se citan el manejo deficiente, la ausencia de higiene y la edad, siendo más frecuente en animales mayores de 3 años (Guimarães et al., 2011a; Chikhaoui y Khoudja, 2013; Gómez-Gascón et al., 2013).

La resistencia o baja susceptibilidad de las razas de pequeños rumiantes a algunas enfermedades infectocontagiosas se estudia desde hace años con el objetivo de evaluar el

potencial de la selección genética en el control de estas enfermedades (Gray et al., 1995; Pal y Chakravarty, 2020). Se han descrito variaciones genéticas individuales y también entre poblaciones para la infección por nematodos, mastitis, pedero, *Scrapie* e intoxicación por micotoxinas, entre otras enfermedades, que han permitido introducir programas de mejora de la raza mediante selección genética, obteniéndose mayor éxito en ovejas que en cabras (Pal y Chakravarty, 2020).

2.4. Importancia zoonótica

La LC está considerada una enfermedad con potencial zoonótico y una enfermedad profesional, debido a que puede afectar a individuos en estrecho contacto con animales infectados (Paton, 2010; Gómez-Gascón et al., 2013; Latif et al., 2016).

La LC se describió como una zoonosis en 1966 (Lopez et al., 1966 citado por Join-Lambert et al., 2006). La infección se ha descrito mayoritariamente en Australia, en personas que conviven con animales de producción (ganaderos, trabajadores de matadero, etc.), aunque también se han descrito algunos casos en Europa (Peel et al., 1997; Paton, 2010).

El contagio se produce principalmente a través de heridas superficiales por contacto con animales infectados y por inhalación de polvo contaminado, sin que se haya identificado ninguna condición predisponente (Peel et al., 1997; Join-Lambert et al., 2006; Torres et al., 2013). Aunque menos importante, se ha descrito la eliminación de *C. pseudotuberculosis* en la leche; por tanto, la ingestión de leche no pasteurizada procedente de animales infectados podría ser una fuente de infección para el hombre (Peel et al., 1997; Çetinkaya et al., 2002).

A pesar de ser raras, las infecciones causadas por *C. pseudotuberculosis* en humana son semejantes a las descritas en ovejas y cabras. Generalmente, no se observa ninguna lesión en la localización de entrada, pero tras un período de incubación, que varía de semanas a meses, se forman abscesos en la región de drenaje de los nódulos linfáticos (Fig. 9) (Join-Lambert et al., 2006). La linfadenitis axilar es la presentación más frecuente, presumiblemente porque las infecciones primarias suelen ocurrir en manos y brazos (Peel et al., 1997). No suelen darse manifestaciones de toxemia (Torres et al., 2013).

El tratamiento suele requerir la escisión de los nódulos infectados y la administración de antimicrobianos (Peel et al., 1997; Torres et al., 2013).



Figura 9: Descarga de pus caseosa en la región cervical en un paciente humano (Jiao et al., 2012).

El primer caso en la especie humana publicado en España fue en 1995: un pastor de 34 años que se mostraba sano fue atendido por presentar un nódulo doloroso en la ingle derecha con un año de evolución (Bartolomé et al., 1995). La bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* se aisló en un cultivo puro a partir del tejido aspirado y ganglionar. El examen histológico del nódulo extirpado mostró una linfadenitis granulomatosa supurativa con áreas de necrosis en las que había agrupaciones de organismos bacilares. Tras la escisión quirúrgica y la administración de eritromicina, los signos clínicos desaparecieron sin complicaciones (Bartolomé et al., 1995).

En 2006, se publicó el caso de una niña francesa de 12 años con una linfadenitis necrotizante por *C. pseudotuberculosis* (Join-Lambert et al., 2006). En este caso, la niña presentaba una adenopatía inguinal asociada a un leve exantema pruriginoso y fiebre (38° C), que ocurrió dos semanas después de regresar de las vacaciones de verano, en una zona rural de los Alpes franceses, donde estuvo en contacto con ovejas.

Atendiendo a estos casos, la infección por *C. pseudotuberculosis* debe considerarse en el diagnóstico diferencial de la linfadenitis granulomatosa localizada en humanos.

Más recientemente, en Noruega se ha publicado (Heggelund et al., 2015) un caso de neumonía por *C. pseudotuberculosis* en una estudiante de veterinaria, con evidencia de contagio durante un trabajo de laboratorio.

2.5. Importancia económica

La Linfadenitis caseosa tiene una distribución mundial y causa grandes pérdidas económicas a la industria ovina y caprina. En países Islámicos, como Egipto, donde el ganado ovino constituye una importante fuente de alimentación cárnica, la LC afecta a un 10% de la población de ovejas, habiéndose estimado pérdidas de 10 millones de Libras egipcias (lo que corresponde a 1,6 millones de Euros) anuales (Join-Lambert et al., 2006; Al-Gaabary et al., 2010). En Australia por un período de 2 años (1990-1992) los valores estimados de perdidas directamente imputadas a la infección por LC son superiores y están comprendidas entre los 28 millones y 37 millones de Euros (Windsor, 2011).

Sin embargo, al ser una enfermedad crónica y de comportamiento insidioso, los perjuicios económicos asociados son difíciles de cuantificar, si bien las pérdidas son constantes y las consecuencias a medio plazo en la explotación pueden ser graves.

La Pseudotuberculosis es una enfermedad insidiosa, lo que en sentido estricto significa que inicialmente no aparenta gravedad, pero con la evolución de la enfermedad y el desarrollo de signos clínicos se vuelve altamente peligrosa. Esta frase refleja exactamente lo que ocurre en un efectivo de pequeños rumiantes infectado con LC, los signos clínicos y sus consecuencias, inicialmente no son al inicio evidentes para el productor, pero la caída de la rentabilidad aumenta con el nivel de infección y la presencia de animales infectados, mayor riesgo de que la enfermedad evolucione hacia la forma visceral, con brotes o con cuadros clínicos graves de mastitis, neumonía, infertilidad, abortos, ... aumentando también la posibilidad de transmisión a los animales sanos.

Los daños causados por la enfermedad están relacionados con la disfunción de órganos, caída de la productividad, problemas reproductivos, mastitis, desecho de la piel, lana y vellón, decomiso de canales e incluso muerte de los animales (Alves et al., 2018). En la producción de lana, por ejemplo, fue posible verificar en estudios desarrollados en

Australia, que las ovejas producen aproximadamente un 5% menos de lana limpia en los años de mayor incidencia de infección (Paton, 2010).

El decomiso de canales en matadero de animales con LC parece estar más asociado con la presencia de abscesos que con la etiología del proceso. En estudios realizados en Argelia por Chikhaoui y Khoudja (2013), un 14.9% de las canales inspeccionadas mostraron lesiones compatibles con LC, aislándose *C. pseudotuberculosis* como agente único en el 53.6%; en los restantes casos se observó una infección mixta con *Staphylococcus aureus* y/o *Escherichia coli*.

En Portugal, el reglamento de inspección sanitaria en vigor (Reglamento (CE) nº 2017/625) establece que se decomisa cualquier parte de la canal con presencia de absceso o proceso purulento y, en el caso de un proceso piógeno generalizado o que alcance más de un órgano o tejido, la canal debe ser completamente retirada. Un trabajo realizado en un importante matadero portugués (Oviger – Alcains, sacrifica aproximadamente 100.000 ovejas al año) revela que los abscesos y pleuroneumonías purulentas son la segunda causa de decomiso total en ovinos adultos y la principal causa de decomiso total en canales de ovinos jóvenes (D'Avelar, 2011). Relativamente al decomiso de canales y su relación con la LC, otro estudio más reciente (Furtado, 2018) desarrollado en un matadero de la provincia de Alentejo, Portugal, verificó que las dos especies con más porcentaje de decomiso han sido precisamente los ovinos y caprinos y encontró en un total de 26829 ovinos y 3603 caprinos sacrificados, un porcentaje de decomiso de 0.35% en los ovinos y 0.44% en los caprinos. En este trabajo, la LC (por observación de linfadenitis purulenta generalizada al examen *post mortem*) ha sido responsable por 2% del decomiso total de canales y la causa principal de decomiso total ha sido la neumonía purulenta, esta con un porcentaje de 58.5% en ovinos y 56.2% en caprinos. Estos datos confirman la importancia de esta enfermedad, ligada a grandes pérdidas en el comercio de carne de pequeños rumiantes, en Portugal.

Otros estudios revelan la importancia de la LC en términos económicos en la producción de carne de oveja en España, como una importante causa de decomiso en matadero. En el trabajo de Ruiz et al. (2020) ochenta y cuatro de los 147 animales afectados por LC (57,14%) no mostraron ninguna enfermedad concurrente, considerando, en este caso, la LC como la principal causa de decomiso en matadero (84/498: 16,87%) (Ruiz et al., 2020).

Además de las pérdidas económicas directas, hay una pérdida del valor del rebaño, y un aumento del riesgo de padecer otro tipo de enfermedades respiratorias, tales como Pasterelosis, debido a la inmunodepresión local (Velasco y Fernández, 2007; Gómez-Gascón et al. 2013).

2.6. Patogenia

La LC se caracteriza por la formación de granulomas de naturaleza necrótico-purulenta en los nódulos linfáticos y en órganos internos con múltiples localizaciones (Pugh y Baird, 2012). La posibilidad de evolución de las lesiones para una consistencia caseosa justifica el nombre de Linfadenitis Caseosa dado a esta enfermedad. La LC visceral está considerada como una de las principales causas del llamado “síndrome de la oveja flaca” en Estados Unidos (Brown et al., 1987). En ocasiones, también se la ha denominado “Forunculosis cutánea” o “Apostema de los ovinos”, haciendo referencia a sus manifestaciones clínicas más frecuentes.

Aunque se están realizando notables avances, la patogenia de la enfermedad sigue siendo poco conocida (Aquino de Sá et al., 2013; Almeida et al., 2016).

Las investigaciones moleculares han verificado que a pesar de la similitud entre las cepas de *C. pseudotuberculosis*, algunas son más virulentas que otras, como la cepa VD57 (*Cp_VD 57*), identificada por De Souza y cols. (citado por Aquino de Sá et al., 2013; Almeida et al., 2016). Entre los genes que codifican los factores de virulencia, destaca el gen involucrado en la codificación de la fosfolipasa D (*PLD*), considerada el principal factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis*, la proteína de membrana integral (*integral membrane protein – FagA*), el transportador de hierro (*iron enterobactin transporter – FagB*), las proteínas de membrana citoplasmática ligadas al ATP (*ATP binding cytoplasmic membrane protein – FagC*) y las proteínas ligadas al hierro (*iron siderophore binding protein – FagD*). En los estudios realizados se detectaron estos factores de virulencia con mayor frecuencia en las muestras de *C. pseudotuberculosis* recogidas de las vísceras de animales con LC (Aquino de Sá et al., 2013), indicando una naturaleza multifactorial de la enfermedad, así como una variación en el potencial invasivo de las diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis*.

La fosfolipasa D es una exotoxina (31,5-KDa) específica de *C. pseudotuberculosis*, responsable de la lisis de la esfingomielina (fosfolípido de la pared celular) en fosfato y colina, lo que origina la salida de plasma desde el interior de los vasos sanguíneos hacia el interior de los linfonodos por aumento de la permeabilidad vascular (Aquino de Sá et al., 2013; Smith, 2015; Mahmood et al., 2016). Se cree que esta enzima actúa de forma similar al veneno de la araña *Loxosceles reclusa* (o “araña solitaria parda de América del Norte”), que provoca hemólisis y produce hemosiderina en los tejidos linfáticos, causando dermonecrosis, fallo renal y agregación plaquetaria (Mahmood et al., 2015). La fosfolipasa D produce, además, destrucción de los macrófagos en la infección de caprinos e inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos en ovinos y provoca la muerte de las células fagocitarias, acciones que contribuyen a la diseminación del agente desde el punto de infección a otras partes del organismo (Pepin et al., 1994; Muckle y Gyles, 1986; Brogden y Engen, 1990; Tashjian y Campbell, 1983; Guimarães et al., 2011 citados por Mahmood et al., 2016).

Gracias al elevado contenido de ácidos micólicos en la superficie de la pared celular, *C. pseudotuberculosis* puede resistir la acción fagocitaria del sistema inmunitario, dando lugar a la formación de piogranulomas, cuyo fin es bloquear los macrófagos infectados y evitar la diseminación de la infección (Zavoshti et al., 2012; Latif et al., 2016; Odhah et al., 2019) (Fig. 10, 11, y 12). Estos microabscesos son la principal característica histopatológica de la Linfadenitis caseosa en ovejas (Mahmood et al., 2015) (Fig. 13).

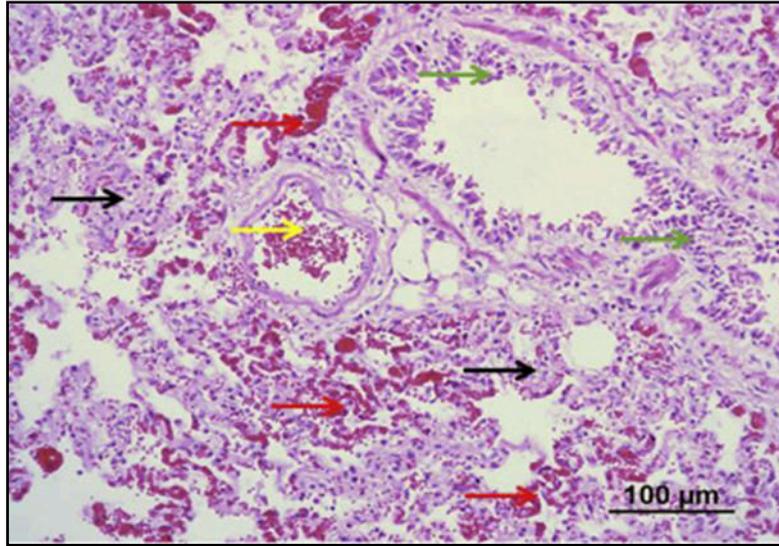


Figura 10: Imagen histopatológica del pulmón con infección por *C. pseudotuberculosis* con extensas áreas de hemorragia pulmonar (flechas rojas) y congestión vascular (flecha amarilla) con engrosamiento del intersticio por infiltración leucocítica (flechas negras). También se observa la descamación del epitelio bronquiolar (flechas verdes), H&E x 100 (Odhah et al., 2019).

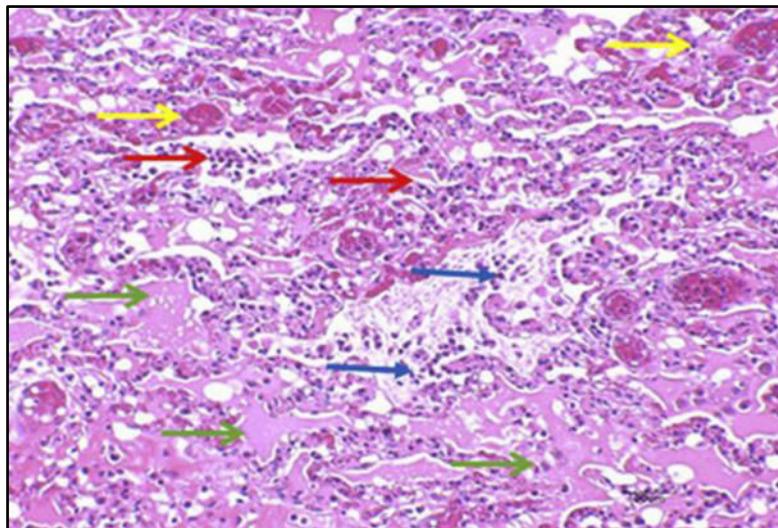


Figura 11: Pulmón con infección por *C. pseudotuberculosis* con áreas extensas de edema pulmonar (flechas verdes) y congestión vascular (flechas amarillas) con infiltración de células fibrosas e inflamatorias (flecha azul), también infiltración leucocítica difusa (flechas rojas) en el intersticio. H&E x 100 (Odhah et al., 2019).

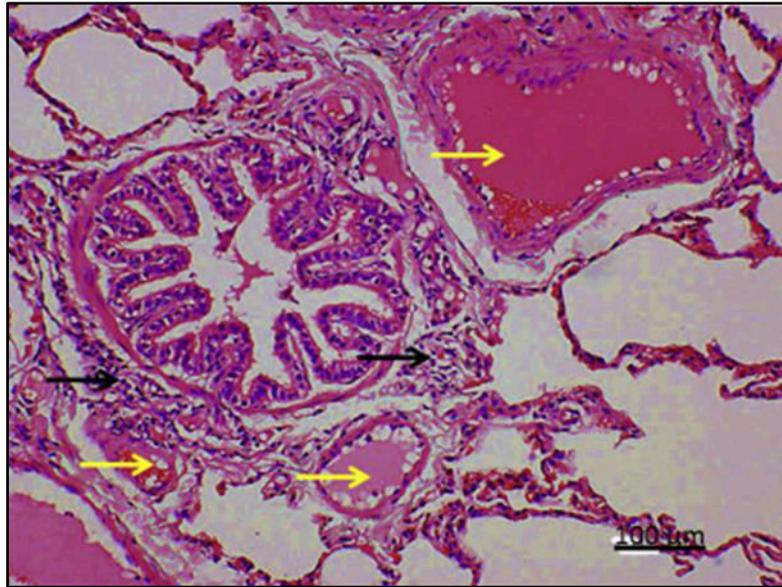


Figura 12: Pulmón con infección por *C. pseudotuberculosis* (ácido micólico) que muestra congestión vascular (flechas amarillas) con infiltración linfocítica peri-bronquiolar multifocal (flechas negras), H&E x 100 (Odhah et al., 2019).

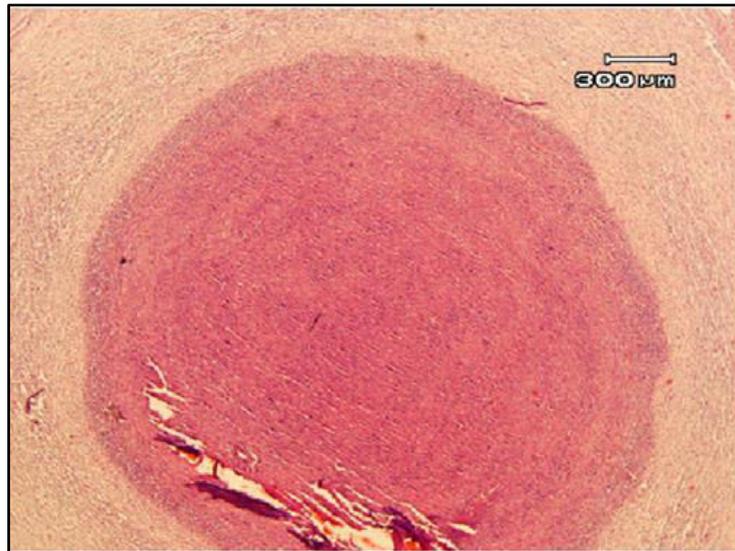


Figura 13: Vista microscópica del nódulo linfático preescapular infectado con *C. pseudotuberculosis*, H&E x 40 (Zavoshti et al., 2012).

Los abscesos suelen formarse en el 60-80% de los linfonodos infectados. La formación de una cápsula facilita la persistencia del microorganismo en el animal y, por tanto, la inmunidad celular es más importante que la inmunidad humoral en el combate contra la LC (Prescott et al., 2002). Una característica de la infección por *C. pseudotuberculosis* es

la posibilidad de reactivación del microorganismo en los abscesos antiguos con la reaparición de signos clínicos en el animal.

El papel de la DT (*diphtheria toxin*) en la LC, la OSD (*Oedematous skin disease*) y otras enfermedades causadas por *C. pseudotuberculosis* en animales, no ha sido suficientemente estudiado (Torres et al., 2013).

2.7. Patología

La LC presenta un largo período de incubación, que oscila entre los 25 y los 140 días (Smith, 2015; Akgul y cols., 2018). Se considera una enfermedad crónica y recurrente, durante la cual los animales infectados pueden no evidenciar signos clínicos hasta que la enfermedad está muy avanzada (Mahmood et al., 2015).

Su cuadro patológico principal se caracteriza por la formación de piogranulonas en los nódulos linfáticos superficiales, sobre todo mandibulares (Fig. 14) y preescapulares, debido a la vía de entrada de la bacteria, el tipo de pastoreo, el tatuaje del pabellón auricular, la administración de medicamentos inyectables por vía subcutánea en la zona preescapular y el esquilado (Zavoshti et al., 2012; Chikhaoui y Khoudja, 2013; Gómez-Gascón et al., 2013; Costa, 2016; Primera et al., 2016). La afectación del nódulo supramamario es rara (Andrade et al., 2012; Zavoshti et al., 2012).



Figura 14: Absceso superficial localizado en el nódulo linfático mandibular que, al drenar, sale un pus espeso y de olor fétido (ovino macho de una explotación de aptitud cárnica en la región de estudio, 2014) (Costa, 2016).

Desde los nódulos superficiales se puede producir la diseminación del microorganismo por intermedio del sistema linfático y circulatorio a los nódulos linfáticos internos, con la formación de abscesos en pulmones, riñones, hígado, bazo y aparato reproductor (Binns et al., 2007; Dercksen et al., 2000; Fontaine y Baird, 2008; Pugh y Baird, 2012; Zavoshti et al., 2012).

De esta forma, la LC puede presentar tres formas clínicas distintas:

“**Adenítica superficial**” que suele aparecer cuando la vía de entrada es la cutánea, notándose focos piógenos bajo la piel y asociados a un nódulo linfático subcutáneo que, con el transcurso de las semanas, el contenido del nódulo se vuelve más pastoso. A la palpación, el nódulo aparece blando, fluctuante e indoloro, hasta que, aparece una fístula de la que drena un pus cremoso de color amarillo-verdoso y olor nauseabundo (Pugh y Baird, 2012) (Fig. 14). Estas lesiones también se pueden presentar como abscesos organizados rodeados de una cápsula fibrosa y con pérdida de pelo alrededor (Fontaine y Baird, 2008).

Posterior a la descarga purulenta, se instaura un proceso de cicatrización que deja como secuela cutánea un área depilada que tarda varios meses en cubrirse de nuevo con lana (Fig. 15), pudiendo coincidir en el mismo animal adenitis activas y lesiones cicatriciales o bien la forma visceral (Fontaine y Baird, 2008).



Figura 15: Absceso en el nódulo linfático parotídeo por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Malone et al., 2006).

“**Adenítica visceral**” asociada a la vía respiratoria y/o digestiva, o la diseminación a partir de una adenopatía superficial. En esta forma, las lesiones piogranulomatosas se presentan como microabscesos y abscesos en los nódulos linfáticos internos (Fig. 19a) y las vísceras, siendo la principal localización el parénquima pulmonar (Fig. 16, 17, 18 y 19b, 19c, 19d y 19e) y los nódulos linfáticos mediastínicos (Fig. 18a e 18b) (Malone et al., 2006; Velasco y Fernández, 2007; Fontaine y Baird, 2008; Gómez-Gascón et al., 2013; Costa, 2016). Otras localizaciones descritas son hígado, bazo, riñones, ubres y, de forma menos frecuente, corazón, testículos, escroto, útero, articulaciones, cerebro y médula espinal (Pugh y Baird, 2012; Gómez-Gascón et al., 2013; Latif et al., 2015; Costa, 2016; Latif et al., 2016; Mahmood et al., 2016). Los signos clínicos suelen ser imperceptibles (subclínica), los animales se mantienen en la explotación con baja producción (carne, leche, lana) y el curso, crónico, puede desembocar en la forma “caquectizante”.



Figura 16: Microabscesos pulmonares y neumonía exudativa / purulenta en caprino por *C. pseudotuberculosis* (Costa, 2016).

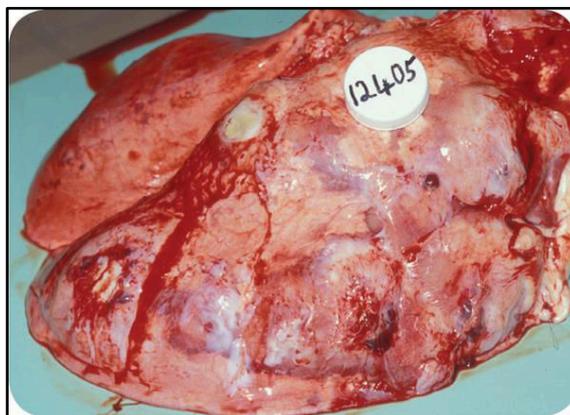


Figura 17: Abscesos en pulmones ovinos por *C. pseudotuberculosis* (Malone et al., 2006).

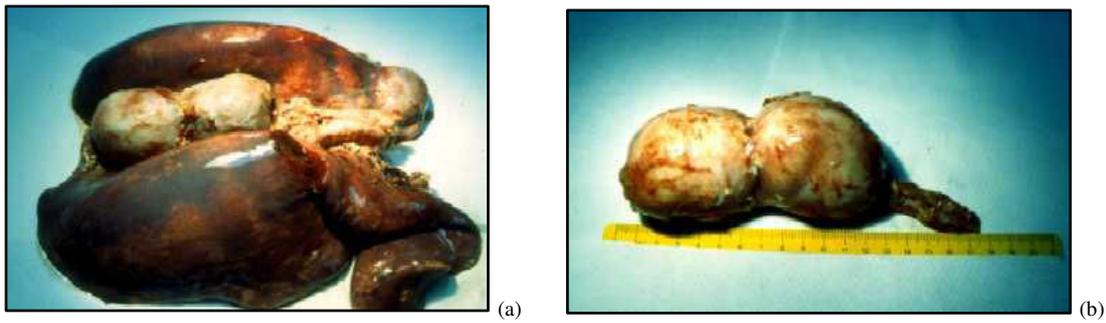


Figura 18: Linfadenitis mediastínica purulenta (a) y cadena ganglionar mediastínica afectada (b) (Velasco y Fernández, 2007).

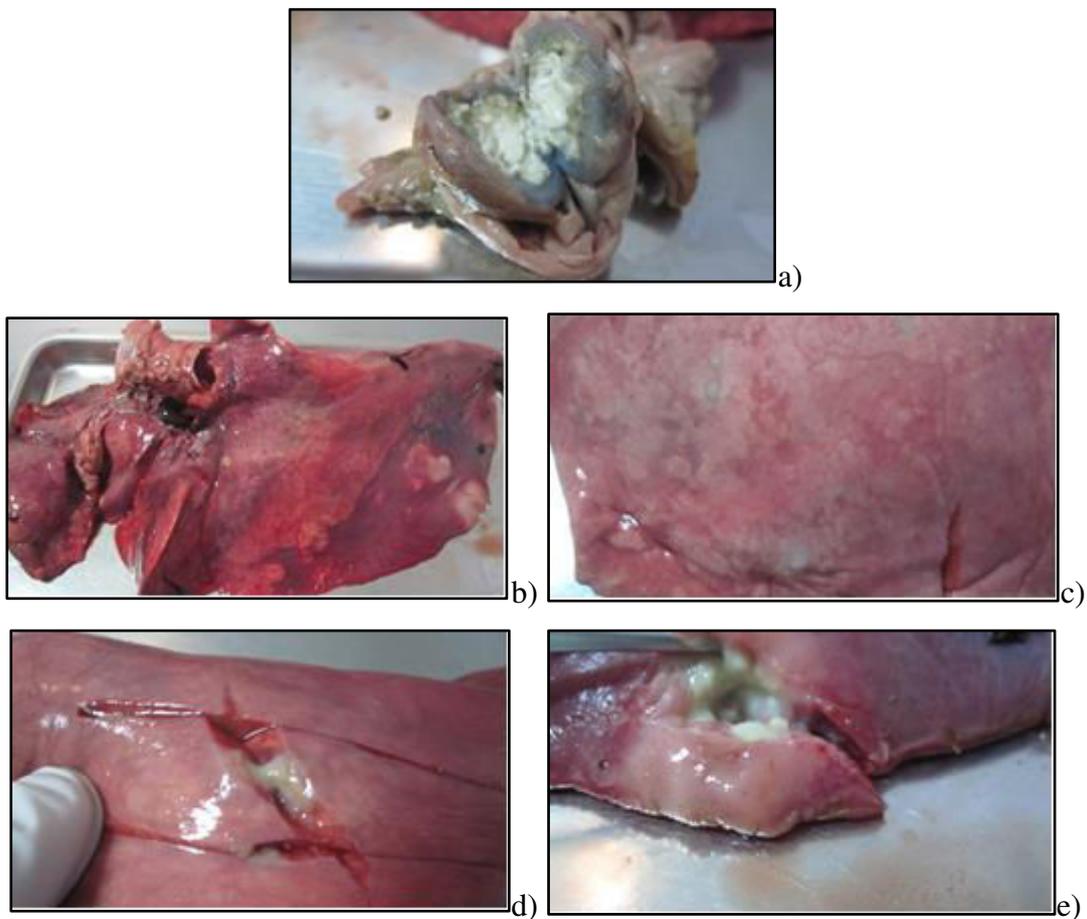


Figura 19: Lesiones *post-mortem* de un ovino infectado con *C. pseudotuberculosis*: (a) Absceso bien encapsulado en un ganglio mesentérico; (b) Neumonía exudativa; (c) Microabscesos pulmonares; (d) Corte del parénquima pulmonar con salida de material purulento espeso; (e) Absceso pulmonar encapsulado. (Caso clínico en una explotación de la región en estudio - febrero 2016) (Costa, 2016).

Estudios recientes demuestran que *C. pseudotuberculosis* está presente como agente etiológico en un 7% de las mastitis en pequeños rumiantes, debiendo ser considerado en el examen bacteriológico de leche (Nabih et al., 2018). La mastitis por *Corynebacterium*

se caracteriza por la formación de nódulos y abscesos en la superficie de la mama (Fig. 20a). Estos abscesos espesos, al romper, dejan fluir un pus espeso, de coloración verdosa y olor nauseabundo (Fig. 20b). La condición general del animal no queda comprometida (Ermini y Antenucci, 2014).

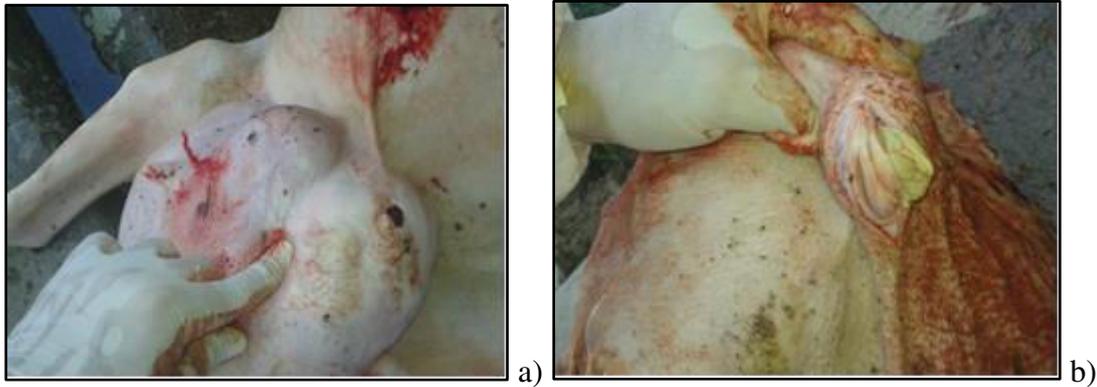


Figura 20: Imagen (de necropsia) recogida en un brote de mamitis por *C. pseudotuberculosis* diagnosticado en 2015 en un efectivo ovino de una explotación lechera, en la región en estudio. (a): Nódulos evidentes y palpables en la superficie de la ubre; (b): Al corte, la salida de pus espeso y de color amarillo verdoso (Costa, 2016)

Forma “**caquetizante**”: es una enfermedad insidiosa que comienza lentamente y sin síntomas obvios, pasando varios meses sin identificar un animal enfermo. La clínica es muy inespecífica y variable dependiendo del órgano afectado (pérdida de peso, debilidad, alteraciones hemáticas, a veces edematización subcutánea en las regiones pectoral y abdominal) (Pugh y Baird, 2012) (Fig. 21a e 21b).



Figura 21: (a) e (b) Forma clínica caquetizante (visceral) (Costa, 2016).

El cuadro clínico depende de la vía de contagio, el avance de la enfermedad y el hospedador infectado, con notables diferencias entre caprino y ovino, y entre éstos y bovinos y caballos. Así, en los pequeños rumiantes podemos encontrar ambas formas, cutánea y visceral; en bovinos la forma visceral es rara, mientras que en caballos se presenta con frecuencia.

Para comprender mejor la clínica de esta infección en los diferentes hospedadores y cómo se relaciona la plasticidad del genoma con los patrones de síntomas, Soares et al. (2013) realizaron un análisis del pan-genoma de 15 cepas de *C. pseudotuberculosis* (Tabla 5) de diferentes orígenes y biotipos, siendo evidente que existen diferencias a nivel de cepas en los genomas y factores de virulencia. Por ejemplo, el biotipo *ovis* presentó una secuencia constante de genes para la polimerización de estructuras *pilis* importantes en la adhesión e invasión celular, y responsables de la mayor capacidad de estas cepas para invadir el organismo y multiplicarse intracelularmente.

Tabla 5: Análisis de pan-genoma de 15 cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Soares y cols., 2013).

Strains	Biovar	Host	Country of isolation	Clinical description	Genome size	Number of genes	Singletons	GenBank accession N°	Reference
1002	<i>ovis</i>	Goat	Brazil	CLA abscess	2,335,113	2,203	0	CP001809	[43]
C231	<i>ovis</i>	Sheep	Australia	CLA abscess	2,328,208	2,204	3	CP001829	[43]
42/02-A	<i>ovis</i>	Sheep	Australia	CLA abscess	2,337,606	2,164	5	CP003062	[49]
PAT10	<i>ovis</i>	Sheep	Argentina	Lung abscess	2,335,323	2,200	1	CP002924	[50]
3/99-5	<i>ovis</i>	Sheep	Scotland	CLA	2,337,938	2,239	39	CP003152	[49]
267	<i>ovis</i>	Llama	USA	CLA abscess	2,337,628	2,249	8	CP003407	[51]
P54B96	<i>ovis</i>	Antelope	South Africa	CLA abscess	2,337,657	2,205	2	CP003385	–
119	<i>ovis</i>	Cow	Israel	Bovine mastitis abscess	2,337,730	2,213	0	CP002251	[52]
FRC41	<i>ovis</i>	Human	France	Necrotizing lymphadenitis	2,337,913	2,171	12	CP002097	[46]
CIP52.97	<i>equi</i>	Horse	Kenya	Ulcerative lymphangitis	2,320,595	2,194	30	CP003061	[53]
316	<i>equi</i>	Horse	USA	Abscess	2,310,415	2,234	25	CP003077	[54,55]
258	<i>equi</i>	Horse	Belgium	Ulcerative lymphangitis	2,314,404	2,195	29	CP003540	[56]
1/06-A	<i>equi</i>	Horse	USA	Abscess	2,279,118	2,127	20	CP003082	[57]
Cp162	<i>equi</i>	Camel	UK	Neck abscess	2,293,464	2,150	13	CP003652	[58]
31	<i>equi</i>	Buffalo	Egypt	Abscess	2,297,010	2,170	50	CP003421	[59]

Recientemente, se ha reportado la capacidad de *C. pseudotuberculosis* de inducir trastornos reproductivos en hembras y machos de la especie caprina (Latif et al., 2015; Latif et al., 2016; Mahmood et al., 2016). El aislamiento de la bacteria a partir de los órganos reproductivos (vagina, cérvix, útero, cuernos uterinos, ovarios, nódulos linfáticos ilíacos, escroto y testículos) se produjo 60 días después de la infección experimental (Latif

et al., 2015). La severidad de las lesiones dependió del tiempo de infección (“*time dependent effect*”), lo que refuerza la necesidad de llevar a cabo un diagnóstico precoz para prevenir la infertilidad y el aborto en los rebaños de cabras. Otros estudios han confirmado que la infección bacteriana de los ovarios afecta a la producción de progesterona, crucial para la implantación del embrión y el mantenimiento de la gestación, lo que puede conducir al aborto precoz e infertilidad (Othman et al., 2014 citado por Latif et al., 2016).

Por su parte, las investigaciones desarrolladas en chivos han dado a conocer que *C. pseudotuberculosis* y la toxina fosfolipasa D afectan a la fertilidad de los machos, causando una reducción de la concentración de testosterona, de la circunferencia escrotal y de la calidad del semen en reproductores (Mahmood et al., 2016). Estos datos indican que la presencia de LC conduce a infertilidad y aborto, con grandes pérdidas económicas para la explotación.

La **lesión típica** de la enfermedad se caracteriza por un estrato de capas de material purulento rodeado por tejido conectivo, bien definidas y concéntricas, que dan lugar a la figura de “ganglio en cebolla” (Velasco y Fernández, 2007; Baird y Fontaine, 2007) (Fig. 22a, 22b y 23). Esta lesión, patognomónica de LC, es frecuente en ovejas y rara en caprinos (Pugh y Baird, 2012; Mahmood et al., 2015).

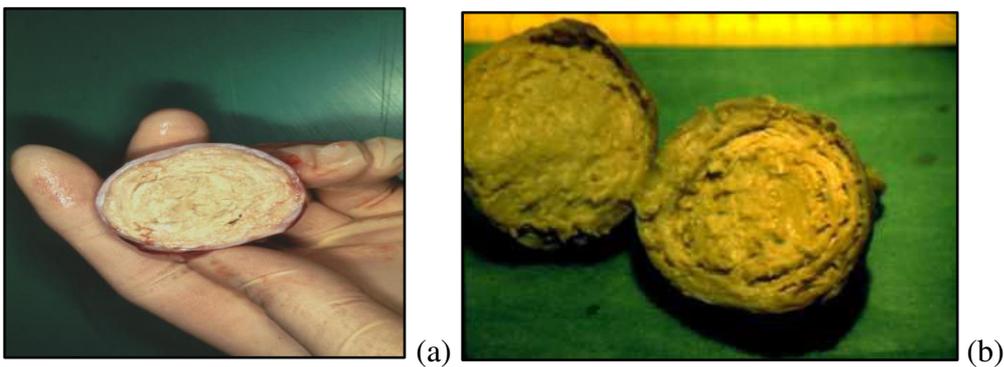


Figura 22: “Ganglio en forma de cebolla” (a) e (b) (Velasco y Fernández, 2007).

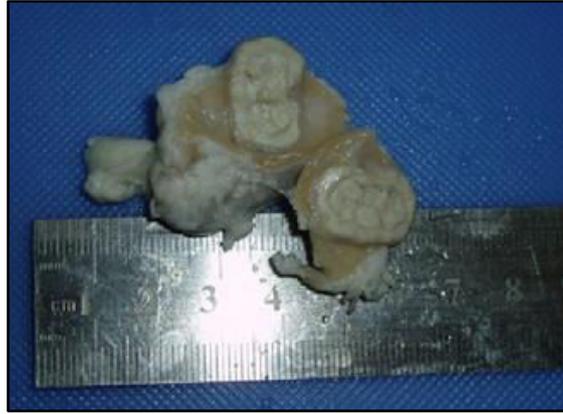


Figura 23: Nódulo linfático preescapular de una oveja infectada por *C. pseudotuberculosis*, que muestra los gritos centrípetos de exudado. Se puede visualizar una cápsula de tejido conectivo alrededor del exudado (Velasco y Fernández, 2007).

Las alteraciones patológicas de la LC han sido bien estudiadas por Mahmood y cols., (2015), con la inoculación experimental del *C. pseudotuberculosis* y de la fosfolipasa D en caprinos. En esta investigación los animales infectados por *C. pseudotuberculosis* presentaron aumento de la temperatura corporal, de la frecuencia cardíaca y respiratoria, alteraciones en la condición corporal y formación de abscesos en el lugar de inoculación, con descarga purulenta, dos semanas después de la misma. Sin embargo, los animales mantuvieron el apetito normal y un nivel constante de consumo de alimento (Mahmood et al., 2015). Con respecto a las alteraciones histopatológicas, los animales mostraron edema, congestión del córtex y médula de los linfonodos afectados, infiltración por células inflamatorias, principalmente linfocitos y macrófagos, hemorragia, degeneración y necrosis del tejido linfático y la presencia de micro focos con formación de abscesos y reducción de los folículos linfoides.

El aislamiento del *C. pseudotuberculosis* en **bovinos** se ha descrito en coinfección con otros agentes bacterianos primarios (*Escherichia coli* y *Arcanobacter pyogenes*) considerándose un oportunista, que al estar presente en lesiones viscerales (principalmente, pulmón) en forma de piogranulomas ha favorecido la virulencia de los agentes bacterianos primarios y el aumento de resistencia antibiótica (Costa, 2016). En esta especie los abscesos abiertos y las dermatitis ulcerativas piogranulomatosas son las principales formas de presentación de la enfermedad, aunque la mastitis, con excreción de la bacteria en la leche, también suele aparecer (Peel et al., 1996). Los estudios realizados por Rocha (2011) en California, donde la enfermedad es endémica,

demonstraron que los casos de LC en bovino de leche presentan una frecuencia de granjas positivas del 10%. La forma diseminada es rara en bovinos (Rocha, 2011).

La infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en **equinos** está mundialmente extendida (Guedes et al., 2015) dando lugar a cuadros clínicos, a menudo poco específicos y que suelen ser confundidos con otras patologías. El diagnóstico diferencial se debe hacer en caso de sospechas de muermo, dermatofitosis, celulitis estafilocócica, infecciones por *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Corynebacterium pyogenes* y *Rhodococcus equi* (Yeruham et al., 1996, Motta et al., 2010 citados por Guedes et al., 2015). La enfermedad en los equinos tiene también carácter crónico, con una forma clásica conocida por Linfangitis ulcerativa o absceso del pecho, o como Fiebre de la paloma (“*Pigeon fever*”). Ésta es la forma más grave por tener un carácter sistémico; la letalidad en los animales que no reciben tratamiento es del 100% (Aleman et al., 1996 citado por Guedes et al., 2015). No obstante, la enfermedad puede ser también asintomática o cursar con abscesos externos.

En **rumiantes salvajes** la enfermedad presenta manifestaciones muy semejantes a las lesiones descritas en pequeños rumiantes y estudios recientes describen una patología grave con la forma adenítica visceral y afección importante del pulmón, sistema nervioso y aparato reproductor (Fig. 24) (Domenis et al., 2018).

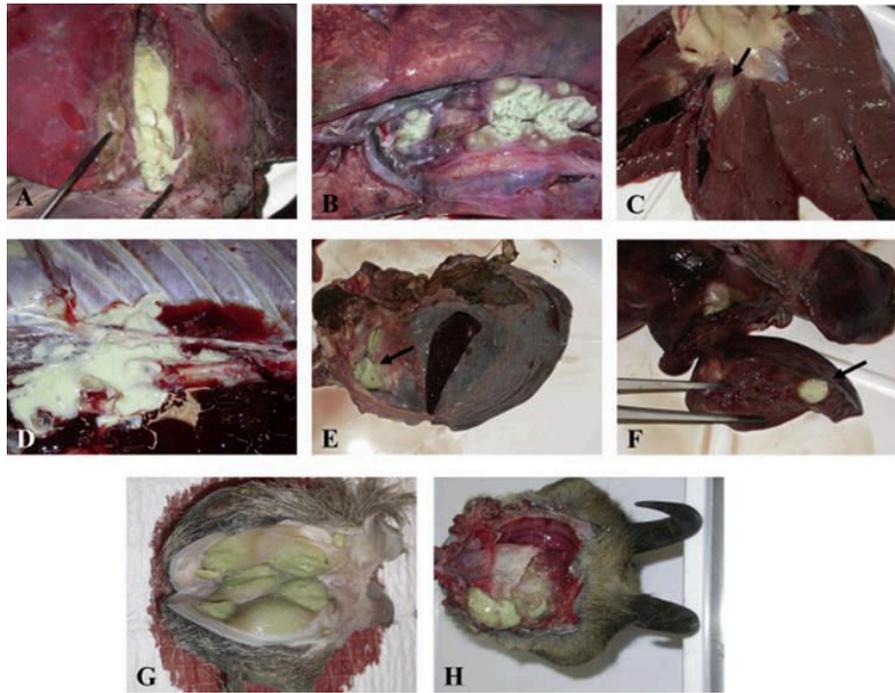


Figura 24: Abscesos de órganos de gamuza infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*. (A) Pulmón, (B) ganglios linfáticos mediastínicos, (C) corazón, (D) vértebras torácicas, (E) bazo, (F) hígado, (G) testículo y (H) cerebro. Obsérvese el típico pus de color amarillo verdoso, de cremoso a caseoso, que tiende a licuarse, sin una apariencia laminada de "anillo de cebolla" (solo se observa parcialmente en [B]) (Domenis et al., 2018).

2.8. Diagnóstico diferencial

La linfadenitis caseosa es una enfermedad contagiosa crónica tan común en ovejas y cabras que cualquier presentación de abscesos y nódulos linfáticos drenantes debe suponerse que se trata de LC hasta que se demuestre lo contrario (Underwood et al., 2015) y la investigación debe seguir siempre en busca de agentes piógenos.

Las lesiones piogranulomatosas son comunes en enfermedades como la Actinobacilosis, la Tuberculosis y los abscesos superficiales causados por *Staphylococcus aureus* y *Actinomyces pyogenes*. Debemos recordar, además, que otros agentes piógenos pueden estar presentes en las lesiones de LC (*S. aureus*, *Trueperella pyogenes* y *Pasteurella multocida*) (Guimarães et al., 2011b; Pugh y Baird, 2012; Gascoigne et al., 2020).

La forma cutánea de la enfermedad debería diferenciarse del edema submandibular causado por parásitos como, *Fasciola hepatica* y *Haemonchus* spp., de los quistes

salivales, el linfosarcoma y la inoculación subcutánea de vacunas, principalmente las reacciones en el local de inyección de la vacuna contra clostridios (Delano et al., 2002; Underwood et al., 2015; Gascoigne et al., 2020).

En caso de neumonía, se debe realizar el diagnóstico diferencial con *Mycobacterium bovis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y la neumonía progresiva ovina por el virus Maedi-Visna (Pugh y Baird, 2012).

La forma caquetizante es clínicamente similar al parasitismo crónico, y el adelgazamiento extremo se puede observar también por pérdida anormal de dientes, periodontitis alveolar y desnutrición, y en enfermedades crónicas como la adenomatosis pulmonar, neoplasias y *Scrapie*. Esta enfermedad produce emaciación y debilidad en los animales y debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de los llamados "Síndrome de la oveja flaca", especialmente cuando las ovejas se ven afectadas por la presentación visceral de la enfermedad (Ruiz et al., 2020).

En ovinos, *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis* y *Pasteurella* spp. pueden producir orquitis y epididimitis similares a las causadas por *C. pseudotuberculosis* (Guimarães et al., 2011b).

El diagnóstico definitivo de la LC implica siempre la identificación del agente etiológico a partir de muestras de material purulento u órganos afectados (Gómez-Gascón et al., 2013; Costa, 2016).

2.9. Diagnóstico laboratorial

No existe ninguna prueba de diagnóstico capaz de identificar todos los casos, ni diferentes etapas o formas de la enfermedad (Oreiby, 2014) y actualmente se considera que no hay pruebas confiables disponibles para diagnosticar todos los casos de LC (Farias et al., 2020). Por ello, el diagnóstico de la LC se realiza en base a las características epidemiológicas, la clínica de la enfermedad, la observación de lesiones y/o la identificación del agente en el material purulento obtenido de los abscesos (Gómez-Gascón et al., 2013; Huerta et al., 2013; Kumar et al., 2013).

Los casos sin manifestación clínica aparente (portadores asintomáticos) se evidencian exclusivamente cuando el animal es sacrificado, lo que dificulta la obtención de datos para estudios de prevalencia de la enfermedad. En estos casos, el diagnóstico serológico es de gran importancia para su detección, al representar una potencial fuente de infección para los animales sanos del rebaño (Kaba et al., 2001; Gómez-Gascón et al., 2013). Aunque se han mejorado y validado diversas pruebas ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para la identificación de portadores asintomáticos, el diagnóstico definitivo de la LC continúa siendo el aislamiento e identificación del agente etiológico mediante cultivo bacteriológico, pruebas bioquímicas y/o pruebas de diagnóstico molecular, como la PCR (Pavan et al., 2012; Gómez-Gascón et al., 2013; Huerta et al., 2013; Kumar et al., 2013; Costa, 2016).

Los factores de virulencia están directamente relacionados con la patogenicidad de la bacteria, por lo que sus genes representan *targets* ideales para la detección e identificación específica de muchos agentes bacterianos (Kumar et al., 2013; Dorneles et al., 2014). En el genoma de *C. Pseudotuberculosis* se han identificado siete islas de patogenicidad (*Pathogenicity islands – PAIs*) que contienen diversos factores de virulencia clásicos detectables mediante PCR, incluyendo los genes para *putative oligopeptide/dipeptide ABC transporter*, NADP (*nicotinamide adenine dinucleotide fosfato*), coenzima oxidoreductase F-420-dependiente y *proline iminopeptidase* (PIP) (Kumar et al., 2013).

Los métodos de **tipificación molecular** utilizados en la caracterización de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis*, además de útiles, presentan grandes ventajas sobre los métodos tradicionales utilizados para determinar la toxigenicidad de las cepas de *Corynebacterium* spp. (Torres et al., 2013; Dorneles et al., 2014). Las recientes técnicas de genotipado y PCR múltiple específica de especie (*species-specific mPCR*) han facilitado no solo la identificación de diferentes cepas y biotipos del agente, sino también la posibilidad de su utilización en investigaciones epidemiológicas (Soares et al., 2013; Almeida et al., 2014; Dorneles et al., 2014). Entre las ventajas de la *mPCR* sobre los procedimientos bioquímicos convencionales, destacan su rapidez, facilidad de realización, el gran número de cepas que pueden ser analizadas a la vez y la facilidad de interpretación de los resultados (Torres et al., 2013). La especificidad de la PCR para la identificación de *C. pseudotuberculosis* se considera probada en base a la homología (98-100%) de los productos amplificados con las secuencias publicadas en la base de datos

del NCBI para el ADN del segmento 16s-ARN de esta bacteria (Kumar y cols., 2013). Por su parte, la comparación de la PCR con el patrón oro (cultivo + pruebas bioquímicas) ha demostrado una sensibilidad diagnóstica del 94,6% en la detección de esta bacteria a partir de muestras de pus. En cuanto a la sensibilidad analítica, la PCR es capaz de detectar ADN bacteriano en concentraciones de 10 a 0,001 ng por reacción (Pacheco et al., 2007).

En base a ello, muchos autores la utilizan como prueba de referencia para confirmar la infección a partir de abscesos, si bien señalan como desventajas el tiempo y coste de ejecución, y una posible limitación en la purificación y secuenciación del ADN como consecuencia de la naturaleza purulenta de las lesiones patológicas y la alta concentración de desechos celulares (Pacheco et al., 2007; Andrade et al., 2012; Ilhan, 2013). Para minimizar el efecto de los inhibidores enzimáticos, Pacheco et al. (2007) propusieron la dilución de la muestra de ADN antes de la amplificación.

Aun existiendo diversas pruebas de **serodiagnóstico** para la detección de anticuerpos de *C. pseudotuberculosis* en ovejas, como ensayos de interferón-gamma, la inhibición de la hemólisis, la inhibición de anti-hemolisina, la hemaglutinación indirecta, pruebas de fijación del complemento, inmunodifusión y ELISAs, ninguna es completamente efectiva (Prescott et al., 2002; Menzis et al., 2004; Binns et al., 2007; Gómez-Gascón et al., 2013; Hoelzle et al., 2013).

En el caso del ELISA, se han utilizado diferentes preparaciones antigénicas, incluyendo antígenos de la pared celular, exotoxina (phospholipasa D), sobrenadante celular y exotoxina recombinante (Menzis et al., 2004; Binns y cols., 2007). La validez de la prueba ha resultado ser adecuada en cabras (especificidad $98 \pm 1\%$ y sensibilidad de $94 \pm 3\%$) y moderada en ovejas (especificidad $99 \pm 1\%$ y sensibilidad $71-79 \pm 5\%$), principalmente en animales con infección subclínica o que solo presentan abscesos internos (Dercksen et al., 2000; Kaba et al., 2001; Binns et al., 2007). La especificidad, comparada con el cultivo bacteriológico, es variable, debido posiblemente a variaciones antigénicas entre las cepas que afectan a ambas especies, reacciones cruzadas con otras bacterianas (*Corynebacterium* spp., *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*), o a la persistencia de los anticuerpos maternos y de inmunidad natural en los animales recuperados (negativos al cultivo) (Binns et al., 2007; Hoelzle et al., 2013; Gómez-Gascón et al., 2013). Estudios previos para validar un ELISA indirecto en muestras de suero de ovejas con signos clínicos de LC mostraron una sensibilidad y

especificidad próximas al 100% respecto al cultivo bacteriológico y la PCR realizadas a partir de nódulos linfáticos y pulmones (Nassar et al., 2014).

De esta forma, el principal problema en el diagnóstico de la LC es la identificación de los animales afectados con la forma visceral y sin signos clínicos perceptibles, lo que favorece la dispersión y diseminación de la enfermedad. Recientemente, se han desarrollado otros métodos de diagnóstico para la detección de estas formas de LC, basados en el control de parámetros clínicos indicativos de infección por *C. pseudotuberculosis*. La monitorización de las proteínas séricas de fase aguda (*acute phase proteins*) muestra alteraciones significativas en los niveles séricos de haptoglobina, proteína C-reactiva, procalcitonina y albumina, en cabras infectadas con *C. pseudotuberculosis*, comparado con el grupo control (Akgul et al., 2018).

2.10. Tratamiento y prevención

Considerando la prevalencia actual de la LC en todo el mundo, existe una necesidad urgente de alternativas más eficientes para el control de la enfermedad, que incluyan la aplicación de tratamiento a los animales infectados, la administración de vacunas a los rebaños en riesgo y la identificación de portadores asintomáticos (Aquino de Sá et al., 2013; Gómez-Gascón et al. 2013).

Aun siendo sensible *in vitro* a la mayoría de los antimicrobianos, el **tratamiento** de la Pseudotuberculosis suele ser poco efectivo debido a que la cápsula externa de los abscesos impide la penetración de los antibióticos hasta el microorganismo (Velasco y Fernández, 2002; Gómez-Gascón et al., 2013).

El drenaje quirúrgico de los piogranulomas se recomienda sólo en los animales de elevado valor genético y reproductores seleccionados, en granjas de cría o centros de selección y reproducción de razas. Cada caso debe ser analizado individualmente y debe considerarse la escisión quirúrgica de los abscesos siempre que esté justificado, cumpliendo con todas las normas de higiene y desinfección que garanticen la protección del rebaño de la contaminación por *C. pseudotuberculosis* (Andrade et al., 2012). Lo importante es la apertura y drenaje temprano de los abscesos superficiales y nunca permitir que drenen por sí solos, asegurando el destino apropiado del contenido. En el

estudio de Andrade et al. (2012) sobre la ocurrencia de factores de riesgo asociados a la infección por *C. pseudotuberculosis* en caprinos y ovinos, desarrollado en Brasil, se verificó un aumento en la incidencia de la enfermedad en las explotaciones en que los productores dejan que los abscesos se rompan naturalmente.

A pesar del drenaje quirúrgico y el tratamiento antimicrobiano, la infección por *C. pseudotuberculosis* tiene a menudo una duración prolongada y un curso recurrente. La ausencia de efectividad de los antibióticos puede explicar en parte las recaídas que se observan durante el tratamiento de la LC, así como la tolerancia bacteriana a los betalactámicos que se ha descrito para *C. pseudotuberculosis* y otros patógenos Gram positivos, como *Corynebacterium diphtheriae* y *Listeria monocytogenes* (Join-Lambert et al., 2006).

Numerosos estudios realizados en todo el mundo sobre el control de la LC son unánimes en la importancia de la **detección de animales portadores asintomáticos**, con programas de control y/o erradicación, a pequeña y gran escala, para la prevención de la dispersión de la enfermedad (Derckeson et al., 2000; Kaba et al., 2001).

Actualmente, las mejores estrategias para el control de la LC en ovejas incluyen la erradicación de la infección mediante la identificación por ELISA y la retirada de los animales portadores, o bien la inmunización de los animales susceptibles, junto con el diagnóstico precoz y el sacrificio de los animales positivos (Kumar et al., 2013). Sin embargo, la dificultad de identificar precozmente a los animales infectados, sumado a las altas prevalencias de la enfermedad, la resistencia de los ganaderos al sacrificio voluntario, y la inexistencia de vacunas que ofrezca una protección completa frente a la infección, supone una gran dificultad para el control y erradicación de la enfermedad (Prescott et al., 2002; Gómez-Gascón et al., 2013).

La **inmunización activa** ha reducido en muchos casos, la aparición de casos clínicos (60%-95%) (Paton et al., 1995 citados por Mendonça, 2012; Piontkowsky y Shivvers, 1998 citados por Smith, 2015) y evita que los animales infectados liberen progresivamente el agente al exterior, lo que conlleva una disminución gradual del número de nuevos casos y por tanto de la incidencia de la enfermedad (Gómez-Gascón et al., 2013; Windsor, 2014; Smith, 2015). Sin embargo, los estudios experimentales realizados hasta la fecha con diferentes tipos vacunales (vacunas de ADN, vacunas de

subunidades, bacterinas con una exotoxina de *C. pseudotuberculosis*, la fosfolipasa D) no han demostrado protección completa y sus resultados son variables. En muchos casos, además, la administración de las vacunas disponibles es ineficiente (Paton, 2010; Gómez-Gascón et al., 2013). Así, en Estados Unidos, la recomendación es que la vacunación sea opcional dependiendo de la historia de la explotación (Gómez-Gascón et al., 2013; Smith, 2015).

El control de la LC depende en muchos países de la vacunación (Windsor, 2011; Windsor, 2014). En Portugal no existe ninguna vacuna disponible comercialmente para la LC. La utilización de autovacunas producidas a partir del agente etiológico aislado en el rebaño parece ser eficaz en el control de los brotes de la forma visceral y la reducción de la incidencia de enfermedad en los efectivos vacunados (Costa, 2016).

En Australia, el programa de vacunación comenzó en 1983. Se combinó el antígeno de la LC con las vacunas frente a clostrídeos, lo que permitió la vacunación anual rutinaria frente a *C. pseudotuberculosis* de un gran número de efectivos nacionales. Aproximadamente el 70% de los productores optaron por vacunas comerciales y programas de vacunación con dos dosis de vacuna en corderos y un refuerzo anual en ovejas adultas (Paton, 2010; Windsor, 2014). Gracias a ello, se ha estimado una reducción de la prevalencia de un 26% en 1995 hasta un 5,2% en 2009 (Windsor, 2014).

En Canadá la vacunación en caprinos finalizó en 2006, tras la retirada de la única vacuna aprobada para esta especie (Debien et al., 2013). Por su parte, la inmunización activa *off-label* de cabras de leche con la vacuna para ovejas no ha demostrado buenos resultados y el fabricante ha recomendado no utilizarla en cabras, por razones de seguridad. A raíz de estos resultados negativos, la vacunación contra la LC ha disminuido y los productores de cabras han indicado un aumento en el desarrollo de abscesos, con la consecuente retirada de animales (Debien et al., 2013).

En otros países, la concienciación de la importancia de esta enfermedad para la rentabilidad de las explotaciones de pequeños rumiantes ha originado programas de control voluntarios y no financiados por el gobierno, con una reducción de los casos clínicos (Windsor, 2014).

No obstante, no hay que olvidar que, además de la vacunación, para el control de la LC es fundamental llevar a cabo medidas adecuadas de **bioseguridad** y manejo de los

animales, como mejorar las condiciones higiénicas y sanitarias de las explotaciones. Es evidente que su prevalencia y propagación aumentan ante la presencia de factores de riesgo como la contaminación del suelo, la contaminación de los tanques de baño y materiales de esquilado y tatuaje, la introducción de nuevos animales en la explotación y el incumplimiento de las reglas básicas de manejo, como las que se presentan a continuación (Velasco y Fernández, 2002; Paton, 2010; Gómez-Gascón et al., 2013):

- Implementación de medidas de bioseguridad como la cuarentena, control de la entrada de animales provenientes de otras explotaciones, de la entrada de personas en la explotación (ropa y calzado), y de la entrada de vehículos mediante la construcción de vados sanitarios.
- Reducción de la contaminación del ambiente con una adecuada higiene de las instalaciones, maquinaria y equipos.
- Extremar la limpieza y desinfección de todos los utensilios de marcado, esquilado, castraciones y otros tratamientos.
- Desinfección correcta de heridas, aplicaciones inyectables, tatuajes y crotales auriculares.
- Inspección periódica del rebaño para la detección precoz y separación de los portadores asintomáticos y/o con la forma visceral de la enfermedad.
- Realizar el tratamiento de los abscesos superficiales sólo en animales de un alto valor genético.
- Retirada del rebaño de cualquier animal que presente recidivas, por considerársele un portador crónico.
- Implementar programas de reposición adecuados con retirada de efectivo de mayor edad en caso de altas prevalencias de enfermedad en la explotación.

Respecto al control de la mastitis por *C. pseudotuberculosis*, muy importante en colectivos de producción lechera, se recomiendan, además de las prácticas anteriores, las siguientes normas generales de profilaxis (Ermini y Antenucci, 2014):

- Realización del ordeño en local limpio y desinfectado con productos a base de cloro o similares.
- Lavarse las manos correctamente antes y después del ordeño.
- En caso de ordeño mecanizado, lavar las tetinas entre un ordeño y otro.

- Al final del ordeño aplicar en el pezón un desinfectante de cloro o similar.
- Todos los animales con lesiones en la mama (costras, pápulas, abscesos...) deben ser identificados, separados, ordeñados al final, eventualmente con la mano y, si es necesario y recomendable, tratados.
- En el ordeño mecanizado, controlar periódicamente el buen funcionamiento de la máquina y substituir todas las partes de goma por lo menos una vez al año.
- Practicar la terapia preventiva de mastitis en el periodo de secado.

La LC es el ejemplo de una enfermedad cuyo control es posible mediante la aplicación de un conjunto de medidas de bioseguridad y buenas prácticas ganaderas, siendo evidente que su prevalencia y propagación aumenten en presencia de factores de riesgo como la contaminación del suelo, de tanques de baño y de materiales de esquila y tatuaje, introducción de nuevos animales en la explotación y la no observación de reglas básicas de manejo. En general, lo importante sería la sensibilización de ganaderos y veterinarios para las buenas prácticas ganaderas, muchas veces ignoradas en nuestra realidad.

El desafío para quienes se enfrentan a esta enfermedad es conocer los hallazgos de la investigación realizada hasta el momento y aplicarlos para ayudar a resolver los problemas que la infección por *C. pseudotuberculosis* causa en sus sistemas de producción. Los estudios desarrollados han arrojado importantes avances en la identificación de los genes de *C. pseudotuberculosis* implicados en la virulencia, lo que permitirá llegar a nuevas formulaciones de vacunas, así como al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico (Paton, 2010; Gómez-Gascón et al., 2013).

Por otro lado, se están realizando investigaciones de **genómica** cuantitativa y funcional para identificar los marcadores genéticos asociados a la resistencia de enfermedades, como la LC (Pal y Chakravarty, 2020). Los estudios de Minozzi (2017), en diferentes razas de cabras, han permitido identificar los *loci* responsables de la respuesta inmune frente a *C. pseudotuberculosis*. El objetivo es seleccionar líneas de animales genéticamente resistentes a esta enfermedad para reducir su incidencia y mejorar el estado sanitario de los rebaños. Son estudios integrados que incluyen la recopilación de datos a gran escala (dentro y entre razas), combinado con predicción epidemiológica (Pal y Chakravarty, 2020). La genética molecular puede y debe aplicarse al diagnóstico de

enfermedades infecciosas como la LC, y los avances en esta área pueden permitir la optimización de estas técnicas en el diagnóstico y desarrollo de terapéuticas y vacunas. De hecho, en los últimos años, se ha realizado una inversión en investigación en el campo de la genética del *C. pseudotuberculosis* pero, sorprendentemente se sabe poco sobre los *loci* genéticos implicados en la resistencia / susceptibilidad a LC (Minozzi et al., 2017). Desde un punto de vista económico y epidemiológico sería importante y más inteligente seleccionar animales resistentes a enfermedades como la LC, donde el control es difícil y dependiente de muchos factores.

CAPÍTULO III.

OBJETIVOS

Esta Tesis doctoral constituye el primer estudio epidemiológico desarrollado en la población de pequeños rumiantes de la región de Alto Alentejo (Portugal) y tiene por objeto:

- 1. Evaluar la validez y utilidad de diversas técnicas moleculares y serológicas para el diagnóstico de la Linfadenitis caseosa.** Para ello,
 - a. Se determinará la validez analítica y diagnóstica de una modificación de la PCR convencional para la detección de *C. pseudotuberculosis* a partir de lesiones piogranulomatosas que incluye la dilución sistemática de la muestra de ADN.
 - b. Se determinará la validez y utilidad diagnóstica del *ELITEST CLA # CK105A*[®] (HYPHEN BioMed, Francia) en el diagnóstico de la infección por *C. pseudotuberculosis*.
- 2. Realizar una encuesta transversal de la seroprevalencia de *C. pseudotuberculosis* en el ganado ovino y caprino del Alto Alentejo (Portugal).**
- 3. Realizar un estudio analítico preliminar de los factores de riesgo asociados a la seropositividad por *C. pseudotuberculosis* en la población de estudio.**
- 4. Realizar un estudio descriptivo de los casos clínicos detectados mediante PCR.**

CAPÍTULO IV.

MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL

4.1. Caracterización de la región de estudio

Para el desarrollo de esta tesis se ha realizado un estudio transversal, a nivel de granja y animales, entre 2012 y 2015, en la subregión del Alto Alentejo, perteneciente a la región del Alentejo, en el centro-sur de Portugal.

La región del Alentejo tiene una extensión aproximada de 31 605 km² (34,3% de la superficie total de Portugal continental) y una población estimada de 704 558 habitantes, de elevada tradición ganadera (Estadística PORTUGAL, 2019a; Estadística PORTUGAL, 2019b). Según el Instituto Nacional de Estadística (INE) (2019), en el Alentejo se concentran la mayoría de los efectivos de ganado bovino, porcino, caprino y ovino de todo Portugal: 805 mil bovinos (48% del efectivo nacional), siendo 86% animales de aptitud de carne; 999 mil porcinos (44% del efectivo nacional), 99 mil caprinos (26% del efectivo nacional) y 1 millón 324 mil ovinos (66% del efectivo nacional) (Estadística PORTUGAL, 2019b). A pesar de que la producción de bovinos de carne tiene una gran importancia en esta región, la carne procedente de ovinos y caprinos (principalmente de cordero y cabrito) son las que tienen un mayor peso en la economía nacional. El 39% de los corderos y el 29% de los caprinos sacrificados y aprobados para el consumo humano en el año 2009 procedían del Alentejo (Estadística PORTUGAL, 2009).

El Alto Alentejo es una subregión del Alentejo, correspondiente al distrito de Portalegre (Fig. 25). Esta subregión tiene un área total de 519 082 hectáreas (5 190,82 km²), que representa el 7% del territorio nacional y el 17% del área total del Alentejo. Tiene en total 9 mil explotaciones; el 15% de ellas con un área igual o superior a 50 hectáreas (Estadística PORTUGAL, 2009). La producción de pequeños rumiantes lecheros y cárnicos en el Alto Alentejo representa una parte importante de la producción ganadera de la región y el país, con un total de 250.000 ovinos y 25.000 caprinos (Estadística PORTUGAL, 2009).

Su proximidad con Andalucía, región de España con alta prevalencia de LC (Gómez-Gascón et al., 2013), y el comercio intensivo de pequeños rumiantes entre ambos países,

aumentan la probabilidad de que esta enfermedad sea prevalente en la subregión de Alto Alentejo.

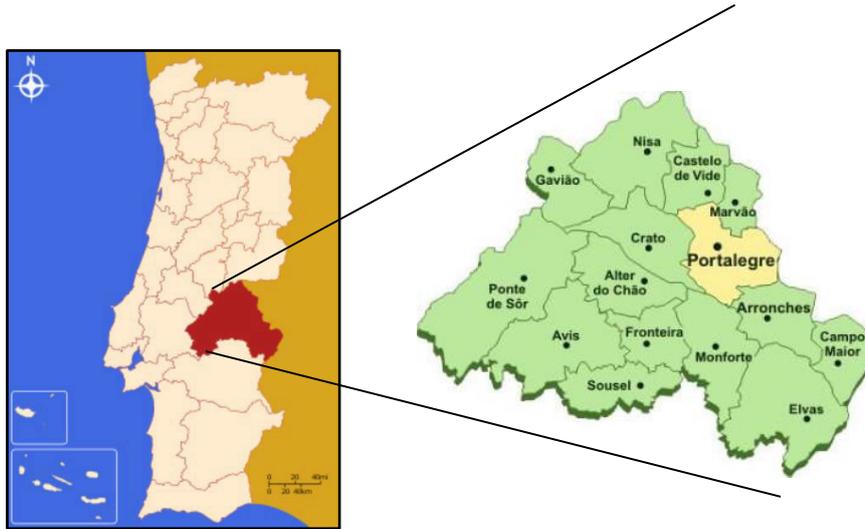


Figura 25: Mapa de la subregión del Alto Alentejo, Portugal. En verde se señalan los distintos municipios en los que se ha realizado el muestreo, destacando en amarillo la capital, Portalegre. (Mapa adaptado de <http://pt.wikipedia.org> y <http://www.portalegredigital.biz/pt>).

4.2. Plan de muestreo

La población en estudio estaba compuesta por un total de 1.208 rebaños de ovejas (con una media de 135 animales por explotación) y 107 rebaños de cabras (con una media de 42 animales por explotación) ubicadas en la subregión del Alto Alentejo, lo que supone un total de 250.000 ovejas y 25.000 cabras (Estadística PORTUGAL, 2017a, 2017b, 2017c).

Para estimar la dispersión de la infección, se estimó, en base a una prevalencia esperada del 50%, un error máximo aceptado del 10,5% y un nivel de confianza del 95%, una muestra de 82 explotaciones, de las que 55 fueron de ovino y 27 de caprino. La selección de las granjas, mediante muestreo aleatorio simple, se realizó en colectivos de entre 10 y 1.200 animales (media de animales/explotación = 114).

Para determinar la presencia de la infección en los colectivos seleccionados se determinó, en base a una prevalencia mínima esperada del 25% (Debien et al., 2013) y un nivel de confianza del 95%, una muestra de entre 8-11 animales por explotación (Tabla 6). El

muestreo se realizó a nivel de granja y en el Matadero Regional Do Alto Alentejo, S.A., responsable del sacrificio de la mayoría de pequeños rumiantes en esta región.

Tabla 6: Muestreo para la detección de infección en las explotaciones seleccionadas.

Tamaño de la explotación	N.º animales analizados
1-19	8
20-39	9
40-89	10
≥ 90	11

En total se analizaron 756 muestras (70% ovinos y 30% caprinos adultos) (Tabla 7), lo que permitió determinar la seroprevalencia de la infección en animales con una confianza del 95% y un error máximo aceptado del 3,6% (censo 275.000 animales; prevalencia esperada 50%) (Winepi, Universidad de Zaragoza, España).

Tabla 7: Relación de muestras analizadas.

	Ovino	Caprino	Total
	No. (%)	No. (%)	
Muestras de sangre	528 (69.8)	228 (30.8)	756
Muestras de lesiones purulentas/piogranulomatosas	50 (86.2)	8 (13.8)	58

Las muestras de sangre se recogieron mediante punción de la vena yugular en tubos Vacutainer® sin anticoagulante (Becton-Dickinson, USA) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min para la obtención de 2 ml de suero sanguíneo. Tras su identificación, los viales (Eppendorf®) se conservaron a -20°C, hasta su procesado en el departamento de Sanidad Animal (Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba).

Durante el muestro se realizó, además, un examen macroscópico a 335 de los 756 animales analizados (311 ovejas y 24 cabras) para la detección de lesiones

piogranulomatosas, externas e internas, compatibles con LC. En los casos positivos (n = 58) se procedió a la sección de un fragmento de 25-30 mg de tejido, que se conservó en tubo Eppendorf® a - 20°C hasta su procesado. Las muestras se identificaron con el código de la explotación de origen, registrando la especie animal, aptitud productiva, régimen de producción y el órgano o zona afectada.

4.3. Cuestionario

Ante la reticencia inicial de muchos ganaderos a aportar información de sus explotaciones, se decidió centrar la encuesta en los aspectos más relevantes para la aparición de la enfermedad. Así, una vez aceptaron participar en el estudio, se recabó información sobre: (Tabla 8) (Anexo 1)

Tabla 8: Categorización / Información cuestionario.

Variable	Categorías
Especie	ovina / caprina
Aptitud	lechera / cárnica
Régimen de producción	extensivo / semi-extensivo / intensivo
Tamaño de la explotación	Pequeño (< 50) / mediano (50-200) / grande (> 200)

4.4. Prueba de ELISA

Para la determinación del título de anticuerpos frente a *C. pseudotuberculosis* se utilizó el kit comercial ELITEST CLA # CK105A® (HYPHEN BioMed, 2007). Este ELISA directo utiliza una forma recombinante de la fosfolipasa D (PLD) para detectar anticuerpos-IgG anti-PLD en sueros de ovejas y cabras con LC. Como no se conoce, hasta la fecha, ninguna otra bacteria patógena ovina que este dotada de la PLD, el ELISA directo se estima una prueba muy específica.

4.4.1. Fundamento de la prueba

Los pocillos de las placas de microtitulación se tapizan con PLD recombinante (*r*PLD) altamente purificado, que constituye el antígeno en fase sólida. La muestra se incuba en el pocillo y los anticuerpos específicos contra *r*PLD, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno inmobilizado en fase sólida.

Posteriormente, se añade un anticuerpo monoclonal de ratón IgG anti-cabra/oveja marcado con peroxidasa de rábano (HRP- *horseradish peroxidase*) (anticuerpo secundario). Cuando en la muestra hay anticuerpos anti-PLD, estos se unen al antígeno recubierto y son detectados por el anticuerpo secundario (Fig. 26).



Figura 26: Reactivos del *ELITEST CLA # CK105A*[®].

La incubación posterior con sustrato de HRP produce un color azul en los pocillos de prueba; el ensayo colorimétrico se acelera (y se detiene) mediante la adición de ácido sulfúrico, lo que produce un cambio de color amarillo. Si una muestra de suero no contiene anticuerpos anti-PLD, el anticuerpo secundario marcado con HRP no se une y no se desarrolla color (Fig. 27).



Figura 27: Lectura de las placas ELISA.

4.4.2. Protocolo de ensayo

Siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, se dejó atemperar todos los reactivos a 18-25°C antes de su utilización. A continuación:

- se preparó la solución de lavado, mediante dilución del concentrado de lavado a 1:20 con agua destilada o desionizada estéril.
- se diluyeron las muestras y controles a 1:50 con el diluyente de muestras.
- y se diluyó el concentrado de inmunoconjugado a 1:100 con el diluyente correspondiente.

En la siguiente tabla se resume el procedimiento de la prueba.

Tabla 9: Procedimiento de la prueba.

Reactivo	Volumen	
Diluyente para muestras	220 µl	Adicionar a todos los pocillos
Muestras	20 µl a 1:50	Adicionar en los pocillos correspondientes. Agitar y cubrir la placa con Parafilm
Controles positivo y negativo		
Incubar 60 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)		
Preparar el inmunoconjugado antes del final de la incubación		
Solución de lavado a 1:20	5 x 0.3 ml	Lavar cada pocillo 5 veces
Inmunoconjugado a 1:100	200 µl	Adicionar a cada pocillo y agitar suavemente. Cubrir con Parafilm
Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)		
Solución de lavado a 1:20	5 x 0.3 ml	Lavar cada pocillo 5 veces
Sustrato	200 µl	Adicionar a cada pocillo. Agitar y cubrir con Parafilm
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)		
Solución Stop	50 µl	
Leer la absorbancia a 450 nm en 10 minutos		
Absorbancia del sustrato a 620 nm (longitud de onda referencia)		

4.4.3. Interpretación de la prueba

Tras verificar la validez de los controles, se estimó el valor de corte (*cutt-off*) mediante la siguiente fórmula (HYPHEN BioMed, 2007), quedando establecido en 0,5 para T^a 18-25°C.

$$\text{Valor de corte} = \left[\frac{(P - N)}{4} \right] + N$$

donde:

P = la media de la absorbancia de los controles positivos

N = la media de la absorbancia de los controles negativos

De esta forma, considerando la absorbancia del control negativo (0,2), se determinaron los siguientes criterios de interpretación:

Absorbancia media de la muestra (S)	Interpretación
< 0,20	negativa
0,20-0,50	dudosa (repetir la prueba*)
≥ 0,50	positiva

* Si tras el segundo ensayo se mantiene en este rango tomar otra muestra al animal.

4.5. Prueba PCR

Para la identificación de *C. pseudotuberculosis* en las lesiones piogranulomatosas se realizó una PCR clásica de acuerdo con el protocolo descrito por Pacheco y cols. (2007). Todas las pruebas se realizaron por duplicado, incluyendo en el segundo ensayo una modificación respecto al protocolo clásico: la dilución de las muestras de ADN a 1:10 para disminuir la inhibición enzimática asociada a los detritus celulares y aumentar la sensibilidad de la prueba (**PCR optimizada**) (Honoré-Bouakline et al., 2003; Pacheco et al., 2007).

4.5.1. Diseño de los primers

La técnica se basó en el diseño de pares de primers para dos genes diana: el segmento ribosómico 16S (ARNr 16s) - 815 pb (pares de bases)- y el gen que codifica la exotoxina

fosfolipasa D (PLD) - 132 pb- (Fig. 28). La elección de la secuencia de nucleótidos y el diseño de los primers se realizó con el software “Primer express” (*Primer Express™ Software v3.0.1 License*) y la base de datos www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/:

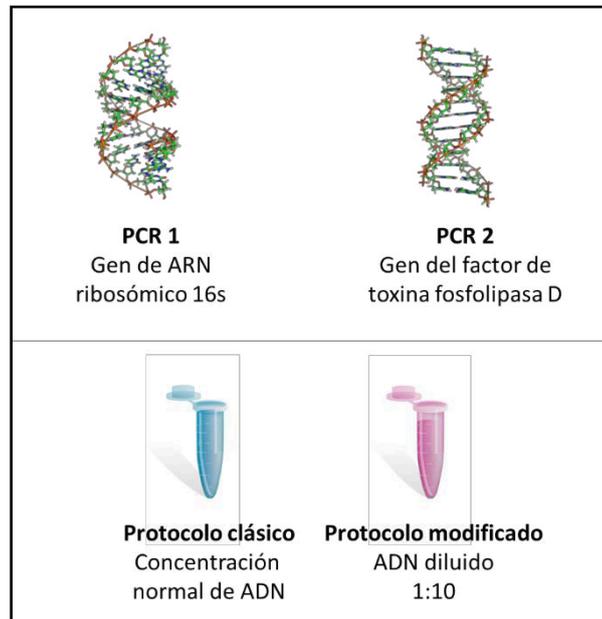


Figura 28: Pruebas de PCR realizadas con cada una de las muestras de ADN.

Primers *Corynebacterium pseudotuberculosis* gen ARN ribosomal 16s:

Fw GTCTAATACTGGATAGGACCGCACT (58°C)

Rv ATATGTCAAGCCCAGGTAAGGTTC (59°C)

Amplicon: 815pb Seq ref: NR_119175.1

Primers *Corynebacterium pseudotuberculosis* gen PLD:

Fw GCTCGTAGTGTGTGCTCCATAAAT (58°C)

Rv ATCAGCGGTGATTGTCTTCCA (59°C)

Amplicon: 132 pb Seq ref: L16587.1

4.5.2. Digestión y extracción del ADN

Esta fase de la PCR es crucial para su sensibilidad, de forma que cuanto mayor es la pureza del ADN extraído mayor es el grado de sensibilidad de la técnica. En el caso de la LC, el carácter purulento de las lesiones y la reducida presencia de microorganismos en

las muestras puede limitar la extracción de ADN (Baird y Fontaine, 2007; Andrade et al., 2012; Mendonça, 2012; Ilhan, 2013).

Para el procedimiento de digestión y extracción de ADN se utilizó el “*NZY Tissue gDNA Isolation kit*” de la empresa portuguesa “nzytech - gens & enzymes”. Los kits NZY están diseñados para la obtención rápida y sencilla de ADN genómico puro de una amplia variedad de muestras, que incluyen células y tejidos animales, bacterias Gram positivas y Gram negativas, muestras forenses y muestras clínicas. Este método utiliza tampones de lisis optimizados que contienen proteinasa K y sodio dodecil sulfato (SDS) para liberar el ADN de las células y no requiere extracción mediante fenol o cloroformo. Tras el lisado, el ADN es absorbido selectivamente por la columna de centrifugado a base de sílice y otras impurezas, como proteínas y sales, se eliminan durante los pasos de lavado. El ADN eluido presenta una razón A260/280 entre 1,7 e 1,9 (densidad óptica) lo que lo hace listo para su uso en secuenciación, PCR, multiplex-PCR, y genotipado. El *NZY Tissue gDNA Isolation kit* está optimizado para aislar hasta 35 µg de ADN de hasta 25 mg de muestras de tejido o 10^7 células.

Antes de usar el kit se añadieron 1,35 ml (MB13502 / 3) de tampón de proteinasa a cada tubo de proteinasa K y se agitaron en vórtex (Vortex stirrer-Fisher brand 3000rpm). A continuación, se añadieron 28 ml (MB13502) o 112 ml (MB13503) de etanol de biología molecular al 100% a cada recipiente de tampón NW2.

Para el **pre-lisado** de las muestras, se añadieron 180 µl de la solución tampón NT1 y 25 µl de la solución de proteinasa K preparada a cada una de las muestras y se incubaron a 56°C en baño seco (Drybath modelo FB15101), durante 1-3 horas, agitando ocasionalmente en el vórtex durante la incubación. Algunas muestras difíciles de digerir se mantuvieron en incubación durante la noche.

El proceso de digestión de las muestras se observó a simple vista, evaluando el color y homogeneidad de la preparación de digestión, la ausencia de grumos o porciones de tejido.

Para la **lisis** de las muestras, se añadieron 200 µl de tampón NL (clorhidrato de guanidina), seguido de agitación en vórtex durante 10 segundos. En los casos en que las partículas visibles permanecieron en suspensión, las muestras se centrifugaron a 4500 rpm durante

1 minuto (modelo Guoto de minicentrífuga Fisherbrand) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga.

A continuación, se añadió a cada tubo de muestra lisada 210 μ l de etanol al 100%. Los tubos se agitaron inmediatamente para obtener una solución homogénea.

La mezcla obtenida para cada muestra en el paso anterior fue transferida a las **columnas de tejido NZYSpin**, insertadas en un tubo colector de 2ml. Las columnas se centrifugaron durante 1 minuto a 1200 rpm (11.000 g) y se desechó el volumen del tubo colector y se reemplazó la columna.

Para el **lavado** de la membrana de sílice se añadieron 500 μ l de tampón NW1 (clorhidrato de guanidina) a cada columna de tejido y se centrifugaron durante 1 minuto a 12000 rpm. Se descartó el volumen del tubo colector y se reemplazó la columna.

Se agregaron 600 μ l del tampón NW2 a cada columna y se centrifugaron durante 1 minuto a 12000 rpm, descartando el volumen del tubo colector y reemplazando la columna. En un segundo lavado, se utilizaron 200 μ l de NW2, centrifugando durante 2 min a 12000 rpm.

Cada columna de tejido *NZYSpin* se colocó en el tubo colector respectivo y se centrifugó durante 2 minutos a 1200 rpm para secar la membrana de sílice. En esta etapa, el ADN de la muestra ya está en la membrana de sílice.

Para la **elución del ADN**, cada columna de tejido se colocó en un tubo de microcentrífuga (tipo eppendorf) y se añadieron 100 μ l del tampón N precalentado a 70°C para mejorar la recuperación del ADN. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 2 minutos a 12000 rpm. El ADN extraído (concentración media de 200 ng / μ l y pureza media de 2,0) se almacenó a -20°C.

4.5.3. PCR

Para la fase de amplificación, se mezclaron los siguientes reactivos en tubos de 0,1 ml:

Reactivo	Volumen
2x NZYtech Green Mastermix	5µl
Mistura de <i>Primers</i> 16S e PLD de <i>Coryneb. Pseud.</i> (Fw500nM:Rv 500nM)	1µl
RNAse free water	2µl
ADN de cada muestra*	2 µl

* Se utilizó el mismo procedimiento para el control positivo y el control negativo.

Los tubos se colocaron en el termociclador programado con los siguientes ciclos:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	1 minuto	40
<i>Annealing</i>	58°C	45 segundos	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Este procedimiento se llevó a cabo para cada uno de los genes diana de la Tesis.

4.5.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se tiñeron para su revelado con bromuro de etidio.

El gel se preparó con 1 g de agarosa y 100 ml de tampón TAE 1x, calentando la mezcla se horno microondas hasta su disolución. Tras enfriar ligeramente, se añadieron 10 µL de bromuro de etidio. La mezcla se vertió en el molde y se alinearon los peines para formar los pocillos, dejando enfriar 15-20 minutos antes de retirarlos lentamente. Se colocó la bandeja en el tanque de electroforesis, dejando el gel completamente sumergido y con los pocillos en el lado del electrodo negativo.

Tras depositar las muestras de ADN en los respectivos pocillos, se aplicó el marcador de ADN - *NZYDNA Ladder V* (que tiene bandas entre 100 y 1000, a cada 100 Bp) en el primer pocillo de cada peine y se inició la migración durante 25 min a 100 V. Una vez concluida, se retiró el gel de la cubeta y se examinó en busca de radiación ultravioleta (U.V.).

Las bandas obtenidas fueron confirmadas, analizadas y comparadas con los estándares. Los resultados se fotografiaron para su registro.

Siguiendo el protocolo descrito por Pacheco et al. (2007), se consideró que una muestra era positiva a la PCR con la detección de al menos uno de los genes estudiados.

CAPÍTULO V.

VALORACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES Y SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA LINFADENITIS CASEOSA

La Linfadenitis caseosa es una enfermedad insidiosa: los casos clínicos sólo pueden detectarse a partir de nódulos linfáticos superficiales y un alto porcentaje de animales únicamente desarrolla lesiones a nivel visceral. Estos casos subclínicos se evidencian, generalmente, cuando el animal es sacrificado mediante cultivo bacteriológico y/o pruebas moleculares, como la PCR múltiple (mPCR) (Baird y Fontaine, 2007). Esta técnica molecular, utilizada habitualmente para el diagnóstico de la LC a partir de lesiones, permite diferenciar *C. pseudotuberculosis* de otras especies del género, incluida *C. ulcerans*, bacteria capaz de producir la toxina diftérica y con una similitud genética del 99,7% (genes ARNr 16S) y del 93,6% (genes rpoB) con *C. pseudotuberculosis*. La técnica discrimina, asimismo, otras bacterias patógenas asociadas con la formación de abscesos en pequeños rumiantes, como *Arcanobacterium pyogenes* y *Pasteurella multocida*, por lo que se le atribuye una especificidad analítica del 99%. En cuanto a su sensibilidad, la mPCR es capaz de detectar en las muestras hasta 0,001 ng del ADN genómico de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco et al., 2007).

Respecto a su validez diagnóstica, se considera que la PCR tiene una especificidad del 98-100% y una sensibilidad del 94,6% en la detección de *C. pseudotuberculosis* a partir de muestras de pus (Kumar et al., 2013). En base a ello, muchos autores la utilizan como prueba de referencia para confirmar la infección a partir de abscesos, si bien señalan una posible limitación en la purificación y secuenciación del ADN como consecuencia de la alta concentración de desechos celulares en las lesiones purulentas, proponiendo la dilución de la muestra de ADN como solución (Pacheco et al., 2007; Andrade et al., 2012; Ilhan, 2013).

Dado el coste de las técnicas moleculares y el tiempo de ejecución, el diagnóstico serológico resulta de gran importancia en la detección precoz de los casos subclínicos y el control de la infección (Kaba et al., 2001; Gómez-Gascón et al., 2013). Los estudios desarrollados hasta la fecha han validado diversas pruebas de ELISA, con respecto al cultivo bacteriológico, para la identificación de *C. pseudotuberculosis* en cabras

infectadas experimentalmente y explotaciones ovinas afectadas por la enfermedad (Dercksen et al. 2000; Kaba et al., 2001; Malone et al., 2006; Nassar et al., 2014). Sin embargo, no hay datos previos de su validez, respecto a la PCR, para identificar casos subclínicos a nivel de campo.

En base a todo ello, nos planteamos valorar la validez de la PCR múltiple descrita por Pacheco et al. (2007) para la detección directa de *C. pseudotuberculosis* en lesiones piogranulomatosas tras incluir la dilución sistemática de la muestra de ADN, así como la validez de un ELISA comercial para el diagnóstico de las infecciones subclínicas por *C. pseudotuberculosis*.

5.1. Valoración de la especificidad y la sensibilidad analíticas de la PCR optimizada para la identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

La **especificidad analítica** es el grado en que la prueba distingue entre el ADN diana y otros componentes que pueden ser detectados en la prueba. Se puede determinar de tres formas distintas (OIE, 2018):

- *Selectividad*: grado en que la técnica puede cuantificar con exactitud el ADN en presencia de interferentes, productos de degradación, uniones no específicas, etc.
- *Exclusividad*: capacidad de la prueba para detectar una secuencia genómica que es propia del microorganismo buscado, y excluir todos los demás microorganismos conocidos que pudieran dar una reacción cruzada.
- *Inclusividad*: capacidad de la técnica para detectar varias cepas o serovares de una especie, varias especies de un género o una agrupación similar de microorganismos estrechamente emparentados. Caracteriza el ámbito de aplicación de una prueba de cribado.

La **sensibilidad analítica** es el límite inferior de detección (LOD) de un compuesto en una prueba. En el caso de la PCR, se puede expresar como el número de copias del ADN diana que se pueden detectar y distinguir del resultado de una matriz en la que no esté presente. Por lo general, se expresa como un número de copias que dan al menos un 50%

de resultados positivos entre las réplicas de una muestra de un volumen o peso determinado.

Como indicamos en Material y Métodos, en esta Tesis se ha llevado a cabo una modificación al protocolo de Pacheco et al. (2007) con el fin de disminuir, en la medida de lo posible, los interferentes presentes en las muestras de ADN obtenidas a partir de lesiones piogranulomatosas.

Para evaluar la exclusividad de esta optimización de la técnica se analizó el ADN genómico purificado de 2 cepas diferentes de *C. pseudotuberculosis*, una cepa de campo (aislada de una muestra de leche de cabra obtenida de una muestra de tanque, de la zona de Serra da Estrela – Seia, Portugal – Vetdiagnos) y la cepa DSMZ 20689 (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*), de la *German Collection of Microorganisms and Cell Culture*, así como el ADN de otras bacterias frecuentes en sanidad animal (*Chlamydia* spp., *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Escherichia coli*, *Neospora caninum*, *Coxiella burnetti*, *Mycoplasma* spp., *Staphylococcus* spp., *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*) (el origen de estas muestras es variable, son de cabras y ovejas a partir de muestras recibidas en el laboratorio de Vetdiagnos – Portugal) seleccionadas por la analogía patogénica (lesiones piógenas y producción de factores toxigénicos) y las especies animales hospedadoras (pequeños rumiantes).

Por su parte, la sensibilidad analítica se determinó utilizando diluciones sucesivas de 25 ng de ADN genómico de la cepa de *C. pseudotuberculosis* DSMZ 20689, equivalente a aproximadamente a $2,5 \times 10^7$ UFC (unidades formadoras de colonias).

5.1.1. Resultados

En el ensayo para evaluar la especificidad analítica de la PCR optimizada sólo las cepas de *C. pseudotuberculosis* mostraron un perfil similar en la PCR, con los amplicones de 815 y 132 pb correspondientes a los genes diana ARNr 16S y *pld*, respectivamente (Fig. 29). Ninguno de los productos de estos genes se detectó en el resto de las bacterias estudiadas, lo que demuestra la elevada capacidad de la PCR optimizada para diferenciarlas de *C. pseudotuberculosis*.

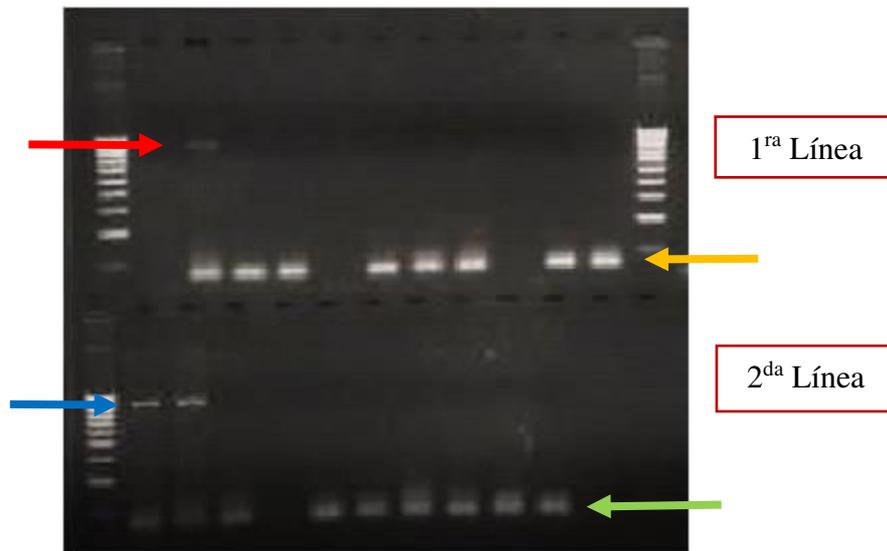


Figura 29: Imagen de electroforesis para evaluar la especificidad analítica de la prueba de PCR modificada para *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Flecha roja: ADN diana de la cepa de campo de *C. pseudotuberculosis*. Flecha azul: ADN de la cepa de *C. pseudotuberculosis* DSMZ 20689 y la cepa de campo. Flechas naranja y verde: productos de PCR con ADN de las otras bacterias ensayadas.

En cuanto a la sensibilidad analítica, la prueba identificó el agente etiológico en una dilución de 0.001 ng de ADN, equivalente a 10^3 UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por lo que consideramos que su sensibilidad es alta (Fig. 30).

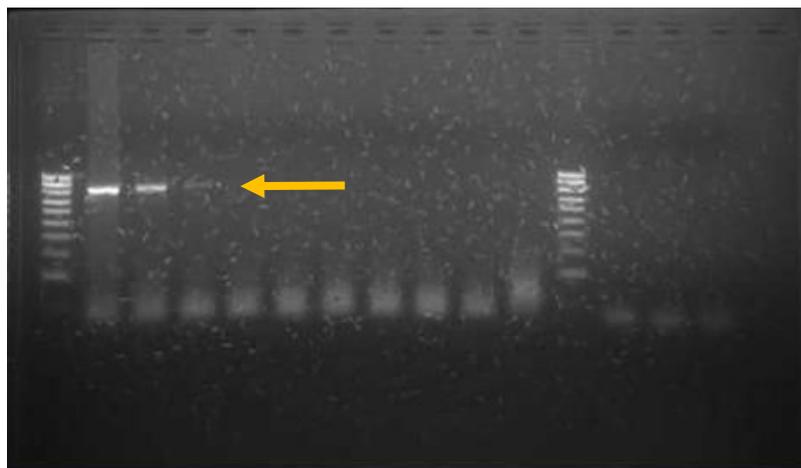


Figura 30: Imagen de electroforesis para evaluar la sensibilidad analítica de la PCR para *Corynebacterium pseudotuberculosis*. De izquierda a derecha: el marcador de peso molecular, producto de PCR con 0.1 ng de ADN estándar, y sucesivas diluciones 1:10, en los siguientes pocillos, observándose una reacción hasta 0.001 ng de ADN/reacción, dilución equivalente a 10^3 UFC de *C. pseudotuberculosis* (flecha en naranja).

5.2. Validez y utilidad diagnóstica de la PCR múltiple optimizada y del ELISA comercial ELITEST CLA#CK105A® en la detección de la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica constituyen los parámetros más importantes que se establecen durante la validación de una prueba. La *sensibilidad diagnóstica* es la proporción de muestras de animales de referencia, que se sabe que están infectados, que dan un resultado positivo en la prueba. La *especificidad diagnóstica* es la proporción de muestras de animales de referencia, que se sabe que no están infectados, que dan un resultado negativo en la prueba. Estas estimaciones son la base del cálculo de otros parámetros a partir de los cuales se realizan inferencias sobre los resultados de la prueba, como, por ejemplo, los valores predictivos de los resultados positivos y negativos (OIE, 2018).

Durante el desarrollo del plan de muestreo para el estudio transversal de prevalencia (descrito en el Capítulo IV) se tomaron muestras de sangre y material purulento a 58 animales con lesiones externas y/o internas compatibles con LC para su análisis con el ELISA comercial ELITEST CLA#CK105A® y la PCR con dilución del ADN (PCR optimizada). La determinación de su validez diagnóstica se realizó con la PCR convencional (S 94,6%; E 99,9%) (Pacheco et al., 2007; Kumar et al., 2013), mediante el programa estadístico Epidat 3.1 (Servicio Gallego de Salud, España) y las siguientes fórmulas:

	PCR convencional +	PCR convencional -
Prueba +	a	b
Prueba -	c	d

$$S = \frac{(a + b)\beta - b}{(a + c) - (1 - \beta)N} \quad E = \frac{(c + d)\alpha - c}{N\alpha - (a + c)}$$

donde:

N muestra de sujetos analizados

α es la sensibilidad de la prueba de referencia y β es su especificidad

Con los datos obtenidos se determinaron posteriormente las Razones de Verosimilitud (RV) de los resultados positivos y negativos y los Valores Predictivos (credibilidad y

utilidad del test) para diferentes probabilidades pre-prueba. Los resultados obtenidos se representaron gráficamente con el programa Microsoft Excel.

<i>Razón de verosimilitud del resultado + (RVP)</i>	Sensibilidad / (1-Especificidad)
<i>Razón de verosimilitud del resultado – (RVN)</i>	(1-Sensibilidad) / Especificidad
<i>Valor Predictivo Positivo (VPP)</i>	Probabilidad preprueba x RVP
<i>Valor Predictivo Negativo (VPN)</i>	Probabilidad preprueba x RVN

5.2.1. Resultados

Validación de la PCR múltiple optimizada (con dilución del ADN)

De los 335 animales (311 ovejas y 24 cabras) estudiados para la detección macroscópica de alteraciones compatibles con *C. pseudotuberculosis*, 58 (17,31%) mostraron lesiones piogranulomatosas externas y/o internas. Su análisis con la PCR optimizada (ADN diluido 1:10) y la PCR convencional (ADN sin diluir) para la detección de los genes 16s y PLD mostró los siguientes resultados (Tabla 10) (Fig. 31 y 32).

Tabla 10: Resultados positivos obtenidos en la PCR convencional y PCR optimizada para cada uno de los segmentos de ADN estudiados.

Ref. muestra	PCR CONVENCIONAL		PCR OPTIMIZADA	
	ADN 16s	ADN PLD	ADN 16s	ADN PLD
4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
32	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
52	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
61	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
62	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
63	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
66	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
77	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
84	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
85	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
86	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
87	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
88	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

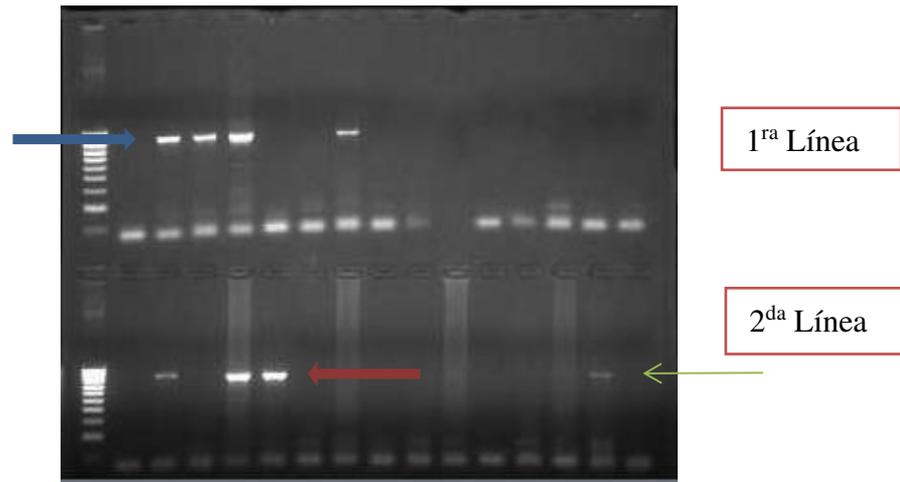


Figura 31: Resultados de PCR. Leyenda - En la primera línea, de izquierda a derecha, el primer pocillo tiene el marcador de peso molecular y luego se encuentran los productos de PCR de las muestras 60 a 68, seguido de un pozo vacío y los productos de PCR de las muestras 69 a 73, con **muestras 61,62 (PCR optimizada), 63 y 66 positivas** (815 pb) (flecha en azul). En la 2da línea, de izquierda a derecha, el marcador de peso molecular y los productos de PCR de las muestras 76 a 85, seguido de 86 a 88, Control Positivo (flecha verde) y Control Negativo, con **muestras positivas 77, 84 y 85** (815bp) (flecha roja).

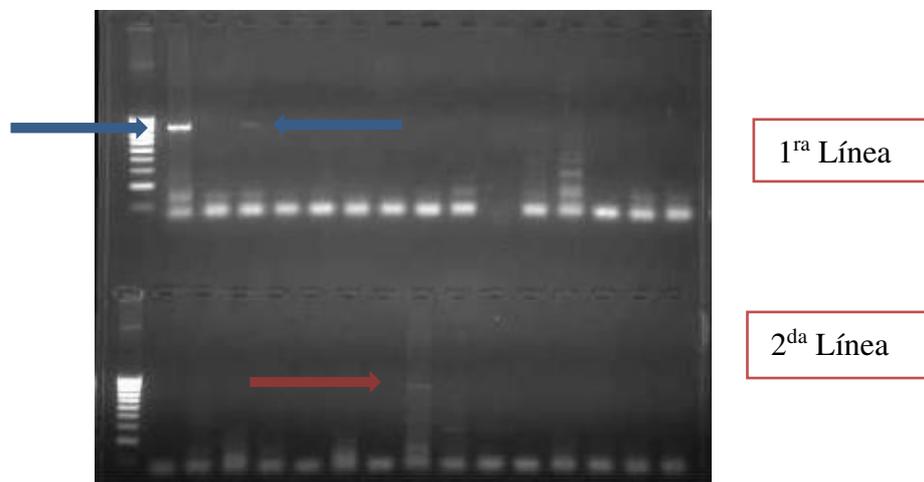


Figura 32: Resultados de PCR. Leyenda - En la 1ra fila, de izquierda a derecha, el 1er pocillo tiene el marcador de peso molecular (bandas distribuidas cada 100 pb) y luego Productos de PCR para las muestras 4 a 44, con **muestras 4 y 32 positivas (PCR optimizada)** (815 pb) (flechas azules). En la 2da línea, de izquierda a derecha, el marcador de peso molecular y los productos PCR de las muestras 45 a 59 secuencialmente, con la **muestra 52 positiva** (815 pb) (flecha roja).

En base a la S y E descritas para la PCR convencional (94,6% y 99%) (Pacheco y cols., 2007; Kumar y cols., 2013) y los resultados obtenidos en nuestro estudio (Tabla 11), la sensibilidad de la PCR optimizada sería de 0% y la especificidad del 91,75%. Es decir, la técnica no detectaría ninguno de los casos positivos a la PCR convencional (100% falsos negativos) y clasificaría correctamente el 91,75% (45/49) de los casos negativos a la prueba de referencia (8,25% falsos positivos).

Tabla 11: Comparación de los resultados obtenidos con la PCR optimizada y la PCR convencional.

	PCR convencional +	PCR convencional -
PCR optimizada +	0	4
PCR optimizada -	9	45
	9	49

Con esta validez, las Razones de Verosimilitud de la PCR optimizada fueron de 0 para los resultados positivos (RVP) y de 1,08 para los resultados negativos (RVN). Es decir, la probabilidad de obtener un resultado + a la PCR optimizada en un animal con LC es 0 veces mayor que la probabilidad de obtenerlo en un animal sin LC. En el caso de los resultados -, la probabilidad de obtenerlo en un animal con LC era 1,08 veces mayor que la probabilidad de obtenerlo en un animal sin la infección.

Validación del ELITEST CLA#CK105A®

Atendiendo a las limitaciones descritas por otros autores, y observadas en esta Tesis, para la aplicación de la PCR en muestras purulentas (inhibición enzimática y baja carga bacteriana) (Baird y Fontaine, 2007; Pacheco et al., 2007; Andrade et al., 2012; Mendonça, 2012; Ilhan, 2013), para la validación del ELISA comercial se decidió utilizar como prueba de referencia una combinación de la PCR convencional y la PCR optimizada. Se consideró que los cuatro negativos a la prueba convencional, detectados como positivos por la PCR optimizada, habían sido debidos a la inhibición enzimática y que los nueve positivos de la PCR clásica, que no detectó la técnica optimizada, se debieron a un exceso de dilución de muestras con reducido número de bacterias (Tabla 10). De esta forma, se minimizaron los posibles errores de diagnóstico.

Al analizar las muestras con el test ELISA, éste clasificó correctamente los 13 animales positivos a las técnicas moleculares y 35 de los 45 animales negativos a *C. pseudotuberculosis*, lo que determina una S y E del 100% y el 79,1%, respectivamente (0% falsos negativos y 20,9% falsos positivos) (Tabla 12). De esta forma la probabilidad de obtener un resultado positivo al ELISA en un animal infectado sería 4,78 veces mayor que la probabilidad de obtenerlo en un animal sin LC (RP +). Por su parte, la probabilidad de obtener un resultado negativo al ELISA en un animal no infectado sería infinitamente mayor que la probabilidad de obtenerlo en un animal con LC (RP -).

Tabla 12: Tabla de contingencia de los resultados de validación del ELISA comercial.

		Protocolo en paralelo de ambas PCRs	
		+	-
ELISA +		13	10
ELISA -		0	35
		13	45

A partir de estas medidas de validez se estimó, posteriormente, la credibilidad y utilidad del ELITEST CLA#CK105A[®] en función de la prevalencia real de la enfermedad en un colectivo animal (Fig. 33).

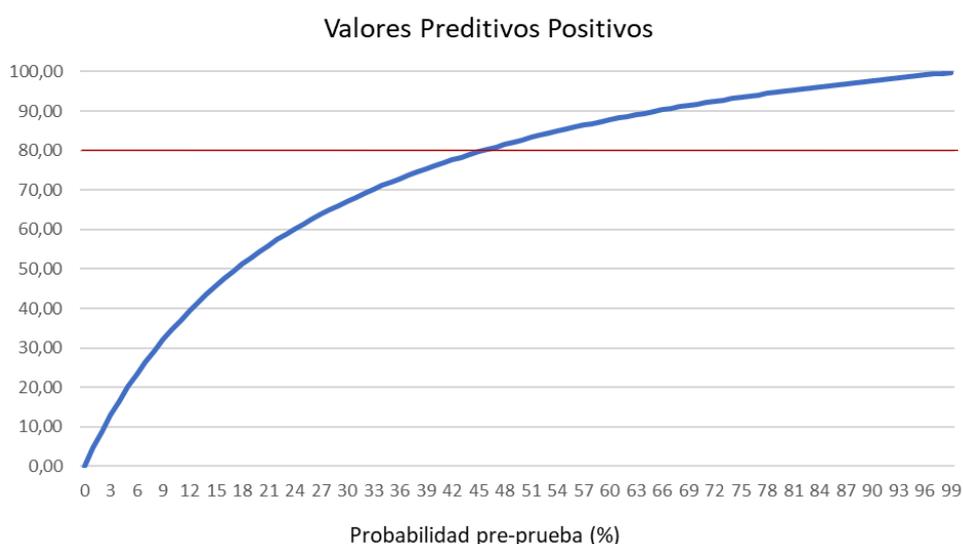


Figura 33: Gráfica de los valores Predictivos Positivos del ELITEST obtenidos en base a los resultados de S y E y la prevalencia real de la zona (probabilidad pre-prueba).

Como se aprecia en la gráfica, la probabilidad de que un animal positivo en el ELITEST esté infectado por *C. pseudotuberculosis* (Valor Predictivo Positivo) será igual o superior al 80% en todas las zonas con una prevalencia real (Probabilidad pre-prueba) mayor o igual al 46% (Fig. 33). En el caso de animales con un resultado negativo, la credibilidad del resultado será siempre del 100%, ya que la técnica no comete falsos negativos.

5.3. Discusión

La discusión sobre el diagnóstico de la LC actualmente se plantea a dos niveles: 1) clínico, en explotaciones muy afectadas intentando identificar y controlar los casos más graves de la enfermedad, y 2) científico con el objetivo de encontrar un método o un conjunto de métodos de diagnóstico *gold standard* que permitan la detección de casos subclínicos en programas de control y erradicación.

La optimización de la especificidad y sensibilidad de las técnicas diagnósticas constituye un punto crítico para garantizar el éxito de los programas de prevención y control. El estándar de oro para el diagnóstico de la Linfadenitis caseosa es el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* a partir de abscesos. Sin embargo, una proporción de los animales infectados, principalmente en ovejas, suelen presentar lesiones que sólo afectan a ganglios linfáticos internos y órganos como hígado, bazo y riñones, y, además, las bacterias de estas lesiones pueden no ser viables para el crecimiento *in vitro* (Soares et al., 2012; Ribeiro et al., 2013).

Las investigaciones realizadas a partir de una gran variedad de muestras patológicas para determinar la validez de la PCR múltiple en la detección de *C. pseudotuberculosis* verificaron una alta sensibilidad y especificidad (Nassar et al., 2015). De esta forma, y aunque el diagnóstico molecular no es una técnica rutinaria para detectar esta infección (debido a su alto coste), muchos autores han propuesto la mPCR como alternativa al cultivo bacteriológico por su rapidez y fiabilidad (Pacheco et al., 2007; Ilhan, 2013; Kumar et al., 2013).

Sin embargo, al igual que ocurre en la Tuberculosis y otras enfermedades que cursan con la formación de abscesos, la amplificación del ADN a partir de material purulento puede verse limitada por las enzimas presentes en las lesiones e, incluso, por la degradación del

ADN (Baird y Fontaine, 2007; Pacheco et al., 2007; Andrade et al., 2012; Mendonça, 2012; Ilhan, 2013). En el caso de la Linfadenitis caseosa, se ha comprobado que la dilución de estas muestras permite reducir la inhibición enzimática e incrementar la capacidad de detección de la PCR (Pacheco et al., 2007). De hecho, en esta Tesis cuatro de las muestras negativas a la técnica convencional resultaron positivas para el gen 16s tras la dilución de la muestra de ADN al 1:10. Sin embargo, la mPCR optimizada no detectó ninguno de los casos positivos a la PCR convencional, lo que podría deberse a un exceso de dilución de muestras procedentes de lesiones crónicas con baja carga bacteriana. La presencia de “lesiones purulentas estériles” ya fue descrita por Andrade et al. (2012) durante el estudio microbiológico de abscesos compatibles con Linfadenitis caseosa, en el que encontró un 18,2% de muestras sin crecimiento bacteriano.

Nuestros resultados sugieren, por tanto, que la dilución de la muestra de ADN al 1:10 no aportó ningún valor diagnóstico al método convencional descrito para la detección de *C. pseudotuberculosis* por Pacheco et al. (2007), si bien, debemos señalar que la precisión de estos cálculos pudo estar limitada por el número de casos confirmados de Linfadenitis que se obtuvieron en la encuesta transversal. Así, hubiese sido preciso comparar 73 animales infectados para determinar la sensibilidad de la PCR optimizada con una precisión del 95% (error máximo del 5%) y un nivel de confianza del 95%, y sólo se identificaron 9. En el caso de la especificidad, sin embargo, el valor estimado para la PCR optimizada (91,75%) tiene una precisión del 97% (NC 95%) (Jacobson, 1998).

Sin embargo, y a pesar de su fiabilidad, la PCR resulta poco práctica como técnica de elección en estudios de prevalencia y programas de control y erradicación, ya que no permite la detección *in vivo* de portadores asintomáticos -principal causa de dispersión de esta enfermedad en una población- (Kaba et al., 2001; Gómez-Gascón et al., 2013). En este contexto, la técnica ELISA suele ser la más adecuada (Hoelzle et al., 2013; Menzies et al., 2004; Nassar et al., 2015; Oreiby, 2014; Oreiby et al., 2015).

El serodiagnóstico ha sido implementado con éxito en algunas explotaciones caprinas (sensibilidad de 94% y especificidad 98%) (Derckeson et al., 2000; Kaba et al., 2001). Sin embargo, en ovejas, especialmente en individuos con infección inaparente y abscesos internos, el ELISA muestra una sensibilidad reducida (71-79%) y su especificidad, aunque elevada (99%), puede variar notablemente en función de la técnica utilizada (protocolo, antígeno ensayado, etc.), la existencia de reacciones cruzadas con otras

bacterianas y la persistencia de los anticuerpos en los animales recuperados (Malone et al., 2006; Binns et al., 2007; Hoelzle et al., 2013; Gómez-Gascón et al., 2013).

En este trabajo de Tesis se utilizó un kit de ELISA comercial basado en la fosfolipasa D (PLD), exotoxina producida por *C. pseudotuberculosis* con una alta antigenicidad (Barral et al., 2019). Los resultados obtenidos muestran una sensibilidad del 100% y una especificidad del 79,1%, valores inferiores a los descritos por Barral et al. (2019) para el ELISA indirecto con PLD purificada (E 98,7%), pero notablemente superiores a los hallados por Malone et al. (2006) para el ELISA sándwich de doble anticuerpo (sensibilidad 88% y especificidad 55%).

De esta forma, la prueba ELISA utilizada en nuestro trabajo resultaría especialmente útil en programas de erradicación y control, ya que la técnica detecta la totalidad de los animales infectados con una certeza absoluta de que los animales negativos a la misma pueden permanecer en el rebaño sin riesgo de persistencia y dispersión del agente (Valor predictivo de los negativos del 100%). En el caso de un resultado positivo, la probabilidad de eliminar un animal realmente afectado de Linfadenitis caseosa será del 80% o superior (Valor predictivo positivo) siempre que la prevalencia real en el colectivo sea igual o mayor al 46%.

CAPÍTULO VI.

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LINFADENITIS CASEOSA EN PEQUEÑOS RUMIANTES EN LA REGIÓN DE ALTO ALENTEJO, PORTUGAL

Al no ser una enfermedad de declaración obligatoria, la Linfadenitis caseosa se mantiene constante en muchos países. Debido a que está subestimada por los ganaderos y, en muchos casos por los veterinarios, no se conoce su prevalencia real y lo que supone económicamente. Esta situación se observa en Portugal y en España, donde los pequeños rumiantes representan una parte importante de la producción ganadera nacional.

La existencia de portadores asintomáticos favorece la dispersión de la infección y, una vez que la enfermedad se establece en un rebaño, su control es complicado debido a la dificultad para identificar las formas subclínicas y la mala respuesta de los animales enfermos a los antibióticos (Velasco y Fernández, 2002; Aquino de Sá et al., 2013; Gómez-Gascón et al., 2013). De esta forma, las pruebas de cribado constituyen una importante medida en la lucha frente a la enfermedad (Nassar et al., 2015; de Farias et al., 2019).

Esta Tesis doctoral se ha planteado con el fin de aumentar nuestro conocimiento sobre la epidemiología de la Pseudotuberculosis (Linfadenitis caseosa) en Portugal. Para ello, se ha realizado una encuesta transversal de la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en pequeños rumiantes en la región de Alto Alentejo, así como un estudio analítico transversal de la influencia de diversos factores relacionados con el animal (especie y aptitud) y el sistema de producción (régimen y tamaño de la explotación). La población de estudio, el plan de muestreo y la metodología seguida se han descrito en el Capítulo IV de esta Tesis doctoral.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa SPSS 27.0 (IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows) y el programa estadístico para epidemiología Winepi (Universidad de Zaragoza, España).

A partir de los datos obtenidos en la encuesta serológica se determinó la dispersión y la seroprevalencia real (%), con su correspondiente intervalo de confianza (para un NC 95%, y una sensibilidad y especificidad de la prueba del 100% y el 79,1%, respectivamente) (datos obtenidos en el Capítulo V).

Como se comentó en Material y Métodos, un alto porcentaje de ganaderos se mostraron reticentes a aportar información sobre el estatus sanitario y productivo de la explotación. En consecuencia, sólo fue posible realizar un estudio analítico preliminar. Mediante las pruebas no paramétricas de chi cuadrado y test exacto de Fisher se comparó la dispersión y la seroprevalencia en función de los factores estudiados. El contraste se realizó a dos vías, con un nivel de significación del 5% y una potencia estadística del 80%. En el caso de las variables politómicas se realizaron, posteriormente, comparaciones múltiples 2x2, ajustando el nivel de significación con la corrección de Bonferroni. Una vez determinada la asociación, se estimó la fuerza y el sentido mediante la Razón de Prevalencias (IC95%).

6.1. Estudio de seroprevalencia

En base a los datos utilizados para estimar el tamaño de la muestra (Capítulo IV), la presencia de al menos 1 animal seropositivo en la explotación era indicativo de una seroprevalencia mínima del 25%, considerándose el colectivo positivo. Sesenta y seis de las 82 explotaciones analizadas en nuestro estudio resultaron positivas a la infección por *C. pseudotuberculosis*, lo que supone un porcentaje real de granjas afectadas (dispersión) del **75,43%** IC_{95%} [66,40%-84,45%] (Tabla 13).

Por tipo de explotación, la infección fue significativamente más frecuente en las **fincas de caprino** (90,8% & 67,9%), así como en las granjas de régimen **no extensivo** (100% & 74,2%) y de tamaño **mediano** (92,7%) y **grande** (82%) (Tabla 13).

Tabla 13: Resultados de seroprevalencia por tipo de **explotación**.

GRANJAS	ELISA +/analizadas			Seroprevalencia real (IC _{95%})			P
	OV	CA	Total	OV	CA	Total	
APTITUD							
Cárnica	37/50	21/22	58/72	67,2% (54,2%-80,2%)	94,4% (84,7%- 100%)	75,5% (65,6%-85,5%)	0,03
Lechera	4/5	4/5	8/10	74,8% (36,8%-100%)	74,8% (36,8%-100%)	74,8% (36,8%-100%)	1,00
Aptitud P = 0,96							
PRODUCCIÓN							
Extensiva	38/52	24/26	62/78	66,1% (53,2%-78,9%)	90,4% (79,1%-100,00%)	74,2% (64,5%-83,9%)	0,02
No extensiva*	3/3	1/1	4/4	100%	100%	100%	1,00
Producción P = 0,24							
TAMAÑO							
Pequeñas (< 50 anim.)	21/33	17/18	38/51	54,1% (37,1%-71,1%)	93,1% (81,4%-100%)	67,9% (55%-80,7%)	0,004
Medianas (50-200)	10/11	6/6	16/17	88,6% (69,9%-100%)	93,1% (81,4%-100%)	92,7% (80,3%-100%)	0,76
Grandes (> 200)	10/11	2/3	12/14	88,6% (69,9%-100%)	57,9% (2,1%-100%)	82,04% (61,94%-100,00%)	0,21
Tamaño P = 0,18							
TOTAL	41/55	25/27	66/82	67,9% (55,6%-80,2%)	90,8% (79,8%-100%)	75,4% (66,4%-84,5%)	0,023

* Producción no extensiva: semi-extensiva e intensiva.

OV: ovino CA: caprino

Las explotaciones seronegativas tenían un censo medio de 85 animales y las seropositivas de 171 animales (P <0,001) (Tabla 14).

Tabla 14: Análisis comparativo del **tamaño** de las explotaciones negativas y positivas al ELISA.

EXPLORACIONES	ELISA	Total	Tamaño medio	Media ± desviación estándar
	Negativas	16	85,16	6,058 ± 135,190
Positivas	66	171,60	13,324 ± 214,012	

De los 756 animales analizados, 258 presentaron un título positivo en la prueba ELISA, determinando una seroprevalencia real del **16,74%** IC_{95%} [14,09%-19,40%] (Tabla 15).

Tabla 15: Resultados de seroprevalencia obtenidos en los **animales** analizados.

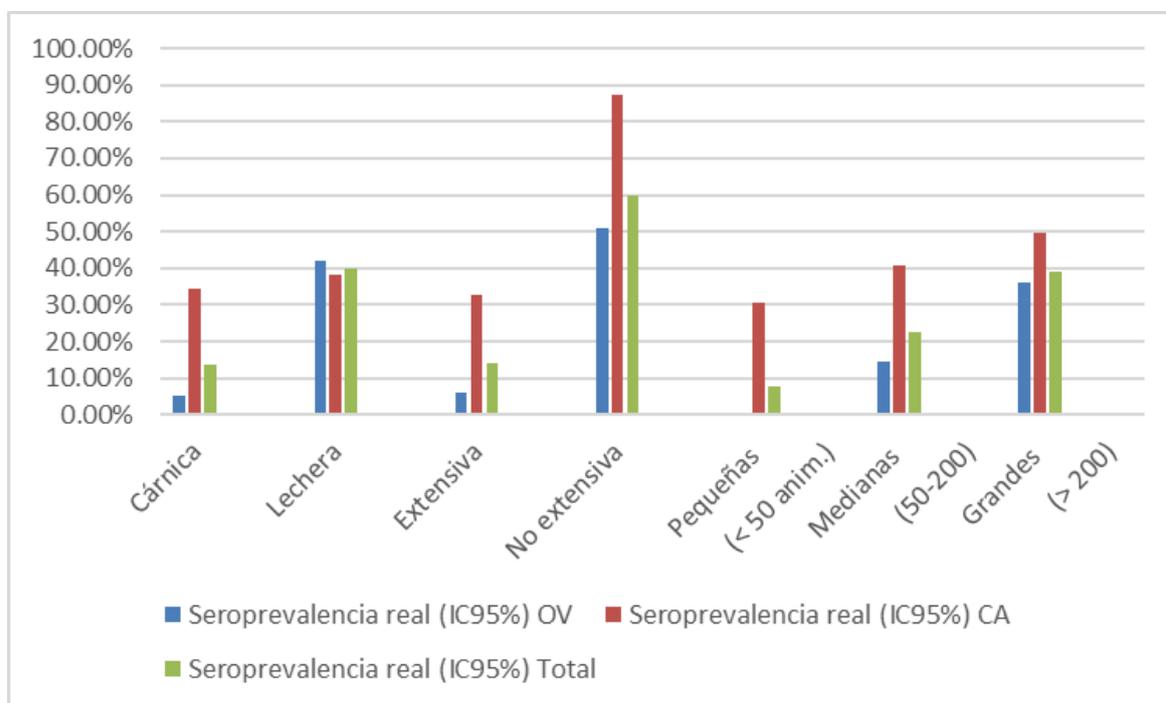
ANIMALES	ELISA +/analizadas			Seroprevalencia real (IC _{95%})			P
	OV	CA	Total	OV	CA	Total	
APTITUD							
				5,30%	34,30%	13,70%	0,0001
Cárnica	120/478	85/177	208/655	(3,3%-7,3%)	(27,3%-41,3%)	(11,1%-16,4%)	
Lechera	27/50	26/51	53/101	41,90%	38,10%	40%	0,76
				(28,2%-55,6%)	(24,8%-51,4%)	(30,4%-49,5%)	
						Aptitud	P < 0,0001
PRODUCCIÓN							
Extensiva	128/497	102/218	230/715	6,10%	32,77%	14,26%	0,0001
				(4%-8,3%)	(26,5%-39%)	(11,7%-16,8%)	
No extensiva	19/31	09-Oct	28/41	51,10%	87,50%	60%	0,04
				(33,5%-68,7%)	(67%-100%)	(45%-75%)	
						Producción	P < 0,0001
TAMAÑO							
Pequeñas (< 50 anim.)	56/306	67/149	123/455	0%	30,50%	7,80%	0,0001
					(23,1%-37,9%)	(5,3%-10,2%)	
Medianas (50-200)	36/111	26/49	62/160	14,60%	40,70%	22,60%	0,0003
				(8%-21,2%)	(27%-54,5%)	(16,1%-29,1%)	
Grandes (> 200)	55/111	18/30	73/141	36,30%	49,50%	39,10%	0,18
				(27,3%-45,2%)	(31,6%-67,4%)	(31%-47,1%)	
						Tamaño	P < 0,0001
TOTAL	147/528	111/228	258/756	8,80%	35,20%	16,70%	0,0001
				(6,4%-11,2%)	(29%-41,4%)	(14,1%-19,4%)	

* Producción no extensiva: semi-extensiva e intensiva.

OV: ovino CA: caprino

Por especie, los resultados obtenidos muestran una seroprevalencia de LC significativamente superior para el caprino en casi todas las categorías estudiadas, así como en el valor total. Con una frecuencia de animales seropositivos del 35,2% (frente al 8,8% obtenida en el ovino), nuestro estudio sugiere que la susceptibilidad de **la especie**

caprina a la infección por *C. pseudotuberculosis* podría ser 4 veces mayor que la susceptibilidad de la especie ovina (RP 4,0 IC95% [3,31-4,84]) (Tabla 15) (Fig. 34).



OV: ovino CA: caprino

Figura 34: Gráfica representativa de la seroprevalencia real de LC en los animales analizada con respecto a las variables especie, aptitud, producción y tamaño de explotación.

En cuanto a la aptitud productiva, el 86,6% de los animales analizados eran de aptitud cárnica y el 13,4% de aptitud lechera. La seroprevalencia obtenida en ambos grupos (13,7% y 40%, respectivamente) sugiere un riesgo casi tres veces mayor de los animales de **aptitud láctea** a la infección por *C. pseudotuberculosis* (RP 2.91 IC95% [2,49-3,42]) (Tabla 15) (Fig. 34).

Por sistema de producción, el 94% de los animales estudiados eran criados en régimen extensivo y el 6% en régimen intensivo o semi-extensivo (categorizados como “no-extensivo”) (Tabla 14). El porcentaje de animales seropositivos (14,26% y 60%, respectivamente) sugiere que los animales en **régimen no extensivo** tienen una probabilidad 4 veces mayor a sufrir la infección que los animales criados en extensivo (RP 4,19 IC95% [3,67-4,79]) (Tabla 15) (Fig. 34).

Finalmente, como refleja la Tabla 15 y la gráfica (Fig. 34), el 60,2% de los animales analizados procedían de explotaciones pequeñas (< 50 animales), el 21,2% de granjas medianas (50-200 animales) y el 18,6% restante de explotaciones grandes (> 200 animales). El análisis comparativo de la seroprevalencia observada en cada grupo sugiere que los animales criados en **granjas grandes** tienen una probabilidad de infectarse con *C. pseudotuberculosis* 1,73 (IC95% [1,51-1,98] y 5,01 (IC95% [4,14-6,07]) veces mayor que los animales de granjas medianas y pequeñas, respectivamente. Por su parte, los animales de explotaciones medianas tienen un riesgo 2,89 (IC95% [2,31-3,63]) veces mayor que aquellos procedentes de granjas pequeñas.

6.2. Descripción de los casos positivos detectados mediante PCR

Durante la encuesta transversal se realizó un examen macroscópico a 335 de los 756 animales analizados para la detección de lesiones piogranulomatosas, externas e internas, compatibles con LC y su análisis mediante mPCR. Cincuenta y ocho de los animales (17,3%) mostraron lesiones, detectándose en 13 de ellos alguno de los amplicones de ADN específicos de *C. pseudotuberculosis* seleccionados para esta Tesis, lo que supone una frecuencia de aislamiento del **23,61%** (IC95% [12,68%-34,54%]).

De los 13 casos positivos, 10 eran de ovino y 3 de caprino. De los 3 casos detectados en caprino, 2 tenían abscesos subcutáneos (Fig. 35) y 1 presentaba una forma diseminada de la enfermedad. En general, la forma visceral fue la más prevalente, detectándose en el 76,9% de los casos positivos a la PCR y la forma cutánea en el 23,1% restante (Fig. 38) (Tabla 16). En cuanto a la zona/órgano afectado, el pulmón fue el órgano más afectado con lesiones piógenas causadas por *C. pseudotuberculosis* (38,5%) (Fig. 36), seguido del hígado (15,4%), mientras que la forma diseminada se observó en el 7,7% de los casos (Fig. 37 y 38) (Tabla 16).

Tabla 16: Distribución de las muestras positivas a *C. pseudotuberculosis* según la localización de la lesión y la especie animal afectada.

	Localización de las lesiones piogranulomatosas									
	Abscesos subcutáneos		Abscesos mamarios		Hígado		Pulmón		Forma diseminada	
	ovino	caprino	ovino	caprino	ovino	caprino	ovino	caprino	ovino	caprino
Casos + No. (%)	1 (7,7)	2 (15,4)	1 (7,7)	0	2 (15,4)	0	5 (38,5)	0	1 (7,7)	1 (7,7)
	23,1% lesiones superficiales de LC		76,9% lesiones viscerales de LC							



Figura 35: Absceso subcutáneo en el nódulo linfático submandibular (forma adenítica superficial) de LC en caprino.

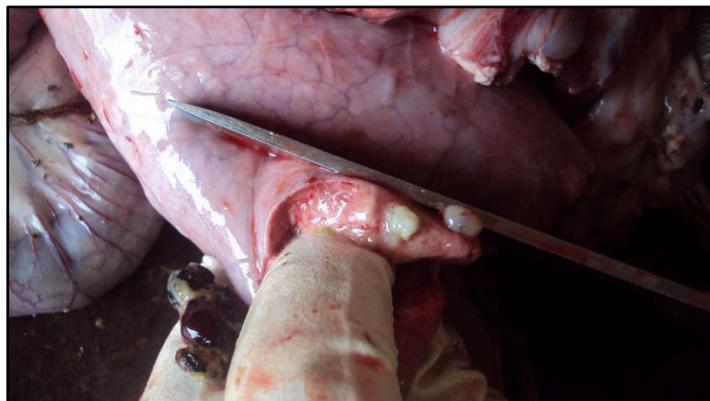


Figura 36: Piogranulomas de LC en pulmón (forma adenítica visceral) de ovino.

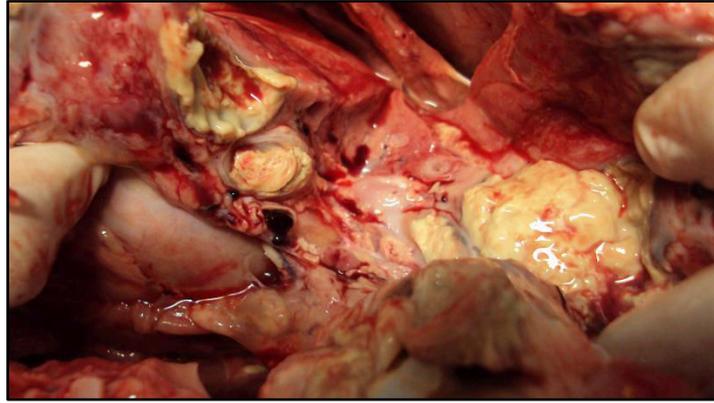


Figura 37: Forma diseminada (caquetizante) de LC en ovino.

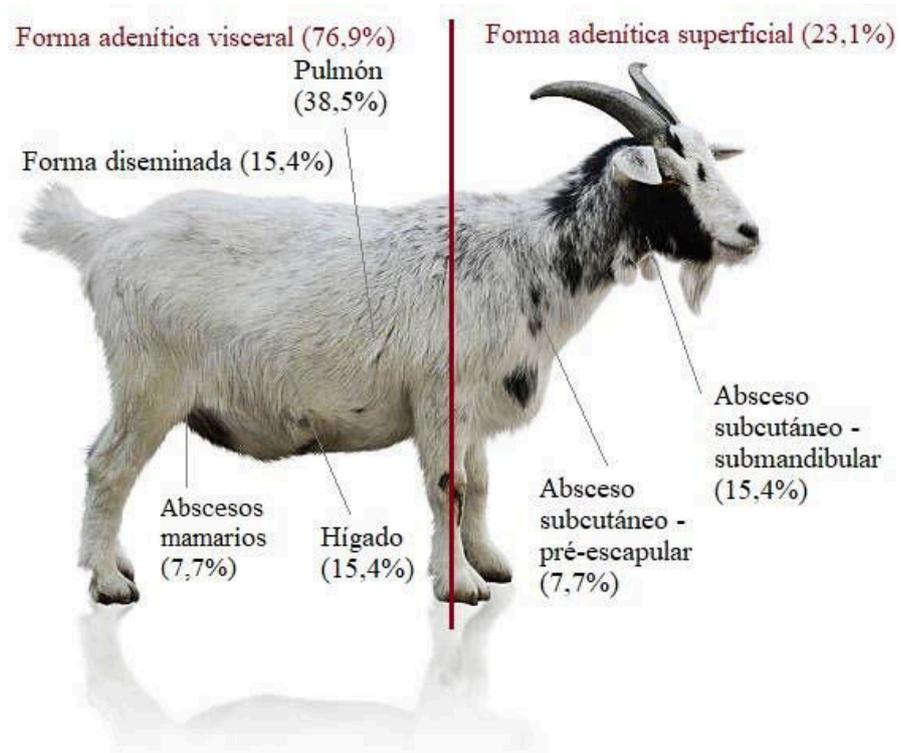


Figura 38: Frecuencia de presentación de las formas clínicas y localización de las lesiones positivas a *C. pseudotuberculosis*.

6.3. Discusión

En los últimos años, se ha observado una preocupación creciente a nivel mundial por el impacto económico de la Linfadenitis caseosa en la industria de los pequeños rumiantes, promoviéndose la implementación de programas de control y erradicación basados en el conocimiento de la prevalencia de la enfermedad y los factores de riesgo asociados (Smith, 2015).

En Portugal, son muy pocos los estudios realizados hasta la fecha sobre esta enfermedad. La presente investigación es el primero estudio epidemiológico sobre la infección por *C. pseudotuberculosis* desarrollado en pequeños rumiantes, en Portugal. Los resultados obtenidos en esta Tesis en la región del Alentejo - que alberga el 60% de la cabaña ovina y el 25% de la cabaña caprina nacional -, confirman que la LC es una enfermedad prevalente en los pequeños rumiantes de este país. Con un 80,5% de granjas afectadas, la dispersión de la infección es similar a la descrita por Debien et al. (2013) en Canadá (84,6%) y por de Farias et al. (2019) en Brasil (88,5%).

A nivel de animal, nuestro trabajo reveló una seroprevalencia real del 16,74%; resultado similar al descrito en la región sur de España (26%) por Gómez-Gascón et al. (2013), que subraya la necesidad de implementar medidas rutinarias de control que incluyan, entre otras, la identificación y aislamiento de animales enfermos y portadores asintomáticos, medidas para minimizar la contaminación ambiental por el material purulento, análisis y cuarentena de los animales de reposición y medidas generales de bioseguridad (aplicación de autovacunas, limpieza, desinfección, etc.).

La dispersión de la LC en los efectivos de ovejas y cabras en una región portuguesa de alta producción de ganado, como el Alentejo, puede llegar a ser un grave problema a nivel nacional al dificultar la certificación de las explotaciones portuguesas como libres de la enfermedad; lo que haría imposible la apertura de mercados internacionales a la producción de pequeños rumiantes. En este contexto, se hace necesaria la implantación de un sistema de vigilancia, con estudios periódicos a gran escala, para estimar la seroprevalencia y características epidemiológicas de la LC en las explotaciones y animales de todo el país, y obtener datos cuantitativos sobre el impacto económico de esta infección en los pequeños rumiantes. Asimismo, la existencia de una plataforma que pudiese a disposición de veterinarios y entidades sanitarias la información actualizada de

ésta y otras enfermedades contagiosas emergentes permitiría establecer la necesidad de implementar medidas de control y erradicación, como ya se hace en otras partes del mundo.

Respecto a los factores de riesgo asociados a la infección por *C. pseudotuberculosis*, el estudio realizado en esta Tesis, aunque preliminar, aporta los primeros datos referidos a esta enfermedad en Portugal. Nuestros resultados sugieren una predisposición cuatro veces mayor de la especie caprina (prevalencia 35,2% & 8,8% en ovejas), lo que difiere de los hallazgos obtenidos por Al-Gaabary et al. (2009) en Egipto, con una prevalencia del 22,1% en ovejas y del 7,8% en cabras. Al margen de la posible influencia de otros factores en nuestro análisis comparativo, debemos recordar que, en ambos trabajos, por su diseño transversal, es imposible alcanzar conclusiones definitivas sobre la causalidad de la infección, siendo necesario desarrollar estudios que aporten mayor evidencia científica. A raíz de estas observaciones nuestro grupo de investigación se propone, además, ampliar el estudio analítico a factores productivos, sanitarios y de manejo, con el objeto de realizar un análisis multivariante.

Encontramos, asimismo, un porcentaje de seropositivos significativamente mayor entre los animales en régimen de producción no extensiva (intensiva y semi-extensiva) y aptitud lechera, debido probablemente a una mayor dispersión de la infección en condiciones de confinamiento y al contacto existente entre los animales antes y durante el ordeño (O'Reilly et al., 2008; Smith, 2015). Como indicamos en la introducción de esta Tesis, *C. pseudotuberculosis* está presente en un 7% de las mastitis descritas en los pequeños rumiantes, debiendo ser considerado en el examen bacteriológico de la leche (Nabih y cols., 2018). Su impacto en la producción a determinado un interés creciente en las explotaciones de cabras lecheras (Nabih et al., 2018).

Finalmente, nuestros datos sugieren que cuanto más grande es la explotación, mayor predisposición tienen los animales a la infección, al ser ésta más frecuente en las explotaciones medianas (50-200 animales) y grandes (> 200 animales). Los resultados hallados coinciden con el modelo matemático diseñado por O'Reilly et al. (2008) para la transmisión de *C. pseudotuberculosis*, que verifica una mayor prevalencia de LC conforme aumenta el tamaño de la granja y el confinamiento de los animales. Esto se debe en gran parte al alto grado de contacto que existe en estas condiciones entre animales susceptibles e infectados y a la larga duración de la infecciosidad en los individuos con

LC, que tras sufrir la infección respiratoria desarrollan abscesos respiratorios y subcutáneos durante toda su vida (O'Reilly et al., 2008).

Coincidiendo con la encuesta de seroprevalencia, durante la Tesis se realizó un examen macroscópico a 335 animales para determinar la frecuencia de lesiones piogranulomatosas e identificación mediante PCR de *C. pseudotuberculosis*. El 17,31% de los animales mostraron abscesos, resultando el 23,61% positivo a *C. pseudotuberculosis*. Los datos encontrados, aunque similares a los descritos por Al-Gaabary et al. (2010) en Egipto (26,9% de animales sacrificados con lesiones purulentas; 25% positivos a *C. pseudotuberculosis*), difieren notablemente de los hallados en Corea (Jung et al., 2015) y Canadá (Debien et al., 2013), con una frecuencia de lesiones del 7,3% y el 35,5% y un porcentaje de aislamiento de *C. pseudotuberculosis* del 70,6% y 68,5%, respectivamente. En base a ello, consideramos que la frecuencia de aislamiento obtenida en nuestra Tesis podría estar subestimada como consecuencia del elevado número de lesiones crónicas analizadas y la posibilidad de que tuviesen baja carga bacteriana.

En cuanto a la localización de las lesiones producidas por *C. pseudotuberculosis*, la forma visceral fue la más frecuente (76,9%) en comparación con la forma subcutánea o superficial (23,1%), con una notable diferencia en la forma de presentación en función de la especie: los abscesos subcutáneos fueron más comunes en el caprino (2 de los 3 casos observados) y la forma visceral en el ovino (8 de los 9 casos descritos), lo que coincide con los hallazgos descritos por otros autores (Williamson, 2001; Baird y Fontaine, 2007; Pugh y Baird, 2012; Latif et al., 2016). Por vísceras, el pulmón fue el órgano más afectado (38,5%), generalmente con un cuadro de microabscesos piogranulomatosos. Estudios sobre las formas clínicas de la enfermedad han comprobado que, en la forma visceral el pulmón es a menudo el órgano más afectado por LC (Malone et al., 2006). Investigaciones previas han destacado que los pequeños rumiantes con afectación orgánica rara vez presentan abscesos externos, por lo que la forma visceral podría constituir un problema muy superior al imaginado (Sherman y Smith, 2009). En los estudios de mortalidad proporcional llevados a cabo por Debien et al. (2013) en Quebec (Canadá), el 54,1% de las cabras afectadas presentaron sólo abscesos internos, el 32,4% sólo abscesos externos y el 13,5% abscesos en ambas localizaciones. Estos mismos autores, señalaron que, a pesar de ser la enfermedad más diagnosticada, la Linfadenitis caseosa no constituía una causa importante de muerte (3,9%), en comparación con otras enfermedades como la

enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D (17,1%), neumonía (13,8%), paratuberculosis (10,5%), listeriosis (6,6%), toxemia de gestación (5,3%) y artritis encefalitis caprina (4,6%). A nivel de matadero, si bien no existen muchos datos sobre la importancia de los abscesos como causa de decomiso, la Linfadenitis caseosa destaca como segunda causa bacteriana de lesiones purulentas en ovino adulto, tras la Neumonía enzoótica (Valcárcel et al., 2013).

Los registros obtenidos en los mataderos regionales son de enorme importancia en el estudio de la epidemiología de las enfermedades animales y deben utilizarse con el fin de promover la salud animal y proteger la salud pública. Se deben realizar en Portugal otros estudios en matadero para esta y otras enfermedades de rumiantes, ya que permiten una evaluación real de la presencia de enfermedades infecciosas y parasitarias en animales de producción para el consumo humano, su caracterización y etiología, impacto económico en la producción de carne y la rentabilidad de las explotaciones.

Aunque la LC no sea de las principales causas de muerte y decomiso de animales en las explotaciones de pequeños rumiantes, el hecho de ser una enfermedad crónica, transmisible a otros animales y al hombre y responsable de caídas económicas graves y no siempre perceptibles al productor, justifica la inversión en su diagnóstico y control, y una mayor sensibilización de médicos veterinarios y ganaderos para conocer las vías de contagio y medidas de prevención. Cuando se establece, la enfermedad es de difícil erradicación, no sólo porque presenta largos períodos de incubación y la respuesta a la terapéutica antibiótica no es efectiva, sino también porque la detección de animales infectados es difícil. Nos corresponde a todos, como actores sanitarios, alertar sobre su peligrosidad y características epidemiológicas y actuar instituyendo planes profilácticos que contemplen la prevención y el control de esta afección.

La Linfadenitis caseosa sigue siendo un desafío importante para las industrias de ganado ovino y caprino, limitando su rentabilidad. El intenso mercado y movimiento de pequeños rumiantes, sin las medidas de bioseguridad necesarias son obstáculos importantes para el control de la Linfadenitis caseosa, manteniendo su prevalencia en niveles altos, lo que indica que deben tomarse medidas de control específicas. Hay varias dificultades que afectan al desarrollo y aplicación de métodos de diagnóstico efectivos e inmunógenos. Todos los intervinientes en la industria caprina y ovina deben concentrar esfuerzos para controlar esta grave enfermedad y contornar las dificultades en su diagnóstico y control.

CONCLUSIONES

1. La dilución sistemática al 1:10 de las muestras de ADN obtenidas a partir de lesiones piogranulomatosas, propuesta en esta Tesis Doctoral con la finalidad de reducir la inhibición enzimática por detritus celulares, no aumentó la validez diagnóstica de la PCR múltiple, por lo que consideramos que sólo debería aplicarse en las lesiones con exceso de material purulento que resulten negativas al protocolo clásico, a fin de descartar falsos negativos.
2. La comparación del ELITEST CLA#CK105A[®] con la PCR múltiple mostró una sensibilidad y especificidad diagnósticas del 100% y el 76,1%, respectivamente, lo que confirma la validez de esta técnica para la detección de casos subclínicos y como herramienta de control en programas de saneamiento.
3. La validez del ELISA para los resultados positivos asegura, asimismo, que los animales positivos a la prueba en zonas con una prevalencia de Linfadenitis caseosa superior o igual al 46% tendrán la enfermedad con una certeza superior o igual al 80%.
4. Con una seroprevalencia a nivel de granja del 75,4% (IC95% [66,4%-84,5%]) y un 16,7% de la cabaña ovina y caprina afectada (IC95% [14,1%-19,4%]), este estudio confirma, por primera vez, el carácter endémico, la importancia sanitaria de la Linfadenitis caseosa en la región portuguesa de Alentejo y en Portugal, así como la necesidad de instaurar medidas rutinarias de control.
5. El estudio analítico de los factores de riesgo asociados a la seropositividad por *C. pseudotuberculosis* sugiere una mayor susceptibilidad de la especie caprina, los animales de aptitud lechera y aquellos criados en régimen de producción no extensivo y/o en granjas de mediano y gran tamaño.
6. El estudio patológico de los casos positivos confirmó la importancia de la forma visceral, especialmente en la especie ovina, siendo el pulmón el órgano más afectado por las lesiones piogranulomatosas típicas de esta enfermedad.

Agradecimientos

Un saludo y un especial agradecimiento al departamento de Sanidad animal – laboratorio de enfermedades infectocontagiosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba – España, en particular a mis directores, Doctor Alfonso Maldonado y Doctora Belén Huerta por todo el apoyo y asesoramiento durante el trabajo doctoral y por las palabras de aliento y ayuda en las adversidades encontradas.

La autora agradece a la administración del laboratorio privado “Vetdiagnos – Cantanhede – Portugal” por todo el apoyo en el procesamiento de muestras patológicas en particular a la Doctora Anabela Almeida; a la directora de servicios oficiales de veterinaria en Portugal (DIV Portalegre – DGAV); a los responsables del matadero (Matadouro Regional Do Alto Alentejo, S.A) por los datos facilitados y la autorización para la toma de muestras, y a los ganaderos de las fincas por poner a disposición sus datos y los animales para concluir este trabajo.

Un especial agradecimiento a Doctora Inês Viegas de ICAAM - *Institute of Mediterranean Agricultural and Environmental Sciences, Institute of Advanced Research and Training, University of Évora* (Portugal) por todo el apoyo en el tratamiento de datos y revisión.

Agradezco a mi Familia, Amigos y Compañeros, su apoyo incondicional a lo largo de estos años.

En particular, al fantástico equipo de profesionales y amigos de CLILEGRE – Clínica Veterinaria de Portalegre, y a mis amigos y compañeros de trabajo en ESAE-IPP, GRACIAS a todos por creer que sería posible superar esta etapa.

The last but not least, a mis familiares de corazón, repartidos por Portalegre, Alvarrões, Alagoa, Beirã-Marvão, Lisboa, Póvoa de Varzim, São Pedro de Rates, Barcelos y Ciudad de México, **GRACIAS**.

Sin cada uno, en su papel y siempre presente, nada hubiera sido posible.

BIBLIOGRAFÍA

- Abebe D & Tessema TS. (2015). Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. Letters in Applied Microbiology; 61:469-476. <https://doi.org/10.1111/lam.12482>.
- Akgul G, Akgul MB, Ozen D, Demyrbylek SK. (2018). Comparison of serum procalcitonin, haptoglobin and C-reactive protein levels in goats with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Indian Journal of Animal Research; 52(12): 1778-1781. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-932>.
- Al-Gaabary MH, Osman SA, Oreiby AF. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. Small Ruminant Research; 87(1-3): 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.008>.
- Al-Gaabary MH, Osman SA, Ahmed MS. (2010). Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. Small Ruminant Research; 94:117-124. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.011>.
- Almeida S, Tiwari S, Mariano D, Souza F, Jamal SB, Coimbra N, Raittz RT, Dorella FA, Carvalho AF, Pereira FL, Soares SC, Leal CAG, Barh D, Ghosh P, Figueiredo H, Moura-Costa LF, Portela RW, Meyer R, Silva A, Azevedo V. (2016). The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing *Caseous lymphadenitis*. Standards in Genomic Sciences; 11:29. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0149-7>.
- Alves JRA, de Farias AEM, Lima GMS, Limeira CH, Alves SF, Pinheiro RR, Faccioli-Martins PY, de Azevedo SS, Alves CJ. (2018). Seroprevalence of caseous lymphadenitis in goats sold in an animal fair in the northeastern semi-arid region of Brazil. Semina: Ciências Agrárias, Londrina; 39(3):1067-1076. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n3p1067> .
- Alves JRA, de Farias AEM, da Silva JD, Viana MP, Lima AMC, Faccioli-Martins PY, Pinheiro RR, Alves FSF, de Azevedo SS, Alves CJ. (2020). Factors

- associated with the seroprevalence of caseous lymphadenitis in sheep from Northeastern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*; 182(105098). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105098>.
- Andrade JSL, Azevedo SS, Teles JAA, Higino SSS, Azevedo EO. (2012). Occurrence and risk factors associated with the *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and goats from the semiarid region of the Paraíba state, North-eastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*; 32(2):116-120. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200004>.
 - Aquino de Sá MC, Gouveia G V, Krewer CC, Veschi JLA, Mattos-Guaraldi AL, Costa MM. (2013). Distribution of *PLD* and *FagA*, *B*, *C* and *D* genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*; 36(2):265-268. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000013>.
 - Arsenault J, Girard C, Dubreuil P, Daignault D, Galarnéau J, Boisclair J. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*; 59(1-2):67-81. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(03\)00060-6](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(03)00060-6).
 - Baird GJ, & Fontaine MC. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*; 137: 179–210. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.07.002>.
 - Barba M, Stewart AJ, Passeler AA, Wooldridge AA, Santen E van, Chamorro MF, Cattley RC, Hathcock T, Hogsette JA, Hu XP. (2015). Experimental Transmission of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar *equi* in Horses by House Flies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 29(2):636-43. <https://doi.org/10.1111/jvim.12545>.
 - Barral TD, Mariutti RB, Arni RK, Santos AJ, Loureiro D, Sokolonski AR, Azevedo V, Borsuk S, Meyer R, Portela RD. (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microbiology Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13454>.

- Bartolomé J, Roca MJ, Marcote E, Moreno R. (1995) *Corynebacterium pseudotuberculosis* adenitis in a Shepherd. *Medicina Clínica (Barcelona)*; 104(18):699-701. PMID: 7769881.
- Belchior SE, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Jensen O. (2006). Actualización sobre Linfadenitis Caseosa: el Agente Etiológico y la Enfermedad. *Veterinaria Argentina*; 23(224):258-278. <http://www.produccion-animal.com.ar/>.
- Bergey HD. (1923) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. American Society for Microbiology. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- Bezos J, Casal C, Romero B, Liandris E, Sánchez N, Vigo V, Domínguez L, Juan L. (2015). Lack of interference with diagnostic testing for tuberculosis in goats experimentally exposed to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *The Veterinary Journal*; 205(1):113-115. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.024>.
- Binns SH, Green LE, Bailey M. (2007). Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary Microbiology*; 123 (1-3):169-179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.015>.
- Boinas F, Mendes S, Pateira L. (2000). Linfadenite caseosa em pequenos ruminantes em Portugal. *Veterinária Técnica*; 10(5):18-23.
- Boysen C, Davis EG, Beard LA, Brian VL, Raghavan RK. (2015). Bayesian geostatistical analysis and ecoclimatic determinants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection among horses. *PLoS ONE* 10(10): e0140666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140666>.
- Brown C, Olander H, Alves S. (1987). Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous Lymphadenitis in a Slaughterhouse Survey of Goats and Sheep in Northeastern Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*; 51(1):46-9. PMID: 3567751.
- Cabo P, Matos A, Fernandes A, Ribeiro M. (2017). Evolution of production and marketing of traditional qualified products from sheep and goat (2003 -2012) *Revista de Ciências Agrárias, Portugal*, 40 (Especial): 329-344.

- Cabi.org (2019). Caseous lymphadenitis. Invasive Species Compendium. Detailed coverage of invasive species threatening livelihoods and the environment worldwide. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/90572#tooverview> . Enero 2021.
- Çetinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, De Baere T, Vaneechoutte M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*; 88(1):75-83. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00089-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00089-5).
- Chikhaoui M & Khoudja FB. (2013). Clinicopathological investigation on caseous lymphadenitis in local breed sheep in Algeria. *Tropical Animal Health and Production*; 45: 1641-1643. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0410-7>.
- 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 and Immuno-diffusion. *Japanese Journal of Veterinary Science* 51(5): 887-891.
- Chirino-Zárraga C, Scaramelli A, Rey-Valeirón C. (2006). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research* 65(1):170-175. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.06.017>.
- Clark KA, Robinson RM, Weishuhn LL, Litton GW, Marburger RG. (1972). Caseous Lymphadenitis in Pronghorns (*Antilocapra americana*). *Journal of Wildlife Diseases*; 8(1):67-71. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-8.1.67>.
- Colom-Cadena A, Velarde R, Salinas J, Borge C, Garca-Bocanegra I, Serrano, Gass D, Bach E, Casas-Daz E, Lopez-Olvera JP, Lavn S, Len-Vizcano L Gregorio Mentaberre G. (2014). Management of a caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. *Acta Veterinaria Scandinavica*; 56(83):2-11. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0083-x>.
- Connor KM, Quirie MM, Baird G, Donachie W. (2000). Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*; 38(7):2633-2637. PMID: 10878055.

- Costa L. (2016). Linfadenite Caseosa no Alto Alentejo, Portugal – Estudo preliminar de prevalência da doença em rebanhos de pequenos ruminantes e Otimização da prova de PCR Clássico no diagnóstico e identificação do *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Publicações Zoetis – Saúde Animal – Portugal. <http://hdl.handle.net/10400.26/18564>.
- Costa L, Maldonado A, Huerta B, Almeida A. (2019) Optimization of a Conventional PCR Assay for the Identification of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* from Pyogenic Lesions. Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry 7(2): 1-10. ISSN: 2348-9790.
- Costa L, Huerta B, Galán-Relaño Á, Gómez-Gascón L, Almeida A, Viegas I, Maldonado A. (2020). Utility assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks. Vet Med Sci. 2020; 00:1–8. <https://doi.org/10.1002/vms3.297>.
- D’Avelar, AM. (2011). Inspeção Sanitária de Ovinos. [Dissertação de Mestrado]. Repositório da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal. <https://catalogo.biblioteca.utad.pt/>.
- de Farias AEM, Alves JRA, Alves FSF, Pinheiro, RR, Faccioli-Martins PY, Lima AMC, Azevedo SS, Alves CJ. (2019). Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. Tropical Animal Health and Production; 51:745-752. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1748-7>.
- Debien E, Hélie P, Buczinski S, Leboeuf A, Bélanger D, Drolet R. (2013). Proportional mortality: A study of 152 goats submitted for necropsy from 13 herds in Quebec, with a special focus on caseous lymphadenitis. Canadian Veterinary Journal; 54:581-587. PMID: 24155449.
- Delano ML, Scott A, Mischler SA, Underwood WJ. (2002) *Corynebacterium Pseudotuberculosis* - an overview | ScienceDirect Topics in Laboratory Animal Medicine (Second Edition). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012263951-7/50017-X>.

- Dercksen DP, Brinkhof JMA, Dekker-Nooren T, van Maanen K, Bode CF, Baird G, Kamp EM. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*; 75 (2): 167-175. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00217-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00217-0).
- Domenis L, Spedicato R, Pepe E, Orusa R, Robetto S. (2018) Caseous Lymphadenitis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*): a review of 98 cases. *Journal of Comparative Pathology*; 161:11-19. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.04.003>.
- Dorneles EMS, Santana JA, Ribeiro D, Dorella FA, Guimarães AS, Moawad MS, Selim SA, Garaldi ALM, Miyoshi A, Ribeiro MG, Gouveia AMG, Azevedo V, Heinemann MB, Lage AP. (2014). Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates. *PlosOne*; 9(6): 1-10. <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/322645>.
- Ermini L & Antenucci P. (2014). *Manuale Pratico delle Malattie deglie Ovini e dei Caprini*. MSD Animal Health. www.saluteovicapriini.it.
- Estadística ESPAÑA (2016). Instituto Nacional de Estadística (INE). TOTAL NACIONAL. Encuesta sobre la estructura de las explotaciones agrícolas, año 2016.
- Estadística PORTUGAL. (2000). Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Regional (DGADR). Produtos com denominação de origem protegida.
- Estadística PORTUGAL. (2009). Instituto Nacional de Estatística (INE). Efetivo Caprino por Municípios.
- Estadística PORTUGAL. (2014). Instituto Nacional de Estatística (INE). Efetivo Ovino por Municípios.
- Estadística PORTUGAL. (2017a). Instituto Nacional de Estatística (INE). Indicators of agriculture and forestry by NUTS, 2016.

- Estatística PORTUGAL. (2017b). Efectivo ovino (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2001) e Categoria (efectivo ovino).
- Estatística PORTUGAL. (2017c). Efectivo caprino (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2013) e Categoria (efectivo caprino).
- Estatística PORTUGAL. (2019) CENSO AGRÍCOLA 2019.
- Estatística PORTUGAL. (2019a) Estatísticas Demográficas – 2019.
- Estatística PORTUGAL. (2019b) RA lentejoNumeros_2019.
- FAOStat (2013). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>.
- FAO (2014). Ano Internacional da Agricultura Familiar 2014, <http://www.fao.org/>, <http://www.fao.org/family-farming-2014/pt/>. Agosto 2018.
- FAOStat (2018). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>.
- Farias APF, Rocha Filho JTR, Marchioro SB, Moreira LS, Marques AS, Aquino de Sá MC, Oliveira AAS, Alcântara ME, Mariutti RB, Arni RK, Trindade SC, Meyer R. (2020). *rSodC* is a potential antigen to diagnose *Corynebacterium pseudotuberculosis* by enzyme-linked immunoassay. *AMB Expr.*, 10(186): 2-8. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01125-0>.
- Ferreira J. (1968). *Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª Edição. ISBN: 84-200-. 0674-2.
- Fontaine MC & Baird GJ. (2008). Caseous Lymphadenitis. *Small Ruminant Research*; 76(1-2):42-48. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.025>.
- Furtado P. (2018). *Inspeção Sanitária de Carnes e Principais Causas de Rejeição Total e Parcial em Ruminantes, Suínos e Solípedes*. [Dissertação de Mestrado]. Repositório da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal. <http://hdl.handle.net/10437/8685>.
- Gascoigne E, Ogden N, Lovatt F, Davies P. (2020). Update on caseous lymphadenitis in sheep. *In Practice*; 42(2):105-114. <https://doi.org/10.1136/inp.m455>.

- Gómez-Gascón L, López P, Cardoso-Toset F, Luque I, Huerta B, Iglesias C, Maldonado A. (2013). Pseudotuberculosis en Andalucía: Actualización del diagnóstico laboratorial. *Producción Animal*; 279:20-29.
- Gray GD, Woolaston RR & Eaton BT. (1995) Breeding for Resistance to Infectious Diseases in Small Ruminants. Monographs, Australian Centre for International Agricultural Research, number 118447. Canberra, AUSTRALIA. ISBN 1863201416. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.118447> .
- Guedes MT, Souza, BC, Sousa TJ, Loureiro D, MouraCosta LF, Azevedo V, Meyer R, Portela RW. (2015) Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 35(8): 701-708. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000800001>.
- Guimarães AS, Carmo FB, Heinemann MB, Portela RWD, Meyer R, Lage AP, Seyffert N, Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia AMG. (2011a). High seroprevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Veterinary Research*; 7(68):2-5. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/68> .
- Guimarães AS, Carmo FB, Pauletti RB, Seyffert N, Ribeiro D, Lage AP, Heinemann MB, Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia AMG. (2011b). Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *The IIOAB (Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology) Journal. Review: Veterinary Microbiology*; 2(2): 33-43. ISSN: 0976-3104.
- Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. (2010). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470958209>.
- Heggelund L, Gaustad P, Havelsrud OE, Blom J, Borgen L, Sundest A, Sorum H, Froland SS. (2015). *Corynebacterium pseudotuberculosis* Pneumonia in a Veterinary Student Infected During Laboratory Work. *Open Forum Infectious Diseases*. Brief Report. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv053> .

- Hoelzle LE, Scherrer T, Muntwyler J, Wittenbrink MM, Philipp W, Hoelzle K. (2013). Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*; 164(3-4):359-65. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.031> .
- Honoré-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL (2003). Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of Sample Preparation and DNA Extraction. *Journal of Clinical Microbiology*; 41(6): 2323–2329. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2323-2329.2003> .
- Hosseinzadeh S, Haghkhal M, Zehtab K, Shekarforoush Sh (1996) The frequency of caseous lymphadenitis in sheep slaughtered in Shiraz abattoir. *Journal of Veterinary Faculty, University of Tehran*; 51(1–2):81–88.
- Huerta B, Gómez-Gascón L, Vela AI, Fernández-Garayzábal, JF, Casamayor A, Tarradas C, Maldonado A. (2013) Comparison of two biochemical methods for identifying *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats. Short Communication. *The Veterinary Journal*; 196(3): 552-554. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.008> .
- HYPHEN BioMed. (2007) Kit for the detection of IgG antibodies in sera from sheep or goats with caseous lymphadenitis (CLA). France. D.750.02/CK105A.
- Ilhan Z (2013) Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. *Revue de Médecine Vétérinaire*; 164(2):60-66. https://www.revmedvet.com/2013/RMV164_60_66.pdf .
- Jacobson RH. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Revue Scientifique et Technique. Off. int. Epiz.*; 17:469–486. <https://doi.org/10.20506/rst.17.2.1119> .
- Jiao Y, Chen J, Zeng X. (2012). Acute paradoxical reaction of cervical tuberculous lymphadenitis prompted by a misuse of etimicin sulphate. *Case Reports 2012*; 2012:bcr1220115458. <http://dx.doi.org/10.1136/bcr.12.2011.5458>.

- Join-Lambert OF, Ouache M, Canioni D, Beretti J-L, Blanche S, Berche P, Kayal S. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *The Pediatric Infectious Disease Journal*; 25(9): 848-851. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000234071.93044.77>.
- Jung BY, Lee SH, Kim HY, Byun JW, Shin DH, Kim D, Kwak D. (2015). Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Tropical Animal Health Production*; 47(4):657-661. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0773-z>.
- Kaba J, Kutschke L, Gerlach GF. (2001). Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Veterinary Microbiology*; 78(2):155-163. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00284-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00284-4) .
- Kumar J, Tripathi BN, Kumar R, Sonawane GG, Dixit SK. (2013). Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. *Tropical Animal Health and Production*; 45:1429-1435. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0381-8>.
- Latif NAA, Abdullah FFJ, Othman AM, Rina A, Chung ELK, Zamri-Saad M, Saharee AA, Haron AW, Mohd-Lila MA. (2015). Isolation and detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the reproductive organs and associated lymph nodes of non-pregnant does experimentally inoculated through intradermal route in chronic form. *Veterinary World*; 8(7):924-927. EISSN: 2231-0916; 924-927.
- Latif NAA, Abba Y, Jesse FFA, Chung ELT, Zamri-Saad M, Saharee AA, Zakaria Z, Haron AW, Mohd-Lila MA. (2016). Histopathological assessment of chronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in the reproductive tract and iliac lymph node of Katjang does. *Comparative Clinical Pathology*; 26, 147–154. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2357-3>.
- Mahmood ZKH, Jesse FF, Saharee AA, Jasni S, Yusoff R, Wahid H. (2015) Clinico-Pathological Changes in Goats Challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Exotoxin (PLD). *American Journal of Animal and*

- Veterinary Sciences. 10(3):112-132.
<https://doi.org/10.3844/ajavsp.2015.112.132>.
- Mahmood ZK, Jin, ZAM, Jesse FF, Saharee AA, Sabri J, Yusoff R, Haron AW. (2016) Relationship between the *Corynebacterium pseudotuberculosis*, phospholipase D inoculation and the fertility characteristics of crossbred Boer bucks. Livestock Science 191; 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.06.015>.
 - Malone FE, Fee SA, Kamp EM, King DC, Baird GJ, O'Reilly KM, Murdock FEA. (2006) A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of sheep. Irish Veterinary Journal; 59 (1) 19-21. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-59-1-19>.
 - Márquez RJA, Carvajal A, Maldonado A, Gordon SV, Gómez-Guillamón F, Sánchez-Baro A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J. (2013) Influence of cohabitation between domestic goat (*Capra aegagrus hircus*) and Iberian Ibex (*Capra pirenaica hispanica*) on seroprevalence of infectious diseases. Short Communication. European Journal of Wildlife Research; 60:387-390. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0785-9>.
 - Matos AC, Dias AP, Morais M, Figueira L, Martins MH, Matos M, Pinto ML, Coelho AC. (2015) Granuloma Coinfection with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, and *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Five Hunted Red deer (*Cervus elaphus*) in Portugal. Journal of Wildlife Diseases, 51(3), 793-794. <https://doi.org/10.7589/2014-09-240>.
 - Mellau LSB, Nonga HE, ED Karimuribo ED. (2010). A slaughterhouse survey of lung lesions in slaughtered stocks at Arusha, Tanzania. Preventive Veterinary Medicine, 97(2):77-82. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.08.008>.
 - Mendonça A. (2012). Guia Sanitário para Criadores de Pequenos Ruminantes. Instituto Politécnico de Bragança. ISBN 978-972-745-137-1. <http://id.bnportugal.gov.pt/bib/bibnacional/1838183>.
 - Menzies PI, Hwang Y-T, Prescott JF. (2004). Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of

- Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*; 100(1-2):129-37. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.012>.
- Minozzi G, Mattiello S, Grosso L, Crepaldi P, Chessa S, Pagnacco G. (2017) First insights in the genetics of caseous lymphadenitis in goats. *Italian Journal of Animal Science*; 16(1):31-38. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1250610>.
 - Nabih AM, Hussein HA, El-Wakeel SA, El-Razik KAA, Gomaa AM. (2018) *Corynebacterium pseudotuberculosis* mastitis in Egyptian dairy goats. *Veterinary World*; 11(11): 1574-1580. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1574-1580>.
 - Nassar AF, Miyashiro S, Gregori F, Piatti RM, Daniel GT, Gregory L. (2014). Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Small Ruminant Research*; 116(1,3):229-232. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.10.016>.
 - Nassar AF, Daniel GT, Ruiz R, Miyashiro S, Scannapieco EM, Neto JS, Gregory L. (2015). Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. *Animal Pathology / Scientific Article*; 82:1-6. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000692013>.
 - Odhah MN, Jesse FFA, Chung ELT, Zaid Mahmood Z, Haron AW, Lila MAM, 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. *Microbial Pathogenesis*; 135(103628). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103628>.
 - OIE (2018) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.
 - Oliveira M, Barroco C, Mottola C, Santos R, Lemsaddek A, Tavares, L, Semedo-Lemsaddek T. (2014). First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *BMC Veterinary Research*; 21(10):218. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0218-3>.

- Oreiby AF. (2014). Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. *Small Ruminant Research*; 123(1):160-166. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.11.013>.
- Oreiby AF, Hegazy YM, Al-Gaabary MH, Osman SA, Marzok MA, Abushhiwaa M. (2015). Studies on clinical identification, ELISA, bacteriological isolation, PCR and X-ray radiography for diagnosis of ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Animal and Veterinary Advances*; 14(9):250-253. ISSN: 1680-5593 © Medwell Journals.
- O'Reilly KM; Green LE; Malone FE; Medley GF. (2008). Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*; 83(3-4): 242-259. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.08.002>.
- Pal A & Chakravarty AK. (2020). Genetics and Breeding for Disease Resistance of Livestock; 19:277-283. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816406-8.00019-X>.
- Pacheco LGC, Pena RR, Castro TLP, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MNL, Oliveira SC, Meyer R, Alves FSF, 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):480-486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46997-0>.
- Paton MW. (2003). Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Veterinary Journal*; 81(1-2):91-95. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2003.tb11443.x>.
- Paton MW. (2010). The epidemiology and control of Caseous Lymphadenitis in Australian Sheep Flocks. [PhD Thesis]. Murdoch University. <http://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/1715>.
- Pavan ME, Robles C, Cairó FM, Marcellino R, Pettinari MJ. (2012). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis

using the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). Research in Veterinary Science; 92(2): 202-206. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.007>.

- Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM, Kerr TG. (1997). Human Lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and review. Clinical Infectious Diseases; 24(2):185-191. <https://doi.org/10.1093/clinids/24.2.185>.
- PISA.NET - Programa Informático de Saúde Animal (Rel.Técnicos P.E. 2010.0). www.dgv.min-agricultura.pt . Septiembre 2020.
- PORDATA (2019). Base de dados Portugal contemporâneo. www.pordata.pt.
- Prescott JF, Menzies PI, Hwang Y-T. (2002). An interferon-gamma assay diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. Veterinary Microbiology; 88(3):287-297. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00121-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00121-9).
- Primera L, Zambrano J, Boggiano E, Vera M, Carrero L, Chirino-Zárraga C. (2016). Linfadenitis Caseosa en Rebaños Ovinos de la Península de Paraguaná, Municipio Falcón, Estado Falcón, Venezuela. Revista Científica; XXVI(1):5-12. ISSN: 0798-2259. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=959/95944832003>.
- Pugh DG & Baird AN. (2012). Sheep and Goat Medicine. 2ªEd. Saunders. ISBN: 9781455754854. Chapter 10:268-270, Chapter 12:346.
- Quinn P, Markey B, Leonard F, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES. (2011). Veterinary Microbiology and Microbial Disease, 2nd ed. Dublin: Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-405-15823-7.
- Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de março de 2017, relativo aos controlos oficiais e outras atividades oficiais que visam assegurar a aplicação da legislação em matéria de géneros alimentícios e alimentos para animais e das regras sobre saúde e bem-estar animal, fitossanidade e produtos fitofarmacêuticos. <https://eur-lex.europa.eu/>.

- Ribeiro D, Dorella FA, Pacheco LGC, Seyffert N, Castro TLP, Portela RWD, Meyer R, Miyoshi A, Luvizotto MCR, Azevedo V. (2013). Subclinical Diagnosis of Caseous Lymphadenitis Based on ELISA in Sheep from Brazil. *Journal of Bacteriology and Parasitology*; 4(3),170:1-4. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000170> .
- Rocha B. (2011). *Corynebacterium pseudotuberculosis* em bovinos de leite no Estado da Califórnia, EUA. *Veterinary Medicine*. p: 49-54.
- Ruiz H, Ferrer LM, Ramos JJ, Baselga C, Alzuguren O, Tejedor MT, Miguel R, Lacasta D. (2020) The Relevance of Caseous Lymphadenitis as a Cause of Culling in Adult Sheep. *Animals*; 10(11), 1962. <https://doi.org/10.3390/ani10111962>.
- Sargison N. (2008). *Sheep Flock Health – a planned approach*. Blackwell Publishing. ISBN: 978-1-405-16044-5.
- Selim SA. (2001). Oedematous Skin Disease of Buffalo in Egypt. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*; 48(4):241-58. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00451.x>.
- Sellyei B, Bányai K, Bartha D, Hajtós I, Fodor L, Makrai L. (2017). Multilocus Sequencing of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biotype Ovis Strain. *Hindawi BioMed Research International*; 1762162:1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/1762162>.
- Sherman DM & Smith MC. (2009). *Goat Medicine* (2 ed.). Wiley-Blackwell.
- Shpigel NY, Elad D, Yeruham I, Winkler M, Saran A. (1993). An outbreak of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in an Israeli dairy herd. *Veterinary Record*; 133(4):89-94. <https://doi.org/10.1136/vr.133.4.89> .
- Smith, Bradford P. Editor-in-Chief. (2015). *Large Animal Internal Medicine*. Missouri: Elsevier, Fifth Edition. Chapter 31:631-632.
- Soares SC, Abreu VAC, Ramos RTJ, Cerdeira L, Silva A, Baumbach J, Trost E, Tauch A, Hirata R Jr., Mattos-Guaraldi AL, Miyoshi A, Azevedo V. (2012). PIPS:

- Pathogenicity Island Prediction Software. PLOS ONE 7(2): e30848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030848> .
- Soares SC, Silva A, Trost E, Blom J, Ramos R, Carneiro A, Ali A, Santos AR, Pinto AC, Diniz C, Barbosa EGV, Dorella FA, Aburjaile F, Rocha FS, Nascimento KKF, Guimarães LC, Almeida S, Hassan SS, Bakhtiar SM, Pereira UP, Abreu VAC, Schneider MPC, Miyoshi A, Tauch A, Azevedo V. (2013). The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar *ovis* and *equi* Strains. PlosOne; 8(1): 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053818>.
 - Spier, SJ & Azevedo, V. (2016). Clinical Commentary-*Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: Increasing frequency and spread to new regions of North America. Equine Veterinary Education; 29(8): 436-439. <https://doi.org/10.1111/eve.12589>.
 - Stanford K, Brogden KA, McClelland LA, Kozub, GC, Audibert, F. (1998). The incidence of Caseous Lymphadenitis in Alberta Sheep and assessment of Impact by Vaccination with Commercial and Experimental vaccines. Canadian Journal of Veterinary Research; 62(1): 38–43. PMID: 9442938.
 - Stauber E, Armstrong P, Chamberlain K, Gorgen B. (1973). Caseous Lymphadenitis in white-tailed deer. Journal of Wildlife Diseases; 9(1):56-57. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-9.1.56>.
 - Torres LFC, Ribeiro D, Hirata Jr R, Pacheco LGC, Souza MC, Santos LC, Santos CS, Salah M, da Costa MM, Ribeiro MG, Selim SA, Azevedo VAC, Mattos-Guaraldi AL. (2013). Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. Memorial Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 108(3): 272-279. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000300003>.
 - Thrusfield M & Christley R. (2018). Veterinary Epidemiology. 4th ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd (2018). <https://doi.org/doi:10.1002/9781118280249> .

- Underwood WJ, Blauwiekel R, Delano ML, Gillesby R, Mischler SA, Schoell A. (2015). Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). *Laboratory Animal Medicine*. 2015: 623–694. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00015-8>.
- Valcárcel F, Vilallonga D, Aguilar A, Sánchez M. (2013). Etiología de los decomisos en un matadero de ovino. *AIDA, XV Jornadas sobre Producción Animal*, Tomo II, 804-806. https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/comunicaciones/2013_PA_14.pdf.
- Velasco DJ & Fernández BV. (2007). Estudio Patológico de Caso Clínico de Linfadenitis Caseosa Ovina. *Corynebacteriosis*. I Congreso Virtual Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Comunidad Virtual de Veterinaria.org. <http://veterinaria.org/asociaciones/aevedi/00139CV>.
- Voigt K, Baird GJ, Munro F, Murray F, Brülisauer F. (2012). Eradication of caseous lymphadenitis under extensive management conditions on a Scottish hill farm. *Small Ruminant Research*; 106(1):21-24. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.014>.
- Williamson LH. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 17(2):359-71, vii. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30033-5](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30033-5).
- Windsor PA. (2011). Control of Caseous Lymphadenitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 27(1):193-202. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.019>.
- Windsor PA. (2014). Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Veterinary Medicine: Research and Reports*; 2014(5):11-22. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S44814>.

- Zavoshti FR, Khoojine A, Helan J, Hassanzadeh B, Heydari A. (2012). Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Compendium of Clinical Pathology*. 21: 667-671. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1154-7>.

Webgrafia

- <http://pt.wikipedia.org> y <http://www.portalegredigital.biz/pt>. Septiembre 2020.
- Winepi. <http://www.winepi.net/sp/index.htm> . Diciembre 2020.
- www.mapa.gob.es, Ovino-caprino - Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Diciembre 2020.

ANEXOS

1. **ANEXO 1:** Cuestionario.
2. **ANEXO 2:** Resultados de la encuesta de seroprevalencia.
3. **ANEXO 3:** Costa L, Huerta B, Galán-Relaño Á, Gómez-Gascón L, Almeida A, Viegas I, Maldonado A (2020) Utility assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks. *Vet Med Sci.* 2020; 00:1–8. <https://doi.org/10.1002/vms3.297>.
4. **ANEXO 4:** Costa L, Maldonado A, Huerta B, Almeida A (2019) Optimization of a Conventional PCR Assay for the Identification *Corynebacterium Pseudotuberculosis* from Pyogenic Lesions. *J Vet Sci Ani Husb* 7(2): 201. ISSN: 2348-9790.
5. **ANEXO 5:** Lina Costa; Alfonso Maldonado; Belén Huerta. (2019) Estudio Descriptivo sobre la Pseudotuberculosis en Pequeños Ruminantes en la Región del Alto Alentejo (Portugal) y Determinación de la Utilidad de la Técnica de Diagnóstico ELISA (ELITEST CLA # CK105A®). Presentación de Poster en el VII Congreso científico de investigadores en formación de la Universidad de Córdoba.
6. **Anexo 6:** Lina Costa (2016). LINFADENITE CASEOSA NO ALTO ALENTEJO, PORTUGAL – Estudo preliminar de prevalência da doença em rebanhos de pequenos ruminantes afetados e Otimização da prova de PCR Clássico no diagnóstico e identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. PUBLICAÇÃO ZOETIS – SAÚDE ANIMAL – PORTUGAL. <http://hdl.handle.net/10400.26/18564> .

Cuestionario

INFORMACIÓN EXPLOTACIÓN:

DATA: ____/____/____ IDENTIFICACIÓN EXPLOTACIÓN _____

CONCELHO _____ FREGUESIA _____

ESPÉCIE: ovina / caprina APTITUD PRODUCTIVA: lechera / cárnica

RÉGIMEN PRODUCCIÓN: extensivo / semi-extensivo / intensivo Nº TOTAL EFETIVO _____

TAMAÑO EXPLOTACIÓN: Pequeño (< 50) / mediano (50-200) / grande (> 200)

INFORMACIÓN ANIMALES:

DEFINICIÓN DE CASO para identificación de los animales enfermos y la presencia de lesiones compatibles con LC

Presencia de abcessos externos o internos, lesiones purulentas encapsuladas o non, presencia de material purulento al corte de organos.

INFORMACIÓN MUESTRAS:

Identificación muestra	Suero SI / NO	Lesión Si / No	Localización lesión	Anotaciones
Código explotación / 1				
Código explotación / 2				
Código explotación / 3				
Código explotación / 4				
Código explotación / 5				
Código explotación / 6				
Código explotación / 7				
Código explotación / 8				
Código explotación / 9				
Código explotación / 10				
Código explotación / 11				

OBSERVACIONES: _____

ANEXO 2: Resultados de la encuesta de seroprevalencia.

EXPLOTACIONES

Nº explotación	Localización	Especie	Aptitud	Sistema de cría	Censo	ELISA
VD49L	Urra / Portalegre	caprino	carne	extensivo	4	Positivo
VD03C	Sé e S. Lourenço	caprino	carne	extensivo	5	Negativo
VD06L	Carreiras Portalegre	ovino	carne	extensivo	5	Negativo
VD28B	Carreiras / Portalegre	caprino	carne	extensivo	5	Positivo
VD28A	Alegrete / Portalegre	caprino	carne	extensivo	5	Positivo
VD37G	Ribeira de Nisa / Portalegre	ovino	carne	extensivo	6	Positivo
VD25C	Ribeira de Nisa / Portalegre	ovino	carne	extensivo	6	Positivo
VD69F	Carreiras Portalegre	caprino	carne	extensivo	8	Positivo
VD84F	Sé e S. Lourenço / Portalegre	ovino	carne	extensivo	8	Positivo
VD43F	Reguengo / Portalegre	caprino	carne	extensivo	9	Positivo
VD69N	Alegrete / Portalegre	caprino	carne	extensivo	9	Positivo
VD12J	Urra/Portalegre	caprino	carne	extensivo	10	Positivo
VD36B	Alagoa / Portalegre	caprino	carne	extensivo	10	Positivo
VD62L	Reguengo Portalegre	ovino	carne	extensivo	11	Positivo
VD74D	Ribeira de Nisa / Portalegre	caprino	carne	extensivo	11	Positivo
VD79N	União Sé e São Lourenço Portalegre	ovino	carne	extensivo	13	Positivo
VD23I	Reguengo / Portalegre	ovino	carne	extensivo	13	Positivo
VA34B	Alagoa Portalegre	ovino	carne	extensivo	14	Negativo
VD26H	Alegrete Portalegre	ovino	carne	extensivo	16	Positivo
VD45M	Alegrete Portalegre	ovino	carne	extensivo	16	Negativo
VD58H	Sé e S. Lourenço / Portalegre	caprino	carne	extensivo	17	Positivo

VD68C	Sé e S.Lourenço / Portalegre	caprino	carne	extensivo	17	Positivo
VD06A	Alagoa / Portalegre	ovino	carne	extensivo	17	Positivo
VD80J	Sé e S. Lourenço / Portalegre	ovino	carne	extensivo	17	Negativo
VD78C	Sé e s. Lourenço / Portalegre	ovino	carne	extensivo	18	Positivo
VD97D	Alegrete / Portalegre	ovino	carne	extensivo	19	Negativo
VD15D	Alegrete / Portalegre	ovino	carne	extensivo	19	Positivo
VD90C	União Sé e São Lourenço Portalegre	ovino	carne	extensivo	20	Positivo
VD75J	Alegrete Portalegre	ovino	carne	extensivo	20	Positivo
VD90M	Alagoa Portalegre	ovino	carne	extensivo	20	Positivo
VD17B	Carreiras Portalegre	ovino	carne	extensivo	23	Positivo
VD83B	Reguengo Portalegre	ovino	carne	extensivo	23	Negativo
VD75E	Alegrete Portalegre	caprino	carne	extensivo	23	Positivo
VJ13D	Vaiamonte Monforte	ovino	carne	extensivo	23	Positivo
VD82L	Alegrete Portalegre	ovino	carne	extensivo	25	Negativo
VH28A	Cabeço de Vide Fronteira	caprino	carne	extensivo	25	Positivo
VD130	Alagoa Portalegre	ovino	carne	extensivo	25	Negativo
VD31L	Alegrete / Portalegre	ovino	carne	extensivo	26	Negativo
VD71M	União Sé e São Lourenço Portalegre	ovino	carne	extensivo	27	Positivo
WZ11J	Montalvão/Nisa	ovino	carne	extensivo	30	Positivo
VD86L	Sé e S. Lourenço / Portalegre	ovino	carne	extensivo	32	Negativo
VD76B	Reguengo Portalegre	caprino	carne	extensivo	33	Positivo
VD50A	Alegrete / Portalegre	ovino	carne	extensivo	34	Positivo
VC65B	Crato e Mártires / Crato	ovino	carne	extensivo	34	Positivo

VB27B	São Salvador da Aramenha Marvão	caprino	carne	extensivo	34	Positivo
VD48M	Alagoa Portalegre	ovino	carne	extensivo	36	Negativo
VD04D	União Sé e São Lourenço Portalegre	ovino	carne	extensivo	36	Positivo
WZ06A	Alpalhão/Nisa	ovino	carne	extensivo	42	Positivo
VD19L	Reguengo Portalegre	caprino	leite	extensivo	43	Positivo
VD59I	Alegrete Portalegre	ovino	carne	extensivo	45	Negativo
VJ13D	Vaiamonte Monforte	caprino	carne	extensivo	45	Positivo
VD41N	Urro/Portalegre	ovino	carne	extensivo	52	Positivo
WZ72B	Montalvão / Nisa	ovino	carne	extensivo	55	Positivo
WZ72B	Montalvão / Nisa	caprino	carne	extensivo	64	Positivo
VJ06E	Assumar Monforte	ovino	carne	extensivo	67	Positivo
WZ60H	Montalvão / Nisa	caprino	carne	extensivo	69	Positivo
WZ60H	Montalvão / Nisa	ovino	carne	extensivo	69	Positivo
VD35D	Urro/Portalegre	ovino	carne	extensivo	83	Negativo
VH19D	Alter do Chão / Alter do Chão	caprino	carne	extensivo	105	Positivo
VD50A	Alegrete Portalegre	caprino	carne	extensivo	109	Positivo
VD62B	Fortios / Portalegre	caprino	carne	extensivo	117	Positivo
VD73M	Carreiras / Portalegre	ovino	carne	extensivo	119	Positivo
WZ75C	São Matias/Nisa	ovino	carne	extensivo	145	Positivo
VA02A	Póvoa e Meadas Castelo de Vide	caprino	leite	extensivo	156	Positivo
VD86B	Reguengo Portalegre	ovino	carne	extensivo	162	Positivo
VA02A	Póvoa e Meadas Castelo de Vide	ovino	carne	extensivo	167	Positivo
VH28A	Cabeço de Vide Fronteira	ovino	carne	extensivo	177	Positivo
VD75N	Reguengo Portalegre	ovino	carne	extensivo	194	Positivo
WZ35A	Alpalhão/Nisa	ovino	carne	extensivo	224	Positivo
VD29D	Urro/Portalegre	ovino	carne	extensivo	230	Positivo
VD39D	Urro/Portalegre	caprino	leite	extensivo	250	Positivo

VD86B	Reguengo / Portalegre	caprino	leite	extensivo	255	Negativo
WZ66G	São Matias/Nisa	ovino	leite	extensivo	273	Negativo
VD66L	Alagoa Portalegre	ovino	carne	extensivo	308	Positivo
WZ12G	Alpalhão / Portalegre	ovino	carne	extensivo	321	Positivo
VD39D	Urro/Portalegre	ovino	carne	extensivo	420	Positivo
VC12B	Crato e Mártires Crato	ovino	leite	semi- extensivo	430	Positivo
VD38A	Alegrete Portalegre	ovino	leite	semi- extensivo	444	Positivo
WZ30I	Amieira do Tejo Nisa	caprino	leite	intensivo	450	Positivo
VD01O	Carreiras / Portalegre	ovino	carne	extensivo	600	Positivo
WZ49G	São Matias / Nisa	ovino	leite	extensivo	700	Positivo
VB73A	São Salvador da Aramenha / Marvão	ovino	leite	intensivo	871	Positivo

ANIMALES

Nº muestra suero	Especie	Aptitud	Sistema de cría	ELISA
1	caprino	carne	extensivo	NEG
2	caprino	carne	extensivo	NEG
3	caprino	carne	extensivo	NEG
4	caprino	carne	extensivo	NEG
5	ovino	carne	extensivo	NEG
6	ovino	carne	extensivo	POS
7	ovino	carne	extensivo	NEG
8	ovino	carne	extensivo	NEG
9	ovino	carne	extensivo	NEG
10	ovino	carne	extensivo	NEG
11	ovino	carne	extensivo	NEG
12	ovino	carne	extensivo	NEG
13	ovino	carne	extensivo	NEG
14	ovino	carne	extensivo	NEG
15	caprino	carne	extensivo	POS
16	caprino	carne	extensivo	POS
17	caprino	carne	extensivo	POS
18	caprino	carne	extensivo	NEG
19	caprino	carne	extensivo	POS
20	caprino	carne	extensivo	POS
21	caprino	carne	extensivo	NEG
22	caprino	carne	extensivo	POS
23	caprino	carne	extensivo	POS
24	caprino	carne	extensivo	NEG
25	caprino	carne	extensivo	NEG
26	caprino	carne	extensivo	POS
27	caprino	carne	extensivo	NEG
28	caprino	carne	extensivo	NEG
29	caprino	carne	extensivo	POS
30	caprino	carne	extensivo	POS
31	caprino	carne	extensivo	NEG
32	caprino	carne	extensivo	POS
33	caprino	carne	extensivo	POS
34	caprino	carne	extensivo	POS
35	caprino	carne	extensivo	POS
36	caprino	carne	extensivo	POS
37	caprino	carne	extensivo	POS
38	caprino	carne	extensivo	NEG
39	caprino	carne	extensivo	POS
40	caprino	carne	extensivo	POS
41	caprino	carne	extensivo	NEG
42	caprino	carne	extensivo	POS

43	caprino	carne	extensivo	NEG
44	caprino	carne	extensivo	NEG
45	caprino	carne	extensivo	POS
46	caprino	carne	extensivo	NEG
47	ovino	carne	extensivo	NEG
48	ovino	carne	extensivo	NEG
49	ovino	carne	extensivo	NEG
50	ovino	carne	extensivo	NEG
51	ovino	carne	extensivo	NEG
52	caprino	carne	extensivo	NEG
53	caprino	carne	extensivo	POS
54	caprino	carne	extensivo	NEG
55	caprino	carne	extensivo	POS
56	caprino	carne	extensivo	NEG
57	ovino	carne	extensivo	NEG
58	ovino	carne	extensivo	NEG
59	ovino	carne	extensivo	NEG
60	ovino	carne	extensivo	NEG
61	ovino	carne	extensivo	POS
62	ovino	carne	extensivo	POS
63	ovino	carne	extensivo	POS
64	ovino	carne	extensivo	POS
65	ovino	carne	extensivo	NEG
66	ovino	carne	extensivo	POS
67	ovino	carne	extensivo	NEG
68	ovino	carne	extensivo	POS
69	ovino	carne	extensivo	NEG
70	ovino	carne	extensivo	NEG
71	ovino	carne	extensivo	NEG
72	ovino	carne	extensivo	NEG
73	ovino	carne	extensivo	NEG
74	ovino	carne	extensivo	NEG
75	ovino	carne	extensivo	NEG
76	ovino	carne	extensivo	NEG
77	ovino	carne	extensivo	NEG
78	caprino	carne	extensivo	NEG
79	caprino	carne	extensivo	NEG
80	caprino	carne	extensivo	NEG
81	caprino	carne	extensivo	NEG
82	caprino	carne	extensivo	POS
83	caprino	carne	extensivo	POS
84	caprino	carne	extensivo	NEG
85	caprino	carne	extensivo	POS
86	caprino	carne	extensivo	POS
87	caprino	carne	extensivo	NEG
88	caprino	carne	extensivo	NEG

89	caprino	carne	extensivo	NEG
90	caprino	carne	extensivo	NEG
91	caprino	carne	extensivo	POS
92	caprino	carne	extensivo	NEG
93	caprino	carne	extensivo	NEG
94	caprino	carne	extensivo	NEG
95	caprino	carne	extensivo	POS
96	caprino	carne	extensivo	NEG
97	caprino	carne	extensivo	POS
98	caprino	carne	extensivo	NEG
99	caprino	carne	extensivo	POS
100	caprino	carne	extensivo	NEG
101	caprino	carne	extensivo	NEG
102	caprino	carne	extensivo	NEG
103	caprino	carne	extensivo	POS
104	caprino	carne	extensivo	NEG
105	caprino	carne	extensivo	NEG
106	caprino	carne	extensivo	NEG
107	caprino	carne	extensivo	NEG
108	caprino	carne	extensivo	NEG
109	caprino	carne	extensivo	POS
110	caprino	carne	extensivo	POS
111	caprino	carne	extensivo	POS
112	ovino	carne	extensivo	NEG
113	ovino	carne	extensivo	POS
114	ovino	carne	extensivo	POS
115	ovino	carne	extensivo	POS
116	ovino	carne	extensivo	POS
117	ovino	carne	extensivo	POS
118	ovino	carne	extensivo	NEG
119	ovino	carne	extensivo	NEG
120	ovino	carne	extensivo	NEG
121	ovino	carne	extensivo	NEG
122	ovino	carne	extensivo	POS
123	ovino	carne	extensivo	POS
124	ovino	carne	extensivo	POS
125	ovino	carne	extensivo	POS
126	ovino	carne	extensivo	POS
127	ovino	carne	extensivo	POS
128	ovino	carne	extensivo	NEG
129	ovino	carne	extensivo	NEG
130	ovino	carne	extensivo	POS
131	ovino	carne	extensivo	POS
132	ovino	carne	extensivo	POS
133	ovino	carne	extensivo	POS
134	ovino	carne	extensivo	NEG

135	ovino	carne	extensivo	POS
136	ovino	carne	extensivo	POS
137	ovino	carne	extensivo	POS
138	ovino	carne	extensivo	NEG
139	ovino	carne	extensivo	NEG
140	ovino	carne	extensivo	NEG
141	ovino	carne	extensivo	POS
142	ovino	carne	extensivo	POS
143	ovino	carne	extensivo	POS
144	ovino	carne	extensivo	NEG
145	ovino	carne	extensivo	POS
146	ovino	carne	extensivo	POS
147	ovino	carne	extensivo	NEG
148	ovino	carne	extensivo	NEG
149	ovino	carne	extensivo	NEG
150	ovino	carne	extensivo	POS
151	ovino	carne	extensivo	POS
152	ovino	carne	extensivo	NEG
153	ovino	carne	extensivo	NEG
154	ovino	carne	extensivo	NEG
155	ovino	carne	extensivo	NEG
156	ovino	carne	extensivo	NEG
157	caprino	carne	extensivo	NEG
158	caprino	carne	extensivo	NEG
159	caprino	carne	extensivo	POS
160	caprino	carne	extensivo	POS
161	caprino	carne	extensivo	NEG
162	caprino	carne	extensivo	POS
163	caprino	carne	extensivo	POS
164	caprino	carne	extensivo	NEG
165	caprino	carne	extensivo	NEG
166	caprino	carne	extensivo	NEG
167	ovino	carne	extensivo	NEG
168	ovino	carne	extensivo	NEG
169	ovino	carne	extensivo	POS
170	ovino	carne	extensivo	NEG
171	ovino	carne	extensivo	POS
172	ovino	carne	extensivo	NEG
173	ovino	carne	extensivo	NEG
174	ovino	carne	extensivo	POS
175	ovino	carne	extensivo	NEG
176	ovino	carne	extensivo	POS
177	ovino	carne	extensivo	POS
178	ovino	carne	extensivo	POS
179	ovino	carne	extensivo	POS
180	ovino	carne	extensivo	POS

181	ovino	carne	extensivo	NEG
182	ovino	carne	extensivo	NEG
183	ovino	carne	extensivo	POS
184	ovino	carne	extensivo	POS
185	ovino	carne	extensivo	POS
186	ovino	carne	extensivo	POS
187	ovino	carne	extensivo	POS
188	ovino	carne	extensivo	POS
189	ovino	carne	extensivo	NEG
190	ovino	carne	extensivo	POS
191	ovino	carne	extensivo	POS
192	ovino	carne	extensivo	NEG
193	ovino	carne	extensivo	NEG
194	ovino	carne	extensivo	POS
195	ovino	carne	extensivo	POS
196	ovino	carne	extensivo	NEG
197	ovino	carne	extensivo	NEG
198	ovino	carne	extensivo	NEG
199	ovino	carne	extensivo	NEG
200	ovino	carne	extensivo	NEG
201	ovino	carne	extensivo	NEG
202	caprino	carne	extensivo	POS
203	caprino	carne	extensivo	NEG
204	caprino	carne	extensivo	NEG
205	caprino	carne	extensivo	NEG
206	caprino	carne	extensivo	NEG
207	caprino	carne	extensivo	POS
208	caprino	carne	extensivo	POS
209	caprino	carne	extensivo	NEG
210	caprino	carne	extensivo	NEG
211	caprino	carne	extensivo	NEG
212	caprino	carne	extensivo	NEG
213	caprino	carne	extensivo	POS
214	caprino	carne	extensivo	NEG
215	ovino	carne	extensivo	NEG
216	ovino	carne	extensivo	NEG
217	ovino	carne	extensivo	NEG
218	ovino	carne	extensivo	POS
219	ovino	carne	extensivo	NEG
220	ovino	carne	extensivo	POS
221	ovino	carne	extensivo	POS
222	ovino	carne	extensivo	NEG
223	ovino	carne	extensivo	NEG
224	ovino	carne	extensivo	NEG
225	ovino	carne	extensivo	POS
226	ovino	carne	extensivo	NEG

227	ovino	carne	extensivo	NEG
228	ovino	carne	extensivo	NEG
229	ovino	carne	extensivo	NEG
230	ovino	carne	extensivo	NEG
231	ovino	carne	extensivo	NEG
232	ovino	carne	extensivo	NEG
233	ovino	carne	extensivo	NEG
234	ovino	carne	extensivo	NEG
235	ovino	carne	extensivo	NEG
236	ovino	carne	extensivo	NEG
237	ovino	carne	extensivo	NEG
238	ovino	carne	extensivo	POS
239	ovino	carne	extensivo	NEG
240	ovino	carne	extensivo	NEG
241	ovino	carne	extensivo	POS
242	ovino	carne	extensivo	NEG
243	ovino	carne	extensivo	NEG
244	ovino	carne	extensivo	NEG
245	caprino	carne	extensivo	POS
246	caprino	carne	extensivo	NEG
247	caprino	carne	extensivo	NEG
248	caprino	carne	extensivo	POS
249	caprino	carne	extensivo	POS
250	caprino	carne	extensivo	NEG
251	caprino	carne	extensivo	NEG
252	caprino	carne	extensivo	NEG
253	caprino	carne	extensivo	NEG
254	caprino	carne	extensivo	NEG
255	caprino	leite	extensivo	NEG
256	caprino	leite	extensivo	POS
257	caprino	leite	extensivo	POS
258	caprino	leite	extensivo	NEG
259	caprino	leite	extensivo	POS
260	caprino	leite	extensivo	NEG
261	caprino	leite	extensivo	NEG
262	caprino	leite	extensivo	POS
263	caprino	leite	extensivo	POS
264	caprino	leite	extensivo	POS
265	caprino	leite	extensivo	POS
266	ovino	carne	extensivo	POS
267	ovino	carne	extensivo	NEG
268	ovino	carne	extensivo	NEG
269	ovino	carne	extensivo	NEG
270	ovino	carne	extensivo	NEG
271	ovino	carne	extensivo	NEG
272	ovino	carne	extensivo	NEG

273	ovino	carne	extensivo	NEG
274	ovino	carne	extensivo	NEG
275	ovino	carne	extensivo	NEG
276	ovino	leite	semi-extensivo	NEG
277	ovino	leite	semi-extensivo	NEG
278	ovino	leite	semi-extensivo	NEG
279	ovino	leite	semi-extensivo	NEG
280	ovino	leite	semi-extensivo	POS
281	ovino	leite	semi-extensivo	POS
282	ovino	leite	semi-extensivo	POS
283	ovino	leite	semi-extensivo	POS
284	ovino	leite	semi-extensivo	POS
285	ovino	leite	semi-extensivo	NEG
286	ovino	leite	intensivo	NEG
287	ovino	leite	intensivo	POS
288	ovino	leite	intensivo	POS
289	ovino	leite	intensivo	POS
290	ovino	leite	intensivo	NEG
291	ovino	leite	intensivo	POS
292	ovino	leite	intensivo	NEG
293	ovino	leite	intensivo	NEG
294	ovino	leite	intensivo	NEG
295	ovino	leite	intensivo	NEG
296	<u>ovino</u>	leite	intensivo	POS
297	ovino	leite	extensivo	NEG
298	ovino	leite	extensivo	NEG
299	ovino	leite	extensivo	NEG
300	ovino	leite	extensivo	NEG
301	ovino	leite	extensivo	NEG
302	ovino	leite	extensivo	NEG
303	ovino	leite	extensivo	NEG
304	ovino	leite	extensivo	NEG
305	ovino	leite	extensivo	NEG
308	ovino	leite	extensivo	NEG
311	caprino	carne	extensivo	NEG
312	caprino	carne	extensivo	NEG
313	caprino	carne	extensivo	POS
314	caprino	carne	extensivo	NEG
317	caprino	carne	extensivo	NEG

323	caprino	carne	extensivo	POS
324	caprino	carne	extensivo	POS
325	caprino	carne	extensivo	POS
326	ovino	carne	extensivo	POS
327	ovino	carne	extensivo	NEG
328	ovino	carne	extensivo	NEG
329	ovino	carne	extensivo	NEG
330	ovino	carne	extensivo	NEG
331	ovino	carne	extensivo	NEG
332	ovino	carne	extensivo	NEG
333	ovino	carne	extensivo	POS
334	ovino	carne	extensivo	NEG
335	ovino	carne	extensivo	NEG
336	ovino	carne	extensivo	NEG
337	ovino	carne	extensivo	NEG
338	ovino	carne	extensivo	NEG
339	ovino	carne	extensivo	NEG
340	ovino	carne	extensivo	NEG
341	ovino	carne	extensivo	NEG
342	ovino	carne	extensivo	NEG
343	ovino	carne	extensivo	NEG
344	ovino	carne	extensivo	NEG
345	ovino	carne	extensivo	NEG
346	ovino	carne	extensivo	NEG
347	ovino	carne	extensivo	NEG
348	ovino	carne	extensivo	POS
349	ovino	carne	extensivo	NEG
350	ovino	carne	extensivo	POS
351	ovino	carne	extensivo	NEG
352	ovino	carne	extensivo	NEG
353	ovino	carne	extensivo	NEG
354	ovino	carne	extensivo	NEG
355	ovino	carne	extensivo	POS
356	ovino	carne	extensivo	NEG
357	ovino	carne	extensivo	NEG
358	ovino	carne	extensivo	NEG
359	ovino	carne	extensivo	NEG
360	ovino	carne	extensivo	POS
361	ovino	carne	extensivo	NEG
362	ovino	carne	extensivo	NEG
363	ovino	carne	extensivo	NEG
364	ovino	carne	extensivo	POS
365	ovino	carne	extensivo	POS
366	ovino	carne	extensivo	POS
367	ovino	carne	extensivo	NEG
368	ovino	carne	extensivo	NEG

369	ovino	carne	extensivo	POS
370	ovino	carne	extensivo	POS
371	ovino	carne	extensivo	POS
372	ovino	carne	extensivo	POS
373	ovino	carne	extensivo	NEG
374	ovino	carne	extensivo	NEG
375	ovino	carne	extensivo	NEG
376	ovino	carne	extensivo	NEG
377	ovino	carne	extensivo	NEG
378	ovino	carne	extensivo	NEG
379	ovino	carne	extensivo	NEG
380	ovino	carne	extensivo	NEG
381	ovino	carne	extensivo	NEG
382	ovino	carne	extensivo	NEG
383	ovino	carne	extensivo	NEG
384	ovino	carne	extensivo	NEG
385	ovino	carne	extensivo	NEG
386	ovino	carne	extensivo	NEG
387	ovino	carne	extensivo	POS
388	ovino	carne	extensivo	POS
389	ovino	carne	extensivo	NEG
390	ovino	carne	extensivo	NEG
391	ovino	carne	extensivo	NEG
392	ovino	carne	extensivo	NEG
393	ovino	carne	extensivo	NEG
394	ovino	carne	extensivo	NEG
395	ovino	carne	extensivo	NEG
396	ovino	carne	extensivo	NEG
397	ovino	carne	extensivo	NEG
398	ovino	carne	extensivo	NEG
399	ovino	carne	extensivo	NEG
400	ovino	carne	extensivo	NEG
401	ovino	carne	extensivo	NEG
402	ovino	carne	extensivo	NEG
403	ovino	carne	extensivo	NEG
404	ovino	carne	extensivo	NEG
405	ovino	carne	extensivo	NEG
406	ovino	carne	extensivo	NEG
407	ovino	carne	extensivo	NEG
408	ovino	carne	extensivo	NEG
409	ovino	carne	extensivo	NEG
410	ovino	carne	extensivo	NEG
411	ovino	carne	extensivo	NEG
412	ovino	carne	extensivo	NEG
413	ovino	carne	extensivo	NEG
414	ovino	carne	extensivo	POS

415	ovino	carne	extensivo	NEG
416	ovino	carne	extensivo	NEG
417	ovino	carne	extensivo	NEG
418	ovino	carne	extensivo	NEG
419	ovino	carne	extensivo	NEG
420	ovino	carne	extensivo	NEG
421	ovino	carne	extensivo	NEG
422	ovino	carne	extensivo	POS
423	ovino	carne	extensivo	NEG
424	ovino	carne	extensivo	NEG
425	ovino	carne	extensivo	NEG
426	ovino	carne	extensivo	NEG
427	ovino	carne	extensivo	NEG
428	ovino	carne	extensivo	NEG
429	ovino	carne	extensivo	NEG
430	ovino	carne	extensivo	NEG
431	ovino	carne	extensivo	NEG
432	ovino	carne	extensivo	NEG
433	ovino	carne	extensivo	NEG
434	ovino	carne	extensivo	NEG
435	ovino	carne	extensivo	NEG
436	ovino	carne	extensivo	NEG
437	ovino	carne	extensivo	NEG
438	ovino	carne	extensivo	NEG
439	ovino	carne	extensivo	NEG
440	caprino	leite	intensivo	NEG
441	caprino	leite	intensivo	POS
442	caprino	leite	intensivo	POS
443	caprino	leite	intensivo	POS
444	caprino	leite	intensivo	POS
445	caprino	leite	intensivo	POS
446	caprino	leite	intensivo	POS
447	caprino	leite	intensivo	POS
448	caprino	leite	intensivo	POS
449	caprino	leite	intensivo	POS
450	ovino	carne	extensivo	NEG
451	ovino	carne	extensivo	NEG
452	ovino	carne	extensivo	NEG
453	ovino	carne	extensivo	NEG
454	ovino	carne	extensivo	NEG
455	ovino	carne	extensivo	NEG
456	ovino	carne	extensivo	NEG
457	ovino	carne	extensivo	NEG
458	ovino	carne	extensivo	NEG
459	ovino	carne	extensivo	NEG
460	ovino	carne	extensivo	NEG

461	ovino	carne	extensivo	NEG
462	ovino	carne	extensivo	NEG
463	ovino	carne	extensivo	NEG
464	ovino	carne	extensivo	NEG
465	ovino	carne	extensivo	NEG
466	ovino	carne	extensivo	NEG
467	ovino	carne	extensivo	NEG
468	ovino	carne	extensivo	NEG
469	ovino	carne	extensivo	NEG
470	ovino	carne	extensivo	NEG
471	ovino	carne	extensivo	NEG
472	ovino	carne	extensivo	NEG
473	ovino	carne	extensivo	NEG
474	ovino	carne	extensivo	NEG
475	ovino	carne	extensivo	NEG
476	ovino	carne	extensivo	NEG
477	ovino	carne	extensivo	NEG
478	ovino	carne	extensivo	NEG
479	ovino	carne	extensivo	NEG
480	ovino	carne	extensivo	NEG
481	ovino	carne	extensivo	NEG
482	ovino	carne	extensivo	NEG
483	ovino	carne	extensivo	NEG
484	ovino	carne	extensivo	NEG
485	ovino	carne	extensivo	NEG
486	ovino	carne	extensivo	NEG
487	ovino	carne	extensivo	NEG
488	ovino	carne	extensivo	NEG
489	ovino	carne	extensivo	NEG
490	ovino	carne	extensivo	NEG
491	ovino	carne	extensivo	NEG
492	ovino	carne	extensivo	NEG
493	ovino	carne	extensivo	NEG
494	ovino	carne	extensivo	NEG
495	ovino	carne	extensivo	POS
496	ovino	carne	extensivo	NEG
497	ovino	carne	extensivo	POS
498	caprino	carne	extensivo	NEG
499	caprino	carne	extensivo	NEG
500	caprino	carne	extensivo	NEG
501	caprino	carne	extensivo	NEG
502	caprino	carne	extensivo	NEG
503	caprino	carne	extensivo	NEG
504	caprino	carne	extensivo	POS
505	caprino	carne	extensivo	NEG
506	caprino	carne	extensivo	NEG

507	caprino	carne	extensivo	NEG
508	caprino	leite	extensivo	NEG
509	caprino	leite	extensivo	NEG
510	caprino	leite	extensivo	NEG
511	caprino	leite	extensivo	NEG
512	caprino	leite	extensivo	NEG
513	caprino	leite	extensivo	NEG
514	caprino	leite	extensivo	NEG
515	caprino	leite	extensivo	NEG
516	caprino	leite	extensivo	NEG
517	caprino	leite	extensivo	NEG
518	ovino	carne	extensivo	NEG
519	ovino	carne	extensivo	NEG
520	ovino	carne	extensivo	NEG
521	ovino	carne	extensivo	NEG
522	ovino	carne	extensivo	NEG
523	ovino	carne	extensivo	NEG
524	ovino	carne	extensivo	NEG
525	ovino	carne	extensivo	NEG
526	ovino	carne	extensivo	NEG
527	ovino	carne	extensivo	NEG
528	ovino	carne	extensivo	POS
529	ovino	carne	extensivo	POS
530	ovino	carne	extensivo	POS
531	ovino	carne	extensivo	POS
532	ovino	carne	extensivo	NEG
533	ovino	carne	extensivo	POS
534	ovino	carne	extensivo	POS
535	ovino	carne	extensivo	POS
536	ovino	carne	extensivo	POS
537	ovino	carne	extensivo	POS
538	ovino	carne	extensivo	NEG
539	ovino	carne	extensivo	NEG
540	ovino	carne	extensivo	NEG
541	ovino	carne	extensivo	NEG
542	ovino	carne	extensivo	POS
543	ovino	carne	extensivo	NEG
544	ovino	carne	extensivo	NEG
545	ovino	carne	extensivo	NEG
546	ovino	carne	extensivo	NEG
547	ovino	carne	extensivo	NEG
548	ovino	carne	extensivo	NEG
549	ovino	carne	extensivo	NEG
550	ovino	carne	extensivo	NEG
551	ovino	carne	extensivo	NEG
552	ovino	carne	extensivo	NEG

553	ovino	carne	extensivo	NEG
554	ovino	carne	extensivo	NEG
555	ovino	carne	extensivo	NEG
556	ovino	carne	extensivo	NEG
557	ovino	carne	extensivo	NEG
558	caprino	carne	extensivo	NEG
559	caprino	carne	extensivo	NEG
560	caprino	carne	extensivo	POS
561	caprino	carne	extensivo	POS
562	caprino	carne	extensivo	POS
563	caprino	carne	extensivo	POS
564	caprino	carne	extensivo	POS
565	caprino	carne	extensivo	POS
566	caprino	carne	extensivo	NEG
567	caprino	carne	extensivo	POS
568	caprino	carne	extensivo	NEG
569	caprino	carne	extensivo	POS
570	caprino	carne	extensivo	POS
571	caprino	carne	extensivo	NEG
572	caprino	carne	extensivo	POS
573	caprino	carne	extensivo	NEG
574	caprino	carne	extensivo	NEG
575	caprino	carne	extensivo	POS
576	caprino	carne	extensivo	NEG
577	caprino	carne	extensivo	POS
578	caprino	carne	extensivo	POS
579	caprino	carne	extensivo	POS
580	caprino	carne	extensivo	NEG
	caprino	carne	extensivo	NEG
581	caprino	carne	extensivo	POS
582	caprino	carne	extensivo	POS
583	caprino	carne	extensivo	POS
584	caprino	carne	extensivo	POS
585	caprino	carne	extensivo	POS
586	caprino	carne	extensivo	POS
587	caprino	carne	extensivo	POS
588	ovino	carne	extensivo	POS
589	ovino	carne	extensivo	NEG
590	ovino	carne	extensivo	NEG
591	ovino	carne	extensivo	NEG
592	ovino	carne	extensivo	NEG
593	ovino	carne	extensivo	NEG
594	ovino	carne	extensivo	POS
595	ovino	carne	extensivo	NEG
596	ovino	carne	extensivo	NEG
597	ovino	carne	extensivo	NEG

598	ovino	carne	extensivo	NEG
599	ovino	carne	extensivo	NEG
600	ovino	carne	extensivo	POS
601	ovino	carne	extensivo	NEG
602	ovino	carne	extensivo	NEG
603	ovino	carne	extensivo	NEG
604	ovino	carne	extensivo	NEG
	ovino	carne	extensivo	NEG
605	ovino	carne	extensivo	NEG
606	ovino	carne	extensivo	NEG
607	ovino	carne	extensivo	NEG
608	ovino	carne	extensivo	NEG
609	ovino	carne	extensivo	NEG
610	ovino	carne	extensivo	NEG
611	ovino	carne	extensivo	NEG
612	ovino	carne	extensivo	NEG
613	ovino	carne	extensivo	NEG
614	ovino	carne	extensivo	NEG
615	ovino	carne	extensivo	NEG
616	ovino	carne	extensivo	NEG
617	ovino	carne	extensivo	NEG
701	caprino	leite	extensivo	POS
702	caprino	leite	extensivo	POS
703	caprino	leite	extensivo	POS
704	caprino	leite	extensivo	POS
705	caprino	leite	extensivo	NEG
706	caprino	leite	extensivo	POS
707	caprino	leite	extensivo	POS
708	caprino	leite	extensivo	POS
709	caprino	leite	extensivo	POS
710	caprino	leite	extensivo	POS
711	ovino	leite	semi-extensivo	POS
712	ovino	leite	semi-extensivo	POS
713	ovino	leite	semi-extensivo	POS
714	ovino	leite	semi-extensivo	POS
715	ovino	leite	semi-extensivo	POS
716	ovino	leite	semi-extensivo	POS
717	ovino	leite	semi-extensivo	NEG
718	ovino	leite	semi-extensivo	POS
719	ovino	leite	semi-extensivo	POS

720	ovino	leite	semi- extensivo	POS
721	ovino	leite	extensivo	POS
722	ovino	leite	extensivo	POS
723	ovino	leite	extensivo	NEG
724	ovino	leite	extensivo	POS
725	ovino	leite	extensivo	POS
726	ovino	leite	extensivo	POS
727	ovino	leite	extensivo	POS
728	ovino	leite	extensivo	POS
729	ovino	leite	extensivo	POS
730	ovino	carne	extensivo	POS
731	ovino	carne	extensivo	POS
732	ovino	carne	extensivo	NEG
733	ovino	carne	extensivo	NEG
734	ovino	carne	extensivo	POS
735	ovino	carne	extensivo	NEG
736	ovino	carne	extensivo	NEG
737	ovino	carne	extensivo	POS
738	ovino	carne	extensivo	NEG
739	ovino	carne	extensivo	POS
740	caprino	carne	extensivo	POS
741	caprino	carne	extensivo	POS
742	caprino	carne	extensivo	POS
743	caprino	carne	extensivo	POS
744	caprino	carne	extensivo	POS
745	caprino	carne	extensivo	POS
746	caprino	carne	extensivo	POS
747	caprino	carne	extensivo	POS
748	caprino	carne	extensivo	POS
749	caprino	carne	extensivo	POS
750	ovino	carne	extensivo	POS
751	ovino	carne	extensivo	NEG
752	ovino	carne	extensivo	POS
753	ovino	carne	extensivo	POS
754	ovino	carne	extensivo	NEG
755	ovino	carne	extensivo	NEG
756	ovino	carne	extensivo	NEG
757	ovino	carne	extensivo	NEG
758	ovino	carne	extensivo	NEG
759	ovino	carne	extensivo	NEG
760	caprino	leite	extensivo	NEG
761	caprino	leite	extensivo	NEG
762	caprino	leite	extensivo	NEG
763	caprino	leite	extensivo	NEG
764	caprino	leite	extensivo	NEG
765	caprino	leite	extensivo	NEG

766	caprino	leite	extensivo	NEG
767	caprino	leite	extensivo	NEG
768	caprino	leite	extensivo	NEG
769	caprino	leite	extensivo	POS
770	ovino	carne	extensivo	NEG
771	ovino	carne	extensivo	NEG
772	ovino	carne	extensivo	POS
773	ovino	carne	extensivo	NEG
774	ovino	carne	extensivo	NEG
775	ovino	carne	extensivo	NEG
776	ovino	carne	extensivo	NEG
777	ovino	carne	extensivo	NEG
778	ovino	carne	extensivo	NEG
779	ovino	carne	extensivo	NEG
780	ovino	carne	extensivo	POS
781	ovino	carne	extensivo	POS
782	ovino	carne	extensivo	NEG
783	ovino	carne	extensivo	NEG
784	ovino	carne	extensivo	NEG
785	ovino	carne	extensivo	NEG
786	ovino	carne	extensivo	NEG
787	ovino	carne	extensivo	NEG
788	ovino	carne	extensivo	NEG
789	ovino	carne	extensivo	NEG
790	ovino	carne	extensivo	NEG
791	ovino	carne	extensivo	NEG
792	ovino	carne	extensivo	NEG
793	ovino	carne	extensivo	NEG
794	ovino	carne	extensivo	NEG
795	ovino	carne	extensivo	NEG
796	ovino	carne	extensivo	NEG
797	ovino	carne	extensivo	NEG
798	ovino	carne	extensivo	NEG
799	ovino	carne	extensivo	NEG
800	ovino	carne	extensivo	NEG
801	ovino	carne	extensivo	NEG
802	ovino	carne	extensivo	NEG
803	ovino	carne	extensivo	NEG
804	ovino	carne	extensivo	NEG
805	ovino	carne	extensivo	POS
806	ovino	carne	extensivo	NEG
807	ovino	carne	extensivo	NEG
808	ovino	carne	extensivo	NEG
809	ovino	carne	extensivo	NEG
810	caprino	carne	extensivo	NEG
811	caprino	carne	extensivo	POS

812	caprino	carne	extensivo	NEG
813	caprino	carne	extensivo	POS
814	caprino	carne	extensivo	NEG
815	caprino	carne	extensivo	NEG
816	caprino	carne	extensivo	NEG
817	caprino	carne	extensivo	POS
818	caprino	carne	extensivo	NEG
819	caprino	carne	extensivo	POS
820	ovino	carne	extensivo	POS
821	ovino	carne	extensivo	NEG
822	ovino	carne	extensivo	POS
823	ovino	carne	extensivo	POS
824	ovino	carne	extensivo	NEG
825	ovino	carne	extensivo	POS
826	ovino	carne	extensivo	NEG
827	ovino	carne	extensivo	POS
828	ovino	carne	extensivo	POS
829	ovino	carne	extensivo	POS
830	ovino	carne	extensivo	POS
831	ovino	carne	extensivo	POS
832	ovino	carne	extensivo	NEG
833	ovino	carne	extensivo	NEG
834	ovino	carne	extensivo	NEG
835	ovino	carne	extensivo	NEG
836	ovino	carne	extensivo	NEG
837	ovino	carne	extensivo	POS
838	ovino	carne	extensivo	NEG
839	ovino	carne	extensivo	POS
840	ovino	carne	extensivo	POS
841	ovino	carne	extensivo	POS
842	ovino	carne	extensivo	POS
843	ovino	carne	extensivo	NEG
844	ovino	carne	extensivo	POS
845	ovino	carne	extensivo	POS
846	ovino	carne	extensivo	POS
848	ovino	carne	extensivo	POS
847	ovino	carne	extensivo	POS

ANEXO 3: Costa L, Huerta B, Galán-Relaño Á, Gómez-Gascón L, Almeida A, Viegas I, Maldonado A (2020) Utility assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks. *Vet Med Sci.* 2020; 00:1–8. <https://doi.org/10.1002/vms3.297>.

DOI: 10.1002/vms3.297

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Utility assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks

Lina Costa¹  | Belén Huerta² | Ángela Galán-Relaño² | Lúcia Gómez-Gascón² | Anabela Almeida³ | Inês Viegas⁴ | Alfonso Maldonado²

¹Department of Agrarian and Veterinary Sciences, Agrarian School of Elvas, Polytechnic Institute of Portalegre, Portalegre, Portugal

²Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Córdoba, Spain

³Vetdiagnos, Veterinary Diagnostic Laboratory, Cantanhede, Portugal

⁴ICAAM - Institute of Mediterranean Agricultural and Environmental Sciences, Institute of Advanced Research and Training, University of Évora, Évora, Portugal

Correspondence

Lina Costa, Rua Martinho Azevedo Coutinho nº3 r/c esq, 7300-817 Portalegre, Portugal.
Email: lina_costa@ippportalegre.pt

Abstract

The actual prevalence of CLA (caseous lymphadenitis) in small ruminant flocks is underestimated in many countries, and because it is not a notifiable disease, it will continue to spread without data and information about its real economic impact. The difficulty in the accurate identification of the causative agent in internal subclinical cases allows the disease to spread within and between flocks. This research intends to assess the utility of an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) test in the detection of internal subclinical cases of CLA in farms and to simultaneously add data on the seroprevalence of the disease in Portugal. Sera from 756 small ruminants, 70% sheep (528/756) and 30% goats (228/756) were screened for antibodies against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using the ELISA technique based on a recombinant phospholipase D (ELITEST CLA # CK105A®). The animals showing internal lesions ($n = 58$) were sampled for the identification of the aetiological agent. In this investigation, the prevalence of CLA was 34% (258/756), with the ELISA test showing a low specificity (78%) and high sensitivity (100%). The proof was able to detect 57% (13/23) of subclinical cases of CLA confirmed by *postmortem* examination and conventional PCR (polymerase chain reaction). The results also reveal that goats have a higher propensity for the disease, and dairy farms and non-extensive production units appear to be more susceptible to CLA. This research clarifies an actual problem and pointed out the importance of CLA in small ruminant herds in Portugal. Finally seems to demonstrate that the ELISA test is a good diagnostic tool for use in CLA eradication programmes.

KEYWORDS

caseous lymphadenitis, ELISA, Portugal, seroprevalence, small ruminants

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/vms3.297>

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Veterinary Medicine and Science* Published by John Wiley & Sons Ltd

1 | INTRODUCTION

Corynebacterium pseudotuberculosis is the aetiological agent of CLA (caseous lymphadenitis), a chronic bacterial disease that characteristically affects sheep and goats (Baird & Fontaine, 2007; Quinn, Markey, Leonard, Hartigan, & Fanning, 2011). This microorganism is a Gram-positive, facultative anaerobic, intracellular rod, catalase-positive, pleomorphic, non-mobile and non-sporulated classified as an actinomycete (*Actinomycetales: Corinebacteriaceae*) (Brown, Olander, & Alves, 1987; Baird & Fontaine, 2007; Quinn et al., 2011). Considering the biotypes of *C. pseudotuberculosis*, based on the nitrate reduction capacity, nitrate-negative strains are referred as serotype I (biotype *ovis*) and nitrate-positive strains are classified as serotype II (biotype *equi*). Isolates from sheep and goats are usually nitrate-negative (serotype I-biotype *ovis*), whereas isolated strains from horses are typically nitrate-positive; the isolates of bovine origin are variable (Soares et al., 2013; Torres et al., 2013). The pathogenesis of *C. pseudotuberculosis* strains is related to the secretion of toxin factors such as Phospholipase D (PLD) and the lipid content of its cell walls (Torres et al., 2013). Phospholipase D is a sphingomyelin-specific phospholipase that is able to dissociate sphingomyelin into phosphate and choline, and a specific exotoxin from *C. pseudotuberculosis*; which is responsible for the lysis of sphingomyelin and agent's passing. This mechanism causes plasma flow from inside the vessels to lymph nodes and for increased vascular permeability. PLD is responsible for many biologic actions such as dermo necrosis, destruction of macrophages in goat's infections, interferes with the process of chemotaxis of neutrophils in sheep and is lethal to phagocytic cells, actions that contribute to the dissemination of the agent from the point of infection to other parts of the organism (Aquino de Sá et al., 2013; Smith Bradford, 2015; Mahmood et al., 2016).

The disease occurs worldwide with high prevalence values and causes serious economic losses, particularly in sheep farms and it is more evident in small producers (Al-Gaabary, Osman, Ahmed, & Oreiby, 2010; Aquino de Sá et al., 2013; Arsenault et al., 2003; Jung et al., 2015; Malone et al., 2006; Zavoshti, Khojine, Helan, Hassanzadeh, & Heydari, 2012). CLA is considered one of the most important diseases, in economic terms, of sheep and goats in the USA, Canada and Brazil causing significant losses in countries where the disease is considered endemic (Çetinkaya et al., 2002; Farias et al., 2019; Guimarães, 2011; Latif et al., 2016; Paton, 2003; Pavan, Robles, Cairó, Marcelino, & Pettinari, 2011; Windsor, 2014). In Australia, CLA and Johne's disease (paratuberculosis) are currently considered the two most important chronic diseases in sheep (Paton, 2010; Windsor, 2014).

This disease continues to spread worldwide, not only in small ruminants but also with pathogenic relevance in horses (Barba et al., 2015; Boysen, Davis, Beard, Lubbers, & Raghavan, 2015; Guedes et al., 2015; Spier & Azevedo, 2017), cattle (Rocha, 2011; Shpigel, Elad, Yeruham, Winkler, & Saran, 1993; Smith Bradford, 2015), wild ungulates such as the Iberian ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) (Colom-Cadena et al., 2014) and swine (Oliveira et al., 2014). In sheep and goats, the disease appears in two major forms, namely, external form, with the development of subcutaneous and lymph

nodes abscesses, and the internal form, without any obvious clinical symptoms. The number of infected animals in a herd presenting visceral lesions can be significantly higher than those showing superficial signs of the disease (Costa, Maldonado, Huerta, & Almeida, 2019; Smith Bradford, 2015). *C. pseudotuberculosis* is a very infectious organism with the capacity to persist in the environment for several months (Almeida et al., 2016; Brown et al., 1987; Quinn et al., 2011). These facts support the difficulty in monitoring the status of disease as well as its ease in spreading.

As a non-notifiable disease, CLA remains, in some countries, of unknown real prevalence and economic relevance. This situation is significant in countries such as Portugal, where small ruminants represent an important part of the national livestock production. Continental Portugal has a total estimate of 2,218,000 sheep and 326,000 goats, and almost half (46%) of this herd is in the study region, the province of Alentejo (1,324,000 sheep and 108,000 goats) (Statistics PORTUGAL, 2009;). The annual production of lamb meat and certified sheep cheese has its largest representation in Alto Alentejo (Statistics PORTUGAL, 2000, 2014).

If the disease has been established in a herd, eradication of infected animals is difficult due to poor response to antibiotic therapy (Gómez-Gascón et al., 2013; Velasco & Fernández, 2002), and difficulties in detection of infected animals (Aquino de Sá et al., 2013). The difficulty in accurately identifying subclinical cases of CLA favours the spread of the disease within and between herds. The screening and elimination of subclinical animals is an important measure in disease control programmes (Farias et al., 2019; Nassar et al., 2014). ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) is an economical and simple method to perform as a routine technique in CLA diagnosis; however, ELISA tests are not being used in the control and eradication programmes of CLA, either because they present low sensitivity and specificity (Menzies, Hwang, & Prescott, 2004), have not been fully tested or have not been prepared for both species, sheep and goat (Hoelzle et al., 2013; Oreiby Atef, 2014). In large-scale control and eradication programmes, or for the detection of animals with unapparent infection and, consequently, contributing to preventing the dispersion of the disease, ELISA would be the most suitable technique (Hoelzle et al., 2013; Menzies et al., 2004; Nassar et al., 2014; Oreiby et al., 2015; Oreiby Atef, 2014). Very few studies have evaluated the best diagnostic technique to detect subclinical cases of CLA (Barral et al., 2019), but the use of serodiagnosis as a tool for the control and eradication of CLA in goat farms has been successfully implemented in some cases (Derckeson et al., 2000; Kaba, Kutschke, & Gerlach, 2001). However, in sheep, especially in individuals with unapparent infection and internal abscesses, serological tests show low reliability due to reduced sensitivity and differences in specificity when compared to those from tests using the culture of *C. pseudotuberculosis* (Binns, Green, & Bailey, 2007).

This study aims to assess the utility of the ELISA technique using the commercial ELISA ELITEST CLA # CK105A[®] for detection of internal subclinical cases of CLA in small ruminants. Furthermore, this field study provides data on the seroprevalence of CLA in sheep and goats living in the province of Alentejo in Southern Portugal.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals and samples

The determination of the sample was based on the census generously provided by the regional veterinary authorities (Division of Veterinary Intervention of Portalegre—Ministry of Agriculture and Food—Portuguese Government). The objective population is made up of a total of 1,208 sheep farms (with an average of 134.8 animals per farm) and 107 goat farms (with an average of 41.8 animals per farm) (Statistics PORTUGAL, 2017a, 2017b, 2017c). In this research, we selected a field population of 82 (6%) flocks of small ruminants (55 sheep and 27 goat flocks), from which 756 blood samples ($n = 756$) of sheep and goat were randomly collected (approximately 10 samples per holding). The procedure was carried out on the farm and in a regional slaughterhouse in the province of Alentejo in Southern Portugal.

Blood samples were collected by jugular venipuncture in vacutainer tubes without anticoagulant (Becton - Dickinson). These samples were centrifuged at 5,000 rpm for 10 min to obtain blood serum, which was frozen (-20°C) in tubes (Eppendorf) until testing.

In the group of animals sampled, those showing macroscopic lesion characteristics of CLA were labelled, matching the blood sample to the collected lesion sample ($n = 58$), and subsequently preserved by freezing (-20°C) (Table 1). The farms under study are of different types of production, intensive, semi-extensive and most extensive, characteristic of the south of the Iberian Peninsula (Table 2).

The farms were classified according to size in the categories small (<50 animals), medium (>50 and <200 animals) and large (>200 animals). In this study, approximately 60% of the farms are small-scaled, 20% are medium-sized and 17% are large-scaled (Table 2). The distribution by species among the sampled farms is like the total of animals: 70% are sheep farms and 30% are goat herds (Table 3).

Of the total sampled animals, 87% (655/756) are from meat production units and 13% (101/756) are from milk farms; 94% (715/756) of the animals were raised under extensive production, 3% (21/756) were raised under the intensive regime and 3% (20/756) were raised under the semi-extensive regime, which means that 6% (41/756) were raised under the non-extensive regime (Table 2).

2.2 | ELISA technique

In this work, we use ELITEST CLA # CK105A[®], a commercial enzyme immuno-assay (EIA), for the detection of IgG antibodies specific for

the causative agent of caseous lymphadenitis in sheep or goat sera. This test is a direct ELISA that uses a recombinant phospholipase D (PLD), an important virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, to detect anti-PLD IgG antibodies in sera from sheep and goats with CLA (HYPHEN BioMED, 2007). PLD is not known to be produced by any other sheep pathogenic bacteria, rendering it a very specific test (HYPHEN BioMed, 2007).

The results were evaluated using an ELISA microtiter reader (BioTek EL × 808, United States) according to the manufacturer's instructions.

According to the manufacturer's information, the ELITEST CLA # CK105A[®] presents a specificity of 98% for sheep and goats and a sensitivity of 94% and 79% for goats and sheep, respectively.

2.3 | Conventional PCR assay

Methodology and results of the conventional PCR assay made for the identification of *C. pseudotuberculosis* in pyogranulomatous lesions and for the cross-sectional study to assess the performance of the ELISA test was developed as described by Pacheco et al. (2007), Costa et al. (2019) and Pacheco et al. (2007).

2.4 | Statistical analysis

The ELISA assay results were subjected to frequency analysis (prevalence of the disease). The same method was applied to the data regarding the species, productive aptitude, production regime and dimension (size) of the herd. The performance of the ELISA test was evaluated by association tests, namely, ² (Chi-square—Fischer's Exact Test) with a 95% confidence interval. The statistical analysis was performed with SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 22.

3 | RESULTS

In this investigation, we found a prevalence of CLA of 34% (258/756) (Table 4), with the ELISA test showing a low specificity, 78% (35/45) and high sensitivity, 100% (13/13) (Table 5).

The descriptive analysis of the results suggests that the proportion of disease higher in goats, and such increased propensity is confirmed by the statistical test ($\chi^2 (1, N = 756) = 30.773, p < .01$) (Table 6).

TABLE 1 Samples description

	Sheep number (%)	Goats number (%)	Total
Farms	55 (67.07)	27 (32.92)	82
Blood samples	528 (69.8)	228 (30.8)	756
Purulent/pyogranulomatous lesions samples	54 (93.1)	4 (6.9)	58
Number of animals/farms	Between 10 and 1,200 animals		
Average of animals per holding	114		

	Sheep farms number (%)	Goat farms number (%)	Total number (%)
Meat farms	50 (69.4)	22 (30.5)	72 (87.8)
Dairy farms	7 (70)	3 (30)	10 (12.2)
Total			82 (100)
Extensive farms	55 (70.5)	23 (29.48)	78 (95.1)
Non-extensive farms (semi-extensive and intensive)	2 (50)	2 (50)	4 (4.87)
Total			82 (100)
Small-scaled farms (<50 animals)			51 (62.2)
Medium-sized farms (>50 and <200 animals)			17 (20.7)
Large-scaled farms (>200 animals)			14 (17.1)
Total			82 (100)

TABLE 2 Farms description

	Sheep number (%)	Goat number (%)	Total number (%)
Meat animals	459 (70)	196 (29.9)	655 (86.6)
Dairy animals	71 (70)	30 (29.7)	101 (13.4)
Total			756 (100)
Extensive regime	500 (69.9)	215 (30)	715 (94.6)
Non-extensive regime (semi-extensive and intensive)	29 (70.7)	12 (29.2)	41 (5.4)
Total			756 (100)

TABLE 3 Animals description

TABLE 4 Prevalence values

Prevalence	
(within ELISA who also did PCR)	22.4%
(all ELISA)	34.1%

TABLE 5 ELISA and PCR results

		PCR		Total
		Positive	Negative	
ELISA	Positive	13	10	23
	Negative	0	35	35
Total		13	45	58
False negatives number (%)		0 (0%)		
False positives number (%)		10 (43%)		

Regarding productive aptitude, dairy farms appear to be more susceptible to CLA ($\chi^2 (1, N = 756) = 17.458, p < .01$); the same propensity appears to exist regarding the production regime, with the farms in the non-extensive regime (intensive and semi-extensive, approximately 6% of the total sample) showing an increased propensity for the disease ($\chi^2 (2, N = 756) = 22.561, p < .01$) (Table 6).

The presence of the disease in milk farms (especially sheep farms) was evident in the visceral form, namely, in the mammary

glands, with identification of *C. pseudotuberculosis* performed by conventional PCR assay in this investigation (Figure 1).

When the results of the ELISA are analysed regarding the size of the farm, the data are also statistically significant. This data suggests that farms without the reported disease have an average of 85 animals, whereas farms with confirmed disease have an average of 171 animals ($p < .001$). This observation appears to mean that CLA is more prevalent in medium to large farms (50–200 animals and >200 animals) (Table 6). Although the sample is not proportionate regarding larger farms, these results seem to be relevant.

By performing a herd-level analysis (considering an infected farm with at least one animal positive for the ELISA), of the 82 farms in the study, 66 had at least one positive animal, leading to a value of 80% (66/82) of affected holdings (Table 6).

The performance of the ELISA test technique (ELITEST CLA # CK105A[®]) was evaluated by determining the positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). In this analysis, the ELISA test allowed the detection of 57% of subclinical animals, which was confirmed by the *postmortem* examination and conventional PCR assay performed in pyogranulomatous lesions. In the group of animals in which both tests were performed (PCR and ELISA) ($n = 58$), 57% of the animals positive for the ELISA test were positive for the PCR assay (13/23), and all the negatives, 100%, in the ELISA test were negative for the PCR assay (35/35) (Table 7).

TABLE 6 ELISA results

	ELISA negative number (%)	ELISA positive number (%)	Total	Fischer's exact test
Sheep	381 (72.15)	147 (27.8)	528	$\chi^2 (1, N = 756) = 30.773$, $p < .01$
Goat	117 (51.3)	111 (48.68)	228	
	ELISA negative number (%)	ELISA positive number (%)	Total	Fischer's exact test
Meat	450 (68.7)	205 (31.29)	655	$\chi^2 (1, N = 756) = 17.458$, $p < .01$
Dairy	48 (47.52)	53 (52.47)	101	
	ELISA negative number (%)	ELISA positive number (%)	Total	Fischer's exact test
Extensive regime	485 (67.83)	230 (32.16)	715	$\chi^2 (2, N = 756) = 22.561$, $p < .01$
Non-extensive regime (semi-extensive and intensive)	13 (31.7)	28 (68.29)	41	
	ELISA negative number (%)	ELISA positive number (%)	Total	
Farm level analysis	16 (19.51)	66 (80.48)	82	80% positive holdings
Small farms (<50 animals)	No reported disease			
Medium farms (>50 and <200 animals)	Farms without the reported disease have an average of 85 animals			
Large farms (> 200 animals)	Farms with the confirmed disease have an average of 171 animals ($p < .001$)			
Seroprevalence	258/756 (34%)			

4 | DISCUSSION

The present study shows that CLA is a prevalent disease in small ruminants in Portugal, with 34% seroprevalence. This prevalence is very close to values found in other studies, such as in Spain (26%–73% in different provinces of Andalusia, 38% in Andalusia and 80%–90% in Aragon and Navarre) (Cubero, Gonzalez, Martín, & León, 2002; Gómez-Gascón *et al.*, 2013), and Canada (from 152 goats subjected to necropsy, 54 (35.5%) had at least 1 abscess, *Corynebacterium pseudotuberculosis* was isolated in 37 of the 54 (68.5%) goats with abscesses, confirming that CLA was the most frequently diagnosed disease in this study, affecting 24.3% of the animals sacrificed) (Debien *et al.*, 2013).

In recent research (Costa *et al.*, 2019), the authors found an overall prevalence of CLA of 17% in affected small ruminant herds (with macroscopic observation of characteristic lesions in 58/335, and conventional PCR assay in 10/58, made in pyogranulomatous lesions). Smith estimated the prevalence in large breeding operations in endemic areas to be between 5% and 10% (Smith Bradford, 2015). With these data, we consider CLA an endemic disease in the Portuguese region of Alentejo.

The results show a statistically significant difference when analysing the proportion of disease between sheep and goats, and generally, goats appear to have a higher propensity for the disease. It would be important to validate these data internally and include a large number of samples of goats to properly evaluate these results.

The greater propensity for the disease in both dairy farms and farms in non-extensive (intensive and semi-extensive) production regimes, when compared to meat production units and extensive farms, is statistically significant ($p < .01$). This fact is due to the easier dispersion of the disease when animals are more confined, as described in the literature (Smith Bradford, 2015).

The internal form of the disease is a recent concern in milk goat farms, and *C. pseudotuberculosis* must be considered for routine bacteriological examination of milk from dairy goats (Nabih, Hussein, El-Wakeel, El-Razik, & Gomaa, 2018) as the presence of CLA in dairy herds can have serious consequences on the milk yield of the herd by spreading to a large number of animals in production.

The data suggest that the larger the farm is, the more predisposed it is for the disease; CLA is more prevalent in medium to large farms (50–200 animals and >200 animals, respectively), again confirming that the dissemination of the agent increases as the possibility of contact between infected animals increases.

These proportions must be carefully interpreted since they originate from a very unbalanced sample (low number of goats, low number of dairy farms and low number of farms in a non-extensive production regime).

At the farm level, 80% (60/82) of the farms had at least one seropositive animal; these values are similar to those found in the Canadian study (Debien *et al.*, 2013) in which eleven of the 13 farms (84.6%) analysed had at least one affected animal with CLA. A recent study revealed a very equal prevalence of CLA at the farm

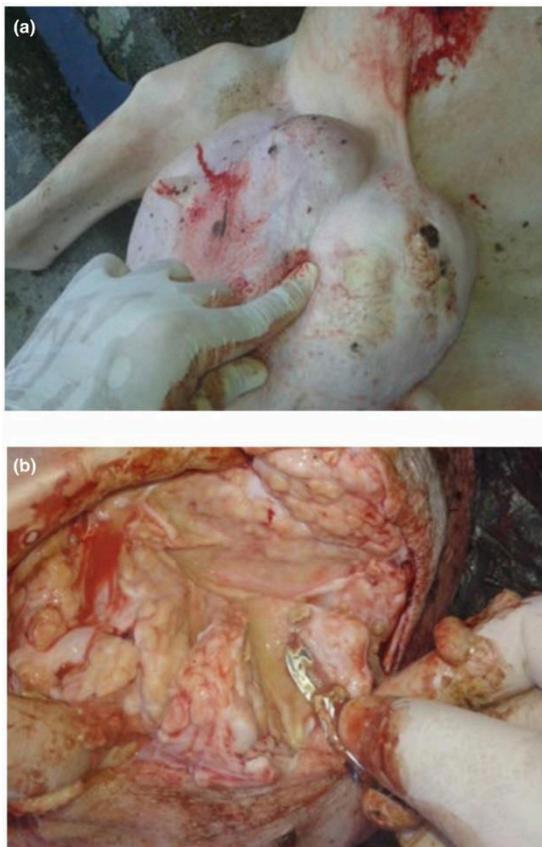


FIGURE 1 CLA in the mammary gland in dairy sheep. (a) Presence of mammary abscess. (b) Purulent material when cutting the udder

TABLE 7 ELISA performance

Sensitivity	100%
Specificity	78%
Positive predictive value (PPV)	57%
Negative predictive value (NPV).	100%

level (Farias et al., 2018), where 88.5% (193/218) of the investigated Brazilian herds had at least one seropositive goat infected with *C. pseudotuberculosis*.

Assessment of the utility of the ELISA test was made by comparing the results obtained with those of a conventional PCR assay. The choice of PCR instead of the gold-standard identification technique, bacterial isolation of *C. pseudotuberculosis*, is influenced by financial (economic constraints) and practical reasons (mainly conservation and sample processing) but is mostly based on several studies that found that bacterial culture resulted in a low isolation rate and that conventional PCR was a more sensitive and specific test for

CLA, with more accurate detection of the aetiologic agent (Baird & Fontaine, 2007; Costa et al., 2019; Debien et al., 2013; Kumar, Tripathi, Kumar, Sonawane, & Dixit, 2013; Oreiby et al., 2015).

The ELISA test performed in this investigation used the *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence factor phospholipase D (PLD), a recombinant protein that proved to be very accurate for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep (Barral et al., 2019). The ELISA test performed in this research was able to detect 57% of infected animals. These results suggest that the ELISA test is very accurate in its ability to detect subclinically infected animals. With the ELISA test detecting approximately a proportion of 0% of false-negative animals and 43% of false-positive animals, the use of this diagnostic technique to detect infected animals and the elimination of the herd could be a good measure to implement in small ruminant farms. Real negative animals can stay in the herd with no risk of agent persistence and dispersion, and the majority (57%) of positive infected animals will certainly be eliminated or separated from the herd core until subsequent screening or culling.

5 | CONCLUSION

The facts found in this research lead us to the conclusion that the ELISA test may be detecting a valid proportion of subclinically infected animals, and based on these data, the authors consider the ELISA test to be a good tool for application in CLA eradication programmes in Portugal.

The eradication of a disease with the characteristics of CLA is a challenge that involves decision-making at various levels. Factors that make eradication a challenge include the weak response of the agent to antibiotic therapy, its great ability to survive in the environment and the difficulty of detection of infected animals, the main factor responsible for the maintenance of the disease in a herd, as a source of infection.

New studies on CL prevalence in animals and herds should be conducted in the region and in the country, using serological diagnostic techniques, for the detection of asymptomatic animals. Assessment of the real damage caused by the presence of infection in small ruminant's farms and the economic impact of the disease in Portugal is needed. These data will allow to assess the need to implement control and eradication measures of the disease, as has already been done in other parts of the world.

ACKNOWLEDGMENTS

The author thanks the administration of the private laboratory "Vetdiagnos—Cantanhede—Portugal" for all the support in sample processing. The author wishes to thank the entire veterinary team of CLILEGRE for all the support in collecting the samples as well as the farmers for the authorization of sampling and providing data for this research. Special thanks to Doctor Inês Viegas from ICAAM for all the support and text review. A greeting and special thanks to the Department of Animal Health—Infectious diseases laboratory, in

Veterinary Faculty—Córdoba University—Spain, in particular to my tutors, Doctor Alfonso Maldonado and Doctor Belén Huerta.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

AUTHOR CONTRIBUTION

Lina Costa: Data curation; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Writing-original draft; Writing-review & editing. **Belén Huerta:** Formal analysis; Supervision; Validation; Visualization. **Ángela Galán-Relaño:** Visualization. **Lidia Gómez-Gascón:** Visualization. **Inés Viegas:** Data curation; Methodology; Software; Visualization. **Anabela Almeida:** Data curation; Investigation; Resources; Software; Visualization. **Alfonso Maldonado:** Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Supervision; Validation; Visualization.

ORCID

Lina Costa  <https://orcid.org/0000-0003-2247-7670>

REFERENCES

- Al-Gaabary, M. H., Osman, S. A., Ahmed, M. S., & Oreiby, A. F. (2010). Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. *Small Ruminant Research*, 94, 117–124.
- Almeida, S., Tiwari, S., Mariano, D., Souza, F., Jamal, S. B., Coimbra, N., ... Azevedo, V. (2016). The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. *Standards in Genomic Sciences*, 11, 29. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0149-7>
- Aquino de Sá, M. C., Gouveia, G. V., Krewer, C. C., Veschi, J. L. A., Mattos-Guaraldi, A. L., & Costa, M. M. (2013). Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*, 36(2), 265–268.
- Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J.-R., Boisclair, J., ... Bélanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from Maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 59, 67–81. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00060-6)
- Baird, G. J., & Fontaine, M. C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*, 137, 179–210. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.07.002>
- Barba, M., Stewart, A., Passler, T., Wooldridge, A., Santen, E., & Chamorro, M. (2015). Experimental transmission of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar *equi* in horses by house flies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29, 636–643.
- Barral, T. D., Mariutti, R. B., Arni, R. K., Santos, A. J., Loureiro, D., Sokolonski, A. R., ... Portela, R. D. (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microbial Biotechnology*, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13454>
- Binns, S. H., Green, L. E., & Bailey, M. (2007). Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary Microbiology*, 123, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.015>
- Boysen, C., Davis, E., Beard, L., Lubbers, B., & Raghavan, R. (2015). Bayesian geostatistical analysis and ecoclimatic determinants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection among horses. *PLoS One*, e0140666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140666>
- Brown, C. C., Olander, H. J., & Alves, S. F. (1987). Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in northeastern Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 51, 46–49.
- Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T., & Vanechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00089-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00089-5)
- Colom-Cadena, A., Velarde, R., Salinas, J., Borge, C., García-Bocanegra, I., Serrano, E., ... Mentaberre, G. (2014). Management of a caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 83. <http://www.actavetscand.com/content/56/1/83>
- Costa, L., Maldonado, A., Huerta, B., & Almeida, A. (2019). Optimization of a conventional PCR Assay for the identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pyogenic lesions. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 7(2), 201. ISSN: 2348–9790.
- Cubero, P., Gonzalez, C. M., Martín, A. P., & León, V. L. (2002). *Estrategias de policía sanitaria en la Linfadenitis caseosa*. Rev. Ovis no. 78.
- Debien, E., Hélie, P., Buczinski, S., Lebœuf, A., Bélanger, D., & Drolet, R. (2013). Proportional mortality: A study of 152 goats submitted for necropsy from 13 herds in Quebec, with a special focus on caseous lymphadenitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 54, 581–587.
- Dercksen, D. P., Brinkhof, J. M. A., Dekker-Nooren, T., Maanen, K. V., 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, 167–175. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00217-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00217-0)
- Farias, A. M., Alves, J. R. A., Alves, F. S. F., Pinheiro, R. R., Faccioli-Martins, P. Y., Lima, A. M. C., ... Alves, C. J. (2018). Soroprevalência da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos no Nordeste brasileiro utilizando técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA-indireto). *Brazilian Journal of Veterinary Research*, 38(7), 1344–1350. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5282>
- Farias, A. M., Alves, J. R. A., Alves, F. S. F., Pinheiro, R. R., Faccioli-Martins, P. Y., Lima, A. M. C., ... Alves, C. J. (2019). Seroprevalence and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 51, 745–752. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1748-7>
- Gómez-Gascón, L., López, P., Cardoso-Toset, F., Luque, I., Huerta, B., Iglesias, C., & Maldonado, A. (2013). Pseudotuberculosis en Andalucía: Actualización del diagnóstico laboratorial. *Reproducción Animal*, 279, 20–29.
- Guedes, M. T., Souza, B. C., Sousa, T. J., Loureiro, D., Moura-Costa, L. F., Azevedo, V., ... Portela, R. W. (2015). Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: Aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, 35(8), 701–708. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000800001>
- Guimarães, A. S., Carmo, F. B., Heinemann, M. B., Portela, R. W. D., Meyer, R., Lage, A. P., ... Gouveia, A. M. G. (2011). High seroprevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 7, 68. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-68>
- Hoelzle, L. E., Scherrer, T., Muntwyler, J., Wittenbrink, M. M., Philipp, W., & Hoelzle, K. (2013). Hoelzle K (2013) Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 164, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.031>
- HYPHEN BioMed. (2007). ELITEST CLA # CK105A, Kit for the detection of IgG antibodies in sera from sheep or goats with caseous lymphadenitis. France. <http://www.mvdiagnostics.co.uk/documents/CK105A02-08-07.pdf>

- Jung, B. Y., Lee, S.-H., Kim, H.-Y., Byun, J.-W., Shin, D.-H., Kim, D., & Kwak, D. (2015). Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Tropical Animal Health and Production*, 47, 657–661. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0773-z>
- Kaba, J., Kutschke, L., & Gerlach, G. F. (2001). Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Veterinary Microbiology*, 78, 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00284-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00284-4)
- Kumar, J., Tripathi, B. N., Kumar, R., Sonawane, G. G., & Dixit, S. K. (2013). Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 45, 1429–1435. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0381-8>
- Latif, N. A. A., Abba, Y., Jesse, F. F. A., Chung, E. L. T., Zamri-Saad, M., Saharee, A. A., ... Mohd-Lila, M. A. (2016). Histopathological assessment of chronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in the reproductive tract and iliac lymph node of Katjang does. *Comparative Clinical Pathology*, 26, 147–154. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2357-3>
- Mahmood, Z. K., Jin, Z. M., Saharee, A. A., Sabri, J., Yusoff, R., & Haron, A. W. (2016). Relationship between the *Corynebacterium pseudotuberculosis*, phospholipase D inoculation and the fertility characteristics of crossbred Boer bucks. *Livestock Science*, 191, 12–21.
- Malone, F. E., Fee, S. A., Kamp, E. M., King, D. C., Baird, G. J., O'Reilly, K. M., & Murdock, F. E. A. (2006). A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of sheep. *Irish Veterinary Journal*, 59, 19–21. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-59-1-19>
- Menzies, P. I., Hwang, Y. T., & Prescott, J. F. (2004). Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*, 100(1–2), 129–137.
- Nabih, A. M., Hussein, H. A., El-Wakeel, S. A., El-Razik, K. A., & Gomaa, A. M. (2018). *Corynebacterium pseudotuberculosis* mastitis in Egyptian dairy goats. *Veterinary World*, 11(11), 1574–1580. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1574-1580>
- Nassar, A. F., Miyashiro, S., Gregori, F., Piatti, R. M., Daniel, G. T., & Gregory, L. (2014). Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Small Ruminant Research*, 116, 229–232.
- Oliveira, M., Barroco, C., Mottola, C., Santos, R., Lemsaddek, A., Tavares, L., & ... (2014). First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domestica*). *Veterinary Research*, 45, 218.
- Oreiby, A. F., Hegazy, Y. M., Al-Gaabary, M. H., Osman, S. A., Marzok, M. A., & Abushhiwaa, M. (2015). Studies on clinical identification, ELISA, bacteriological isolation, PCR and X-ray radiography for diagnosis of ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 14(9), 250–253. ISSN: 1680-5593 © Medwell Journals.
- Oreiby Atef, F. (2014). Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. *Small Ruminant Research*, 123, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.11.013>
- Pacheco, L. G. C., Pena, R. R., Castro, T. L. P., Dorella, F. A., Bahia, R. C., Carminati, R., ... Azevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 480–486. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46997-0>
- Paton, M. W. (2010). *The epidemiology and control of Caseous Lymphadenitis in Australian Sheep Flocks [Doctoral thesis] Murdoch University, School of Veterinary and Biomedical Sciences, Australia.*
- Paton, M. W., Walker, S. B., Rose, I. R., & Watt, G. F. (2003). Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Veterinary Journal*, 81, 91–95. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2003.tb11443.x>
- Pavan, M. E., Robles, C., Cairó, F. M., Marcelino, R., & Pettinari, M. J. (2011). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase β -subunit gene (rpoB). *Research in Veterinary Science*, 92(2), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.007>
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., & Fanning, S. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease*, 2nd ed. Dublin: Wiley-Blackwell, UK. ISBN 978-1-405-15823-7.
- Rocha, B. (2011). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in dairy cattle in the State of California, USA. *Veterinary Medicine*, 106, 49–54.
- Shpigel, N., Elad, D., Yeruham, I., Winkler, M., & Saran, A. (1993). An outbreak of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in an Israeli dairy herd. *The Veterinary Record*, 133, 89. <https://doi.org/10.1136/vr.133.4.89>
- Smith Bradford, P. (2015). *Large animal internal medicine* (5th edn, pp. 1080–1083). Missouri: Elsevier.
- Soares, S. C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., Carneiro, A., ... Azevedo, V. (2013). The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar ovis and equi Strains. *PlosOne*, 8(1), 1–14.
- Spier, S. J., & Azevedo, V. (2017). Clinical commentary-*Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: Increasing frequency and spread to new regions of North America. *Equine Veterinary Education*, 29(8), 436–439. <https://doi.org/10.1111/eve.12589>
- Statistics PORTUGAL. (2000). *Leção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Regional (DGADR). Produtos com denominação de origem protegida.*
- Statistics PORTUGAL. (2009). *Instituto Nacional de Estatística (INE) . Efetivo Caprino por Municípios.*
- Statistics PORTUGAL. (2014). *Instituto Nacional de Estatística (INE) . Efetivo Ovino por Municípios.*
- Statistics PORTUGAL. (2017). *Instituto Nacional de Estatística (INE) . Indicators of agriculture and forestry by NUTS, 2016.*
- Statistics PORTUGAL. (2017). *Efetivo ovino (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2001) e Categoria (efetivo ovino).*
- Statistics PORTUGAL. (2017). *Efetivo caprino (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2013) e Categoria (efetivo caprino).*
- Torres, L., Ribeiro, D., Hirata Jr, R., Pacheco, L., Souza, M., Santos, L., ... Mattos-Guaraldi, A. L. (2013). Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Memorial Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 108(3), 272–279.
- Velasco Diego, J., & Fernández Benito, V. (2006). *Audito Patológico de Caso Clínico de Linfadenitis Caseosa Ovina. Corynebacteriosis*. I Congreso Virtual Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Comunidad Virtual de Veterinaria.org.
- Windsor, P. A. (2014). Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 109(5), 11–22. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S44814>
- Zavoshti, F. R., Khojine, A., Helan, J., Hassanzadeh, B., & Heydari, A. (2012). Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: Comparison of bacterial culture and pathological study. *Compendium of Clinical Pathology*, 21, 667–671. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1154-7>

How to cite this article: Costa L, Huerta B, Galán-Relaño Á, et al. Utility assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of subclinical cases of caseous lymphadenitis in small ruminant flocks. *Vet Med Sci*. 2020;00:1–8. <https://doi.org/10.1002/vms3.297>

ANEXO 4: Costa L, Maldonado A, Huerta B, Almeida A (2019) Optimization of a Conventional PCR Assay for the Identification *Corynebacterium Pseudotuberculosis* from Pyogenic Lesions. J Vet Sci Ani Husb 7(2): 201. ISSN: 2348-9790.



Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry

Volume 7 | Issue 2

ISSN: 2348-9790

Research Article

Open Access

Optimization of a Conventional PCR Assay for the Identification of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* from Pyogenic Lesions

Costa L¹, Maldonado A², Huerta B² and Almeida A³

¹Agrarian Superior School of Elvas, Polytechnic Institute of Portalegre, Portugal

²Department of Animal Health, University of Cordoba, Spain

³Vetdiagnos, Veterinary Diagnostic Laboratory, Cantanhede, Portugal

*Corresponding author: Costa L, Agrarian Superior School of Elvas, Polytechnic Institute of Portalegre, Portugal, Tel: +351965147360, E-mail: lina_costa@ippportalegre.pt

Citation: Costa L, Maldonado A, Huerta B, Almeida A (2019) Optimization of a Conventional PCR Assay for the Identification of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* from Pyogenic Lesions. J Vet Sci Ani Husb 7(2): 201

Abstract

Caseous lymphadenitis (CL) is a pyogenic disease that is caused by zoonotic bacteria and is in the same family as *Corynebacterium diphtheriae* (the etiologic agent of human Diphtheria). CL mainly affects small ruminants but has also been described in deer, cows, horses, pigs and humans. The main objective of this study was to optimize conventional PCR (Polymerase Chain Reaction) for the identification of the CL etiologic agent, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, from pyogenic lesions. The present work is also a preliminary study of CL prevalence conducted in a slaughterhouse in 335 animals (311 sheep and 24 goats) from 114 herds of small ruminants in the region of Alto Alentejo, Portugal affected by CL. The prevalence of CL was determined by macroscopic observation of the lesions and conventional PCR in pathological samples of pus and affected organs collected from sheep and goats that had external or visceral lesions. The PCR technique for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* genomic DNA (as described by Pacheco *et al.* was based on the design of primer pairs for two target genes, the 16S ribosomal segment (16s rRNA) – 815 bp (base pairs) and the gene which encodes the exotoxin Phospholipase D (PLD) – 132 bp both at normal and diluted concentrations. From the gross detection of the lesions the results shows a CL prevalence of 17, 31% (58/335) and indicate a CL prevalence of 17, 24% in affected animals, with the identification of *C. pseudotuberculosis* in 10 of the 58 lesions sampled. The dilution of DNA samples and detection of genomic DNA of *C. pseudotuberculosis* from two different DNA regions (i.e., 16s and PLD) conducted in this investigation allowed maximal agent identification. This is the first report of CL prevalence in Portugal. We conclude that conventional PCR is an excellent tool for definitive and differential diagnosis of CL but is not useful in prevalence studies since it does not allow the identification of subclinical cases.

Keywords: Caseous Lymphadenitis; PCR; Small Ruminants; Pyogenic; Portugal

Article Summary

Extraction and purification of genomic DNA for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* are often hampered by the large pyogenic component of typical pathological samples and the high concentration of cellular debris. There has not been sufficient validation of the performance of existing PCR assays for the identification of *C. pseudotuberculosis* from pyogenic lesions. The present work aimed to improve the effectiveness of conventional PCR for the direct detection of *C. pseudotuberculosis* in field samples. Caseous lymphadenitis (CL) is a pyogenic disease with two recognized clinical manifestations: subcutaneous and visceral. The visceral form is primarily responsible for disease dissemination in animal flocks, largely due to the presence of subclinically infected animals. Examination of a slaughterhouse allowed for a real evaluation of CL on farms through the detection of subclinically infected animals. The present work sought to optimize conventional PCR analysis for the identification of *C. pseudotuberculosis* in pyogenic lesions and then apply the new assay to estimate the prevalence of CL in affected small ruminant flocks in Alto Alentejo, a region of the Iberian Peninsula with important sheep and goat livestock production. To our knowledge, this is the first prevalence study of CL in small ruminants carried out in Portugal and the high prevalence found in this study (17%) justifies the implementation of new sanitary measures and suitable control programs to prevent the transmission and dispersion of *C. pseudotuberculosis* in Portugal. This study has certain limitations, including an inability to identify other pathogenic agents in pyogenic lesions, which would have increased clinical knowledge regarding differential diagnoses for CL. The fact that this study included samples of superficial, visceral, acute and chronic lesions, most of which had a strong purulent component, may explain the difficulty associated with the digestion and extraction of genomic DNA from lesions. In addition, false negative results may

have occurred in the case of sterile CL lesions that do not include a bacterial agent or its DNA. These considerations may have led to an underestimation of the true CL prevalence.

Introduction

Caseous lymphadenitis (CL) is a chronic and insidious disease that mainly affects small ruminants. CL is caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a Gram-positive bacterium from the actinomycetes group of microorganisms [1]. *C. pseudotuberculosis* is a robust microorganism in the external environment, which has largely been attributed to the presence of a lipid component in its external membrane that protects the bacterium very effectively from desiccation [2].

Clinical signs of CL include enlargement of superficial lymph nodes, such as the submandibular, pre-scapular, pre-femoral, popliteal and supra-mammary lymph nodes, as well as the presence of lesions in internal organs, such as the lungs, liver, kidneys and others [3]. The disease is characterized by necrotizing and suppurative inflammation of one or more nodes with features of a necrotic-purulent nature, as well as damage to multiple organs, the lesions of which usually acquire a caseous nature [2].

The true prevalence of CL in small ruminants remains underestimated, and there are no data in Portugal concerning either the prevalence or the economic impact of this disease. CL has been disseminated worldwide, and its economic impact in sheep and goat flocks is a long-standing concern of governmental agricultural departments in developed countries. This has led to the recent implementation of novel control programmes. In addition to its sanitary and zoonotic importance, CL is a major cause of economic losses in sheep and goat flocks worldwide, causing highly impactful disruptions in the production of milk, meat and wool [4-7].

Corynebacterium pseudotuberculosis primarily affects small ruminants, although it has occasionally been found in cattle, horses, buffalo, deer and humans [8-12]. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses is widespread worldwide and may lead to varying clinical conditions [13,14]. In Portugal, the first case of CL in a Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*) was reported in 2014, with phenotypic and genotypic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from clinical isolates [15].

The pathogenicity of *C. pseudotuberculosis* strains is related to the secretion of toxic factors, such as Phospholipase D (PLD), and the lipid contents of their cell walls [10,12,16,17].

The transmission of *C. pseudotuberculosis* between infected and healthy animals occurs through direct contact with purulent material and through the inhalation of infected particles [11,18,19].

It has been reported in the United States (USA), Israel and Egypt that *C. pseudotuberculosis* can be dispersed among animals by insect vectors, such as flies (e.g., *Musca domestica* and *Hippobosca equina*) [12,20]. Numerous studies performed around the world regarding CL control are unanimous in reporting the importance of detecting subclinical animals, a major focus of infection in every affected herd.

There is no single diagnostic test that is able to identify all cases, different phases or forms of the disease [21]. Serological diagnosis based on ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) tests continues to be improved and validated for the identification of subclinical animals [22-25]. However, the definitive diagnosis of CL currently still relies on the isolation and identification of the etiologic agent through biochemical tests, bacterial culture, and, most recently, molecular diagnostic tests including PCR [19,26]. PCR offers a robust technique that has been adopted for the direct detection of microorganisms in a wide variety of clinical and *post-mortem* specimens [26]. However, to date, the effectiveness of PCR for the direct detection of *C. pseudotuberculosis* in pyogenic samples has been poorly evaluated, and there have not been sufficient validation studies regarding the performance of existing PCR tests [27].

The present study sought to optimize conventional PCR techniques for the identification of *C. pseudotuberculosis* in pyogenic lesions, and then apply the newly developed assay to estimate the prevalence of CL in affected flocks of small ruminants in Alto Alentejo, a region of the Iberian Peninsula with important livestock production of sheep and goats. The continental region of Portugal has a total of 2 218 000 sheep and 326 000 goats and almost half of this herd is in the province of Alentejo (1 324 000 sheep and 108 000 goats) (Portugal, 2017). In Alto Alentejo a sub-region of Alentejo there are approximately 250 000 sheep and 87 000 goats. In this sub-region of Portugal the majority of the farms are meat production units in extensive regime, and some in intensive production, being these mainly for milk production. The approximate average number of animals per herds is 114, with farms with 10 to 1200 animals per holding.

Materials and Methods

Animals and Samples

This study was carried out in 114 small ruminant farms (74 sheep farms and 40 goats farms) based in the Portuguese region of Alto Alentejo, located in the district of Portalegre, with different types of production systems, including intensive, semi-extensive and mostly extensive. A total of 335 animals (311 sheep and 24 goats) were observed in a local slaughterhouse to investigate lesions compatible with *C. pseudotuberculosis* infection. From a macroscopic analysis, 17, 31% of the animals (58/335) were identified with

lesions suggestive of CL, which were collected and analyzed (Table 1). Clinical samples (58) of purulent and pyogranulomatous lesions were obtained from visceral lesions and/or internal organs manifesting macroscopic changes suggestive of pyogenic processes, as well as from superficial lesions characteristic of CL.

	Sheep Number (%)	Goats Number (%)	Total
Herds	74 (65)	40 (35)	114
Animals	311 (92, 8)	24 (7, 2)	335
Purulent/pyogranulomatous lesions analyzed	54 (93, 1)	4(6, 9)	58

Table 1: Animals and Samples

The samples were labelled with the location of origin, animal species and type of organ/affected area and preserved by freezing at -20 °C. A total of 58 samples were collected and preserved, which corresponded to one sample per animal.

The preparation of samples for processing by conventional PCR assay was realized by sectioning, with the aid of a scalpel blade, 25 to 30 mg of tissue from the most representative portion of the pathological sample (including purulent characteristic lesions) and placing the sample in a 1.5 ml Eppendorf tube. During the study, we verified that the sample selected for processing included original tissue of the organ or peripheral material of the lesion, making sure that the piece was not sterile and that it contained genomic material of the etiologic agent.

Conventional PCR Method

Primer Design: The DNA from each sample was tested by PCR according to the method described by Pacheco *et al.* The PCR technique for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* genomic DNA was based on the design of primer pairs for two target genes, the 16S ribosomal segment (16s rRNA) – 815 bp (base pairs) and the gene which encodes the exotoxin Phospholipase D (PLD) – 132 bp both at normal and diluted concentrations (Table 2).

PCR I	Detection of 16S ribosomal RNA gene (normal DNA concentration)
PCR II	Detection of exotoxin Phospholipase D gene (PLD) (normal DNA concentration)
PCR III	Detection of 16S ribosomal RNA gene (diluted DNA 1:10)
PCR IV	Detection of exotoxin Phospholipase D gene (PLD) (diluted DNA 1:10)

Table 2: Description of PCR assay design for analysis of each of the pathological samples

All primers were designed using the software "Primer Express" (Primer Express™ Software v3.0.1 License) to determine the optimal sequence of nucleotides for both the 16s and PLD segments.

The choice of nucleotide sequence was made using www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/ as follows:

Primers for the *Corynebacterium pseudotuberculosis* 16S ribosomal RNA gene:

Fw: GTCTAATACTGGATAGGACCGCACT (58 °C)

Rv: ATATGTCAAGCCCAGGTAAGGTTC (59 °C)

Amplicon: 815 bp

Seq ref: NR_119175.1

Primers for the *Corynebacterium pseudotuberculosis* PLD gene:

Fw: GCTCGTAGTGTGTGCTCCATAAAT (58 °C)

Rv: ATCAGCGGTGATTGTCTTCCA (59 °C)

Amplicon: 132 bp

Seq ref: L16587.1

DNA Extraction and Digestion: For the DNA digestion and extraction procedure, we used the "NZY Tissue gDNA Isolation kit" from the Portuguese company "Nzytech - genes & enzymes Company" Lisbon, Portugal - Catalogue numbers: MB13502, 50 columns, MB13503, 200 columns, Batch 14071. The NZY Tissue gDNA Isolation kit is optimized for isolating up to 35 µg of DNA from up to 25 mg of tissue or 107 of cells.

In this particular study, the purification of DNA from purulent material proved to be a difficult procedure, resulting in subsequent decreases in test sensitivity.

Agarose Gel Electrophoresis: The obtained bands were confirmed, analyzed and compared to bands obtained from standards for each isolate, and the results were imaged for future reference and analysis.

Statistical analysis of the observed results use SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 9.0 and χ^2 (Chi-squar) testing

Evaluation of the analytical specificity and analytical sensitivity of conventional PCR for the identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

The specificity of PCR analysis for *Corynebacterium pseudotuberculosis* is conferred by the primers selected, which show 100% homology with the bacteria's DNA segments (16s RNA and PLD gene). The analytical specificity was evaluated using DNA from 2 different *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains and DNA from other common bacteria in animal diseases, such as *Chlamydia sp.*, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Escherichia coli*, *Neospora caninum*, *Coxiella burnetti*, *Mycoplasma sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, among others, which were selected because of their pathogenic similarities (e.g., pyogenic lesion formation and toxic factor production) and of their hosts (small ruminants) (Figure 1).

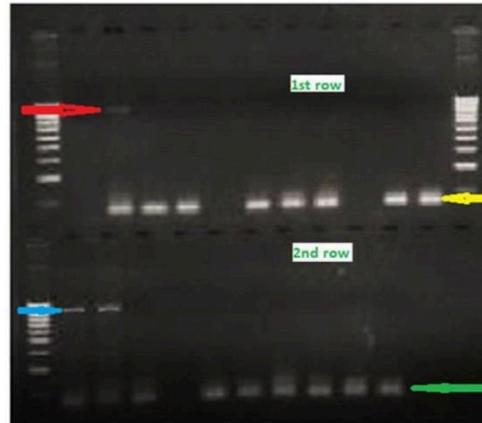


Figure 1: Electrophoresis analysis for the evaluation of the specificity of PCR for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In the 1st row, from left to right, are the molecular weight marker, common PCR products for negative control and DNA of *Corynebacterium pseudotuberculosis* field strain (red arrow), and various other bacterial DNAs (orange arrow). In the 2nd row, from left to right, are the molecular weight marker, PCR products with acquired DNA from *Corynebacterium pseudotuberculosis*—DSMZ 20689 and *Corynebacterium pseudotuberculosis*—field strain (blue arrow), and PCR products with DNA from other bacteria (green arrow).

The PCR analysis results used to evaluate the specificity of PCR for *Corynebacterium pseudotuberculosis* allowed us to conclude that this test has high analytical specificity, as it was not possible to detect DNA from other bacteria with pathogenic characteristics and hosts analogous with the agent under study.

The sensitivity of PCR for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* was evaluated using successive dilutions of 25 ng of standard DNA-acquired strain DSMZ 20689 of *Corynebacterium pseudotuberculosis*—approximately equivalent to 2.5×10^7 CFU (colony - forming units) of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Figure 2).



Figure 2: Electrophoresis analysis for evaluation the sensitivity of PCR for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (from left to right, the molecular weight marker, the PCR product with 0.1 ng of standard DNA, and 1:10 dilutions in the subsequent wells, with a response observed at 0.001 ng of DNA / reaction, a dilution equivalent to 10^3 CFU of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (yellow arrow))

PCR testing performed with serial dilutions (1:10) of 25 ng of standard DNA-strain DSMZ 20689 of *Corynebacterium pseudotuberculosis*-demonstrate that the PCR assay designed for the identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* has high analytical sensitivity, as it allows the identification of the agent in a DNA dilution at low as 0.001 ng, equivalent to 10^3 CFU of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Results

Positive results in one or more of the four PCR products analysed are presented in Table 3. As seen in Table 3, from the 58 pyogenic samples analyzed, 10 were positive for at least one of the PCR product analyzed in this study. Of the 10 positive results, 3 were positive in PCR I, and 4 results were positive only in PCR III, which detected the 16S gene for *C. pseudotuberculosis* with genomic DNA diluted 1:10 (Figure 3 and Figure 4). Of the 58 clinical samples analyzed, 3 were positive for both PCR products I and II, with 16S and PLD gene segments for *C. pseudotuberculosis* detected at normal concentrations (Figure 4). As each sample originated from a different herd, we estimated an overall prevalence of 17, 24% for Caseous Lymphadenitis in affected herds throughout the Portuguese region of Alto Alentejo. Of the 10 samples with positive results, one was derived from goats (sample 84) and the remaining nine were obtained from sheep (Table 4).

Sample number	PCR I 16S Results (Normal DNA concentration)	PCR II PLD Results (Normal DNA concentration)	PCR III 16S Results (Diluted DNA 1:10)	PCR IV PLD Results (Diluted DNA 1:10)
4	NEGATIVE		POSITIVE	NEGATIVE
32	NEGATIVE		POSITIVE	NEGATIVE
52	POSITIVE	NEGATIVE	NEGATIVE	NEGATIVE
61	NEGATIVE		POSITIVE	NEGATIVE
62	NEGATIVE		POSITIVE	NEGATIVE
63	POSITIVE	NEGATIVE		NEGATIVE
66	POSITIVE	NEGATIVE		NEGATIVE
77	POSITIVE	POSITIVE		NEGATIVE
84	POSITIVE	POSITIVE		NEGATIVE
85	POSITIVE	POSITIVE		NEGATIVE

Table 3: Positive results obtained via PCR I, PCR II, PCR III and PCR IV with normal DNA concentrations (e.g., 1 μ L and 2 μ L) and diluted DNA concentrations (1:10).

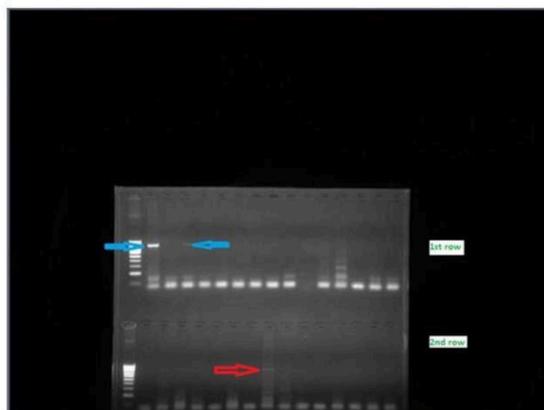


Figure 3: Electrophoresis analysis of the results of PCR I and PCR III (as seen in the 1st row, from left to right, the molecular weight marker (bands distributed from 1000 to 100 bp), followed by PCR products from samples 4 to 44-with positive samples identified in 4 and 32 (815bp) (blue arrows). In the 2nd row, from left to right, the molecular weight marker and PCR products from samples 45 to 59 sequentially, with sample 52 identified as positive (815 bp) (red arrow))

In the visceral form of the disease, the lung was the most-commonly affected organ, with pyogranulomatous lesions caused by *C. pseudotuberculosis* observed in 40% of the tested animals. The liver was the second-most affected organ (20%), and the disseminated form was identified only in one animal (Table 4).

Subcutaneous abscesses (cutaneous or external form of the disease) were observed in 30% of cases with identification of the etiologic agent of CL. In general, the visceral form was the most prevalent, with 70% of positive results in the identification of *C. pseudotuberculosis* in PCR samples obtained from internal lesions (Table 4).

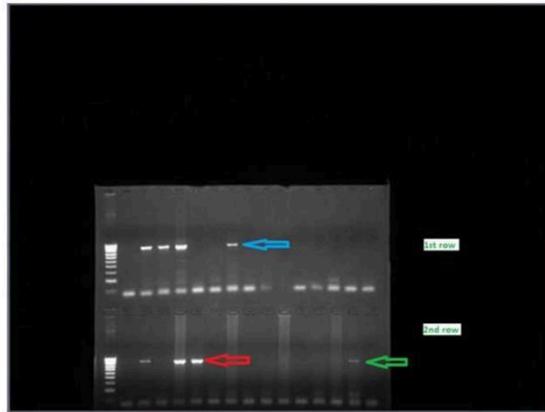


Figure 4: Electrophoresis analysis of the results of PCR III, PCR II and PCR I (in the 1st row, from left to right, the molecular weight marker, followed by PCR products from samples 60 to 68, followed by an empty well and PCR products from samples 69 to 73, with positive samples identified in samples 61, 62, 63 and 66 (815 bp) (blue arrow). In the 2nd row, from left to right, the molecular weight marker and PCR products from samples 76 to 85, followed by samples 51 II to 58 II, as well as positive and negative controls (green arrow), with samples 77, 84 and 85 identified as positive (815 bp) (red arrow))

	Organ/Affected area								58 tested organs
	Subcutaneous abscesses		Liver		Lung		Disseminated form		
Positive sample number	sheep	goats	sheep	goats	sheep	goats	sheep	goats	
	4				52		77		
		84	32		61				
	85		62		63				
				66					
Total number (%)	2 (20)	1 (10)	2 (20)	0	4 (40)	0	1 (10)	0	10 (17,24)
	30% superficial CL lesions		70% visceral CL lesions						

Table 4: Distribution of positive samples of *C. pseudotuberculosis* by organ/affected area and animal species

Statistical analysis of the observed results showed no statistically significant difference between species (sheep and goats) concerning positive PCR identification for *C. pseudotuberculosis* ($P > 0.05$) (Figure 5).

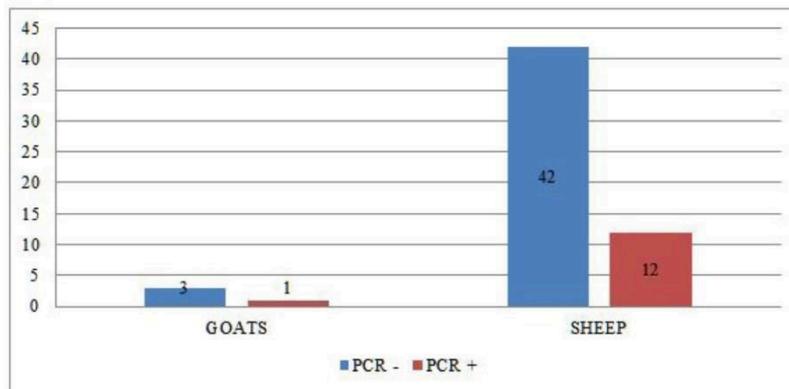


Figure 5: Distribution of positive and negative PCR samples for *C. pseudotuberculosis* by species (e.g., sheep and goats)

With regards to the location of the lesions, including both positive and negative results for *C. pseudotuberculosis* PCR analysis, the evaluated distributions did not prove to be statistically significant ($P > 0.05$), although it was possible in Figure 6 to see that the lung was the organ most affected by pyogenic lesions (Figure 7).

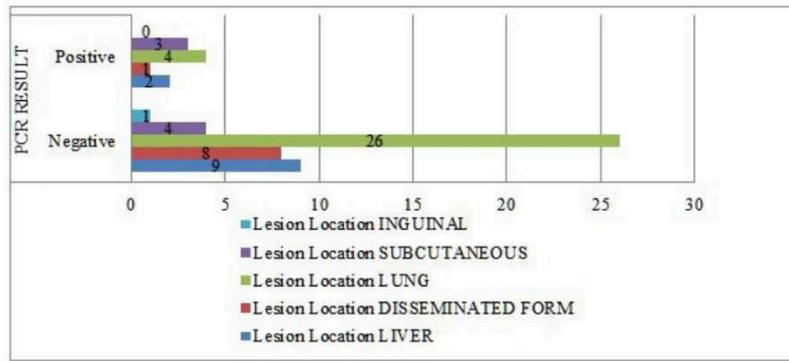


Figure 6: Lesions Location



Figure 7: Pulmonary lesions in a sheep with identification of *C. pseudotuberculosis* (a) Cutting of the lung parenchyma with exit of thick purulent material; (b) Encapsulated pulmonary abscess

In contrast, when evaluating the distribution of pyogranulomatous lesions detected in sheep and goats, we found a statistically significant difference between the two species ($P < 0.05$), with sheep having the higher frequency of characteristic CL lesions (Figure 8).

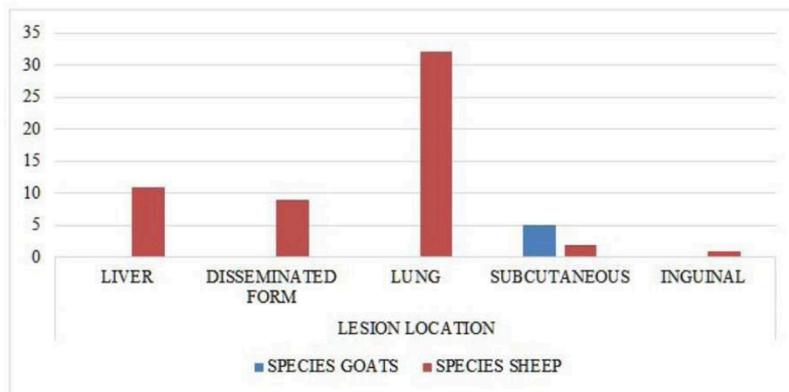


Figure 8: Distribution of pyogranulomatous lesions screened for *C. pseudotuberculosis* by PCR in sheep and goats

Discussion

The extraction process and purification of genomic DNA for the detection of *C. pseudotuberculosis* was hampered by the large pyogenic component of the pathological samples and a high concentration of cellular debris. The dilution of DNA samples allowed us to detect four positive samples in PCR III, in which we investigated the 16S gene for *C. pseudotuberculosis* with genomic DNA diluted 1:10 (Figure 4). Therefore, to detect the maximal number of positive animals in the diagnosis of CL, it

is appropriate to perform PCR analysis by searching for more than one genomic DNA fragment (i.e., 16s RNA and PLD) while diluting the DNA samples.

Molecular diagnosis is not a routine analysis technique in screening of caseous lymphadenitis, mainly because of the high cost of PCR testing. However, compared to other diagnostic methods available for this disease, PCR has proven to be a sensitive and specific test that enables the identification of an etiologic agent from a wide variety of pathological samples.

The definitive diagnosis of CL is primarily based on culture and identification of *C. pseudotuberculosis*, which can be isolated from any kind of lesions. However, the number of viable bacteria in a chronic abscess may be low, and sterile lesions can occasionally be found [11]. A study in Canada that focused on CL identified *Corynebacterium pseudotuberculosis* (via bacterial isolation) in 37 of 54 animals with abscesses [28]. In the 17 negative animals, the authors isolated *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* in 6 cases, *Pasteurella multocida* in one case and isolated no bacteria in 10 cases, consistent with the possibility of "sterile" abscesses or abscesses with very low microbiological levels.

The present study allowed us to evaluate the analytical specificity and sensitivity of conventional PCR testing for *C. pseudotuberculosis*. It was not possible to obtain a relative specificity or sensitivity value because no comparative tests were performed to check for false positives or false negatives; nevertheless, high analytical specificity and high analytical sensitivity of PCR testing for *Corynebacterium pseudotuberculosis* were identified.

From the 335 animals observed in the slaughterhouse, 58 (17, 31%) were presumptively diagnosed with CL. *C. pseudotuberculosis* was identified in 17, 24% (10/58) of these animals. The overall CL prevalence in affected flocks of small ruminants (17, 31% in macroscopic observation of lesions and 17, 24% in agent identification by PCR) confirmed in this investigation was lower than that obtained in previous studies. This prevalence may have resulted from the chronic and purulent nature of the study samples, which may correspond to CL lesions that lack the etiologic agent or its DNA, thus leading to an underestimation of the true prevalence of CL. In a recent study in Korea in which 466 Korean native goats were tested, 34 (7.3%) were grossly diagnosed with CL. *C. pseudotuberculosis* was isolated from 24 of these goats (70.6% of goats with superficial CL lesions), with infection confirmed by PCR [29]. In the province of Tanta, Egypt, a study performed in a slaughterhouse identified 259 animals severely affected with CL, among 962 small ruminants slaughtered, representing a prevalence of 26.92% [30]. *Corynebacterium pseudotuberculosis* was isolated (via bacteriological analysis) in 241 cases (25.05% of the total).

The majority of pathological samples were obtained from sheep, which is consistent with data indicating that CL is more prevalent in sheep than in goats. The increased prevalence of CL may be because, in the study area, there is a predominance of ovine species (approximately 250 000 sheep and 87 000 goats) [31-33]. However, one of the positive PCR identification results was found in a goat sample (10%). Several authors have suggested that goats are more commonly affected by external abscesses, while the visceral form of CL may be more common in sheep [17,34].

Regarding lesion locations, the lung was the most-commonly affected organ in the visceral form of the disease (40%), as previously described in the literature [17,34,35]. Visceral disease presentation was the most frequent, with the identification of *C. pseudotuberculosis* in a greater percentage of visceral lesions (70%) compared with the skin or superficial forms (30% of subcutaneous abscesses). These data confirm previous study results, demonstrating that the presence of external abscesses represents only the tip of the iceberg, and underscoring that the problem of CL in the visceral form is more prevalent than commonly considered [17,34,35]. Small ruminants affected by the visceral form of the disease rarely show abscesses in external lymph nodes, which emphasizes the importance of accurately detecting animals affected by the visceral form [17].

This is the first prevalence study of caseous lymphadenitis in small ruminants carried out in Portugal. The only work previously published Boinas F *et al.* used a very small number of animals and flocks [36].

Approximately half of the national herds of small ruminants (46%) reside in the Alentejo region, and the annual production of lamb meat and certified sheep cheese has its largest representation in Alto Alentejo [31-33,37]. We therefore conclude that the presence of a disease with such insidious characteristics and chronic nature as CL at such a high prevalence require the concern of public health authorities and research centres of animal health. Future studies should attempt to estimate its morbidity and mortality rate and its overall economic impact for the country and the region [38,39].

The performance of part of the study in a slaughterhouse allowed the real evaluation of CL on actual farms, including the detection of subclinical animals.

This study faced certain limitations, including the inability of identifying other etiologic agents in pyogenic lesions, which would have increased overall knowledge for differential diagnoses of CL and, non-performance of bacterial culture (gold standard technique for detection of *C. pseudotuberculosis*) for comparison with PCR results.

PCR proved to be an excellent test for definitive and differential diagnosis of CL, although it is not the most appropriate for prevalence studies due to its relative expense compared to microbiological culture. Furthermore, PCR is not likely to become the technique of choice in control and eradication programmes for CL since it does not allow for *in vivo* detection of subclinical

carriers, the main cause of disease spread within a flock.

Additional studies concerning the true prevalence and economic impact of CL should be conducted to more fully assess the importance of this disease in Portugal and in the Alentejo.

Acknowledgement

None of the authors declare any competing interests regarding the manuscript.

The authors wish to thank the administration of the private laboratory “Vetdiagnos – Cantanhede – Portugal” for all of its support in the processing of pathological samples; the director of the official veterinary services in Portugal (DIV Portalegre – DGAAV); the manager of the regional slaughterhouse in Sousel, Portugal for the powerful data and authorization for sampling; and, finally, the farmers who participated in this study for their permission to use their data and animals.

Recognition and special thanks goes to the Department of Animal Health – Infectious Disease Laboratory, in the Veterinary Faculty – Córdoba University – Spain, in particular to my tutors, Doctor Alfonso Maldonado and Doctor Belén Huerta.

My final acknowledgment goes to my fantastic family and friends, especially my dear friend Elsa Childs for the essential language support.

References

- Quinn P, Markey B, Leonard F, Hartigan P, Fanning S, et al. (2011) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2nd Edn). Dublin: Wiley-Blackwell, UK.
- Brown CC, Olander HJ, Alves SF (1987) Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous Lymphadenitis in a Slaughterhouse Survey of Goats and Sheep in Northeastern Brazil. *Can J Vet Res* 51: 46-9.
- Zavoshti FR, Khoojine A, Helan J, Hassanzadeh B, Heydari A (2012) Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Comp Clin Path* 21: 667-71.
- Çetinkaya B, Karahan M, Atıl E, Kalın R, De Baere T, Vaneechoutte M (2002) Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol* 88: 75-83.
- Arsenault J, Girard C, Dubreuil P, Daignault D, Galarneau J, et al. (2003) Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev Vet Med* 59: 67-81.
- Paton MW, Walker SB, Rose IR, Watt GF (2003) Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Vet J* 81: 91-5.
- Paton MW (2010) The epidemiology and control of Caseous Lymphadenitis in Australian Sheep Flocks, Doctoral Thesis: Murdoch University, School of Veterinary and Biomedical Sciences, Australia.
- Stauber E, Armstrong P, Chamberlain K, Gorgen B (1973) Caseous Lymphadenitis in white-tailed deer. *J Wild Life Dis* 9: 56-7.
- Peel M, Palmer G, Stacpoole A, Kerr T (1996) Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. *Clin Infect Dis* 24: 185-91.
- Selim SA (2001) Oedematous Skin Disease of Buffalo in Egypt. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48: 241-58.
- Baird GJ, Fontaine MC (2007) *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J Comp Pathol* 137: 179-210.
- Torres L, Ribeiro D, Hirata R Jr, Pacheco L, Souza M, et al. (2013) Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Mem Institute Oswaldo Cruz* 108: 272-9.
- Boysen C, Davis E, Beard L, Lubbers B, Raghavan R (2015) Bayesian Geostatistical Analysis and Ecoclimatic Determinants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection among Horses. *PLOS One* 10: e0140666.
- Guedes M, Souza B, Sousa T, Loureiro D, Moura-Costa L, et al. (2015) *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: clinical, microbiological and prevention aspects (Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos). *Braz J Vet Res* 35: 701-8.
- Oliveira M, Barroco C, Mottola C, Santos R, Lemsaddeck A, et al. (2014) First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domestica*). *Vet Res* 10: 218.
- Radostits OM, Gay DC (2007) *Text Book of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, Saunders.
- Bradford S (2015) *Large Animal Internal Medicine*. Missouri (5th Edn). Elsevier.
- Guimarães AS, Carmo FB, Heinemann MB, Portela RW, Meyer R, et al. (2011) High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Vet Res* 7: 68.
- Gómez-Gascón L, López P, Cardoso-Toset F, Luque I, Huerta B, et al. (2013) Pseudotuberculosis in Andalusia: Update of the laboratory diagnosis (Pseudotuberculosis en Andalucía: Actualización del diagnóstico laboratorial) *Producción Animal* 279: 20-9.
- Barba M, Stewart A, Passler T, Wooldridge A, Santen E, Chamorro M (2015) Experimental Transmission of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar equi in Horses by House Flies. *J Vet Intern Med* 29: 636-43.
- Oreiby AF (2014) Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. *Small Ruminant Res* 123: 160-6.
- Dercksen DP, Brinkhof J, Dekker-Norren T, van Maanen K, Bode C, et al. (2000) A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet Microbiol* 75: 167-75.
- Kaba J, Kutschke L, Gerlach GF (2001) Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Vet Microbiol* 78: 155-63.
- Binns SH, Green LE, Bailey M (2007) Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet Microbiol* 123: 169-79.

25. Hoelzle L, Scherrer T, Muntwyler J, Wittenbrink MM, Philipp W, et al. (2013) Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. *Vet Microbiol* 164: 359-65.
26. Kumar J, Tripathi BN, Kumar R, Sonawane GG, Dixit SK (2013) Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. *Trop Anim Health Prod* 45: 1429-35.
27. Pacheco L, Pena R, Castro TL, Dorella F, Bahia R, et al. (2007) Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J Med Microbiol* 56: 480-6.
28. Debien E, Hélie P, Buczinski S, Lebœuf A, Bélanger D, et al. (2013) Proportional mortality: A study of 152 goats submitted for necropsy from 13 herds in Quebec, with a special focus on caseous lymphadenitis. *Can Vet J* 54: 581-7.
29. Jung BY, Lee SH, Kim HY, Byun JW, Shin DH, et al. (2015) Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Trop Anim Health Prod* 47: 657-61.
30. Al-Gaabary M, Osman SA, Ahmed MS, Oreiby AF (2010) Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. *Small Ruminant Res* 94: 117-24.
31. Statistics Portugal (2009) National Statistics Institute (INE) (Instituto Nacional de Estatística (INE). Efetivo Caprino por Municípios.
32. Portugal (2014) National Institute of Statistics (INE) Effective Sheep by Municipalities (Instituto Nacional de Estatística (INE) Efetivo Ovino por Municípios). European Statistical System.
33. Statistics Portugal (2017) Indicators of agriculture and forestry by NUTS, 2016. National Institute of Statistics (Instituto Nacional de Estatística (INE).
34. Statistics Portugal (2017) Efetivo ovino (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2001) e Categoria (efetivo ovino).
35. Portugal (2017) Goat cash (No.) by Geographic localization (NUTS - 2013) and Category (goat cash); Annual Data reference period [Efetivo caprino (N.º) por Localização geográfica (NUTS - 2013) e Categoria (efetivo caprino). Natl Stat Inst.
36. Pugh DG, Baird AN (2012) *Sheep and Goat Medicine* (2nd Edn). *Can Vet J* 55: 360.
37. Malone F, Fee S, Kamp E, King D, Baird GJ, et al. (2006) A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of sheep. *Irish Vet J* 59: 19-21.
38. Boinas F, Mendes S & Pateira L (2000) Caseous lymphadenitis in small ruminants in Portugal (Linfadenite caseosa em pequenos ruminantes em Portugal). *Veterinária Técnica* 10: 18-23.
39. Portugal (2000) Directorate-General for Agriculture and Regional Development (DGADR). Products with protected designation of origin (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Regional (DGADR). Produtos com denominação de origem protegida).

Submit your next manuscript to Annex Publishers and benefit from:

- ▶ Easy online submission process
- ▶ Rapid peer review process
- ▶ Online article availability soon after acceptance for Publication
- ▶ Open access: articles available free online
- ▶ More accessibility of the articles to the readers/researchers within the field
- ▶ Better discount on subsequent article submission

Submit your manuscript at
<http://www.annexpublishers.com/paper-submission.php>

ANEXO 5: Lina Costa; Alfonso Maldonado; Belén Huerta. (2019) Estudio Descriptivo sobre la Pseudotuberculosis en Pequeños Ruminantes en la Región del Alto Alentejo (Portugal) y Determinación de la Utilidad de la Técnica de Diagnóstico ELISA (ELITEST CLA # CK105A®). Presentación de Poster en el VII Congreso científico de investigadores en formación de la Universidad de Córdoba, febrero de 2019.



UNIVERSIDAD DE CORDOBA



Estudio Descriptivo sobre la Pseudotuberculosis en Pequeños Ruminantes en la Región del Alto Alentejo (Portugal) y Determinación de la Utilidad de la Técnica de Diagnóstico ELISA (ELITEST CLA # CK105A®)

LINA COSTA; ALFONSO MALDONADO; BELÉN HUERTA
 Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal.
 E-mail: costa.lina@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. ovis*) es la causa más frecuente de Linfadenitis caseosa (LC), un proceso infeccioso muy contagioso de curso crónico y caquetizante que afecta principalmente ovejas y cabras, caracterizada por la formación de abscesos en uno o más linfonodos [1,2,3]. Menos frecuentemente, puede resultar en neumonía, hepatitis, mastitis, artritis, orquitis, abscesos subcutáneos, aborto, nacimientos prematuros, infertilidad y mortalidad perinatal en estas especies [1,2,3,4,5,6,7]. Se considera como una de las enfermedades más importantes, en términos económicos, de las ovejas y cabras en los EEUU, Canadá y Australia, causando importantes pérdidas en países donde la enfermedad se considera endémica [6,8,9,10].

En este trabajo de tesis doctoral se planteó un estudio de prevalencia real de la enfermedad, un estudio de prevalencia en rebaños afectados bien como la evaluación de la utilidad de una técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) comercial en la detección de animales portadores asintomáticos, tornando posible su aplicación en programas de control y erradicación de LC en Portugal.

RESULTADOS

Seroprevalencia en animales	93%	Prueba ELISA
Prevalencia de LC en explotaciones afectadas	22%	Técnica de PCR clásica
ELISA directa	Baja especificidad (78%)	Elevada sensibilidad (100%)
Grupo de animales que realizaron ambas las pruebas (PCR y ELISA) (+94%)	52% (13/23) de los animales positivos a la prueba ELISA son positivos al PCR.	Todos los negativos en el test ELISA (100% (15/15)) son negativos al PCR
Análisis de explotación y consideración de una explotación infectada se presenta por lo menos 1 animal positivo a ELISA	De las 32 explotaciones en estudio 66 tienen por lo menos un animal positivo	80% (16/20) de explotaciones afectadas
Aptitud ganadera	Explotaciones lecheras parecen presentar una mayor predisposición a la LC (no-PCR)	Prueba ELISA
Régimen de producción	Regímenes non extensivos (intensivo y semi-intensivo) 80% del total de animales con mayor propensión a la enfermedad (p<0.01)	Prueba ELISA
Tamaño de la explotación	Datos no son estadísticamente significativos (0.2>p>0.05) pero están en el borde (se y parecen sugerir que las explotaciones con enfermedades tienen una media de 85 animales y las explotaciones con enfermedad tienen una media de 171 animales a seguir, lo que parece significar que la LC es más prevalente en explotaciones medianas a grandes (100-300 animales y >300 animales)	Prueba ELISA

METODOLOGIA

Para ser representativo, se seleccionó una población de estudio de 82 rebaños (6% de pequeños ruminantes, de la que se recogieron aleatoriamente 756 muestras (n=756) de sangre (70% ovinos y 30% caprinos adultos). Procedimiento que se realizó en la propia explotación y en un matadero regional. En el grupo de animales muestreados, se señalaron los que presentaban lesiones (externas o internas) características de LC, haciendo corresponder la muestra de sangre a la muestra de lesión (n=58) recogida in vivo o post mortem. Del total de animales muestreados el 87% (633/736) son de explotaciones con aptitud de cebo y el 13% (101/736) son de aptitud lechera, 94% (713/736) de los animales eran explotados en régimen de producción extensivo, 3% (21/736) en régimen intensivo y otros 3% (20/736) en régimen semi-extensivo, lo que significa una porcentaje de 6% (40/736) en régimen non extensivo.

La seroprevalencia de la LC se determinó mediante una prueba de ELISA directa realizada en las 756 muestras de suero sanguíneo de ovejas y cabras. La identificación del agente etiológico de la LC, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se hizo por una técnica de PCR clásica, en las 58 muestras patológicas de pus y órganos afectados (Fig.1). Para el análisis de los datos se utilizó el sistema estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) y la prueba estadística qui-cuadrada [12] de Pearson para un intervalo de confianza del 95%.

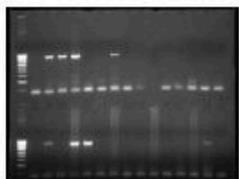


Figura 1: Imagen de electroforesis con resultados positivos en PCR clásica al *C. pseudotuberculosis*.

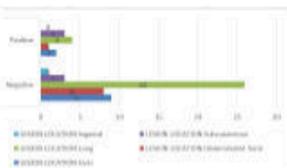


Figura 2: Gráfico representativo de la localización de las lesiones características de LC.



Figura 3: Lesiones post-mortem en un ovino con identificación de *C. pseudotuberculosis*: (a) Neumonía supurativa (purulenta); (b) Absceso pulmonar encapsulado. Forma visceral de LC.



Figura 4: Forma cutánea de LC en ovino.

CONCLUSIONES

La combinación de dos métodos de diagnóstico en la detección de LC e identificación del agente etiológico por técnicas moleculares y serológicas, permitió concluir que 22% de los rebaños afectados son portadores de infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* y 34% de los animales están infectados con la forma clínica o subclínica de la LC. Las ovejas son más afectadas por la forma visceral de la enfermedad y las cabras por la forma cutánea (Fig. 4). En la forma visceral, el pulmón es el órgano más afectado (Fig. 2 y 3). Esta investigación permitió la evaluación de la utilidad de la técnica de diagnóstico ELISA (ELITEST CLA # CK105A®) con la prueba capaz de detectar con una sensibilidad de 100% y una especificidad de 78% los casos subclínicos de LC.

Con estos resultados la autora considera la prueba ELISA utilizada una buena herramienta para aplicar en programas de control y erradicación de la LC.

Los resultados obtenidos en este trabajo no pueden ser tomados como totalmente exactos, pero pueden ser utilizados como base para otros estudios epidemiológicos más extensos. El presente estudio mostró algunas limitaciones, en particular el hecho de no haber sido posible identificar otros agentes etiológicos en las lesiones piogénicas en las muestras reunidas, lo que aumentaría el conocimiento sobre el diagnóstico diferencial de la LC, y también la realización de la técnica de PCR directamente de las lesiones piogramatósomas, no haciendo primero el cultivo y aislamiento microbiológico del agente.

La dispersión de LC en efectivos de ovejas y cabras en una región portuguesa de alta producción de ganado puede llegar a ser un grave problema sanitario, no sólo por las pérdidas económicas atribuidas directamente a la infección, así como la dificultad de certificación de las explotaciones nacionales como libres de la enfermedad, lo que hace imposible la apertura de mercados internacionales para la producción de pequeños ruminantes.

REFERENCIAS

[1] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[2] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[3] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[4] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[5] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[6] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[7] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[8] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[9] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[10] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[11] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

[12] Wilson-Rogge B y Taranovich-Saunders. *Neumonía supurativa (purulenta) en cabras*. *Compendio Veterinario*. (2006). 11 Congreso Mundial Veterinario de Diagnóstico por Imagen. Universidad Federal de Veterinaria y Zootecnia.

Anexo 6: Lina Costa (2016). LINFADENITE CASEOSA NO ALTO ALENTEJO, PORTUGAL – Estudo preliminar de prevalência da doença em rebanhos de pequenos ruminantes afetados e Otimização da prova de PCR Clássico no diagnóstico e identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. PUBLICAÇÃO ZOETIS – SAÚDE ANIMAL – PORTUGAL. <http://hdl.handle.net/10400.26/18564>.

“LINFADENITE CASEOSA NO ALTO ALENTEJO, PORTUGAL –
Estudo preliminar de prevalência da doença em rebanhos de
pequenos ruminantes afetados e Otimização da prova de PCR
Clássico no diagnóstico e identificação de *Corynebacterium
pseudotuberculosis*”.



Imagem de capa: Forma clínica adenítica superficial de Linfadenite Caseosa em ovino de raça Lacaune (efetivo de ovinos leiteiros da região em estudo, 2015).

Lina Costa
Maio 2016



Instituto
Politécnico
Portalegre



Escola
Superior
Agrária
Évora
(IPPortalegre)



PUBLICAÇÃO ZOETIS – SAÚDE ANIMAL – PORTUGAL

Revisão de texto: Doutora Heiga Waap – INIAV



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria
Mayo 2021