GENOTYPE AND PHENOTYPE ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE MECHANISMS IN *Corynebacterium pseudotuberculosis* †

[ANÁLISIS DE GENOTIPO Y FENOTIPO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN *Corynebacterium pseudotuberculosis*]

Dan Israel Zavala-Vargas[1,2], Roberto Montes-de-Oca-Jiménez[1,3*], Martha Elba Ruiz-Riva-Palacio[3], Adriana del Carmen Gutiérrez-Castillo[1], Pilar Eliana Rivadeneira-Barreiro[4], Gabriel Arteaga-Troncoso[5,6], Pablo Cleomenes Zambrano-Rodríguez[4], Pedro Sánchez-Aparicio[1], José Antonio Ibancovichi-Camarillo[1], Siomar de-Castro-Soares[7] and Vasco Ariston de Carvaho Acevedo[8]

[1] *Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 15.5 autopista de cuota Toluca Atlacomulco, Toluca CP 50200, Estado de México, México. Email: rmontesdeocaj@uaemex.mx*, acgutierrezc@uaemex.mx, psanchezap@uaemex.mx, danisraelz@gmail.com, jaibancovichic@uaemex.mx*

[2] *Hospital General de Chimalhuacán, IMSS-Bienestar, Av. Del Peñón Mza. 400 Lt. 1 Barrio Canteros, Chimalhuacán, Edo. México. CP 56330.*

[3] *Plantel Sor Juana Inés de la Cruz, Universidad Autónoma del Estado de México- Amecameca, Amecameca de Juárez C.P. 56900, Estado de México, México. Email: meruizr@uaemex.mx*

[4] *Departamento de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Urbina Avenida, Portoviejo C.P. 130105, Portoviejo, Ecuador. Email: pilar.rb26@hotmail.com, drpablozambrano@gmail.com*

[5] *Departamento de Biología y Desarrollo Celular, Instituto Nacional de Perinatología, Lomas de Chapultepec Sec. IV, Miguel Hidalgo, Ciudad de México C.P. 11000, México. Email: drgarteagat@yahoo.com.mx*

[6] *Escuela Militar de Oficiales de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicanos Ejército y Fuerza Aérea, SEDENA, Ciudad de México C.P. 11650, México.*

[7] *Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología, Universidad Federal del Triángulo Mineiro, Av. Frei Paulino, 30-Nossa Sra. da Abadia, Uberaba-MG C.P. 38025-180 Uberaba, Minas Gerais, Brasil. Email: siomars@gmail.com*

[8] *Departamento de Genética, Ecología y Evolución. Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte M.G. Brasil. Email: vascoariston@gmail.com*

**Corresponding author*

SUMMARY

Background. *Corynebacterium pseudotuberculosis (C. pseudotuberculosis)* is a Gram-positive intracellular bacterium that causes caseous lymphadenitis and causes significant economic damage to the livestock industry

† *Submitted February 12, 2025 – Accepted April 28, 2025.* http://doi.org/10.56369/tsaes.6192

Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

ISSN: 1870-0462.

ORCID = D.I. Zavala-Vargas: http://orcid.org/0000-0001-8821-5900; **R. Montes-de-Oca-Jiménez**: http://orcid.org/0000-0002-0282-2660; **M.E. Ruiz-Riva-Palacio**: http://orcid.org/0000-0001-7653-3231; **A,C, Gutiérrez-Castillo**: http://orcid.org/0000-0002-5698-6652; **P.E. Rivadeneira-Barreiro**: http://orcid.org/0000-0003-1921-0967; **G. Arteaga-Troncoso**: http://orcid.org/0000-0001-9419-9572; **P.C. Zambrano-Rodríguez**: http://orcid.org/0000-0002-3496-8816; **P. Sánchez-Aparicio**: http://orcid.org/0000-0002-6511-6595; **J.A. Ibancovichi-Camarillo**: http://orcid.org/0000-0003-1760-687X; **S. de-Castro-Soares**: http://orcid.org/0000-0001-7299-3724; **V.A. de Carvaho Acevedo**: http://orcid.org/0000-0002-4775-2280

by affecting animal physical condition and decreasing milk and meat production. Furthermore, due to its biochemical characteristics, it is a difficult-to-treat bacterium with multiple antimicrobial resistance phenotypes. Antimicrobial resistance in *C. pseudotuberculosis* is a global problem that threatens the ability of pharmacotherapy to treat common infections and affect livestock worldwide. **Objective.** In this study, a comparative analysis of antimicrobial resistance phenotypes and genotypes was performed. Initially, an extensive search was carried out for antibacterials that were reported in the literature with antimicrobial resistance in *C. pseudotuberculosis*. Subsequently, the genomes reported in the NCBI database were taken and analyzed using the Resistance Gene Identifier (RGI) software to obtain a prediction of the pathogen's resistance genes. **Results.** In the bibliographic search, high resistance to beta-lactams such as penicillin, amoxicillin, clindamycin, gentamicin, kanamycin, erythromycin, and trimethoprim/sulfamethoxazole was observed. These data are consistent with the results obtained from the resistance gene prediction. However, we were unable to predict resistance sequences against some antimicrobials such as penicillin. This can be explained by some structural characteristics of the pathogen, in addition to the environmental factors that lead it to generate resistance. **Implications.** The creation of predictive algorithms for antibacterial resistance is on the rise, although these seek to optimize treatment against pathogens, antibacterial resistance involves more factors than the presence of resistance genes. **Conclusion**. *C. pseudotuberculosis* is a pathogen that carries many antibacterial resistance genes, and several environmental and structural factors must be considered before choosing an appropriate treatment. Furthermore, our study proposes antimicrobials reported to have lower resistance that can be used in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep.
Key Words. Antibacterial resistance; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; gene prediction; antimicrobials.

RESUMEN

Antecedentes. *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) es una bacteria intracelular Gram-positiva que causa linfadenitis caseosa, genera daños económicos significativos en la industria ganadera al afectar la condición física del animal disminuyendo la producción de leche y carne. Aunado a esto, por sus características bioquímica es una bacteria difícil de tratar por presentar múltiples fenotipos de resistencia antimicrobiana. La resistencia antimicrobiana en *C. pseudotuberculosis* es un problema global que amenaza la capacidad de la farmacoterapia para tratar a las infecciones comunes y que afecta la ganadería a nivel mundial. **Objetivo.** En este estudio, se realiza un análisis comparativo de fenotipos y genotipos de resistencia a los antimicrobianos. Inicialmente, se efectuó la búsqueda extensiva de antibacterianos que fueron reportados bibliográficamente con resistencia antimicrobiana en *C. pseudotuberculosis*. Posteriormente, se tomaron los genomas reportados en la base de datos NCBI y se analizaron utilizando el software Identificador de Genes de Resistencia (RGI) para obtener una predicción de genes de resistencia del patógeno. **Resultados.** En la búsqueda bibliográfica, se observó una alta resistencia a betalactámicos como penicilina, amoxicilina, clindamicina, gentamicina, kanamicina, eritromicina y trimetoprim/sulfametoxazol. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos de la predicción de genes de resistencia. Aunque no logramos predecir secuencias de resistencia contra algunos antimicrobianos como la penicilina. Esto puede explicarse por algunas características estructurales del patógeno, además de los factores ambientales que lo llevan a generar resistencia. **Implicaciones.** Está en auge la creación de algoritmos predictivos de resistencia antibacteriana, aunque con estos se busca optimizar el tratamiento contra patógenos la resistencia antibacteriana implica más factores que la presencia de genes de resistencia. **Conclusión**. *C. pseudotuberculosis* es un patógeno portador de un gran número de genes de resistencia antibacteriana y es necesario considerar una serie de factores ambientales y estructurales antes de elegir un tratamiento adecuado. Además, nuestro estudio propone antimicrobianos reportados con menor resistencia que pueden usarse en el tratamiento de la linfadenitis caseosa en ovejas.
Key words. Resistencia a los antibacterianos; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; predicción genética; antimicrobianos.

INTRODUCCIÓN

C. pseudotuberculosis es una bacteria Gram-positiva que pertenece al grupo CMNR (Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia y Rhodococcus). Estos patógenos comparten características que incluyen una capa lipídica externa, ácidos micólicos en la pared celular junto con sus derivados, incluidos fosfolípidos y lipomananos. *C. pseudotuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo que muestra formas pleomórficas como bacilos cocoides y filamentosos, no móviles, no esporulados y que poseen fimbrias. Su tamaño varía entre 0,5 µm a 3,0 µm. El genoma consiste en un solo genoma circular de 2,5 Mbp de longitud con 2101 genes codificadores de proteínas, 12 ARNr, 49 ARNt y 47 pseudogenes y un contenido de G+C de 52,85

(Szwako *et al.*, 2014; Terab *et al.*, 2021). *C. pseudotuberculosis* tiene dos biovares, las cepas aisladas de pequeños rumiantes (biovar *ovis*) que no pueden reducir el nitrato a nitrito; mientras que las aisladas de caballos y ganado (biovar *equi*) poseen generalmente un nitrato reductasa y pueden reducir el nitrato (Terab *et al.*, 2021). Aunque estos biovares no muestran una adaptación estricta al hospedero, estudios como los de Britz y colaboradores (2014), Schlicher y colaboradores (2021) y principalmente los datos de secuenciación depositados en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) confirman que el biovar *ovis* se aísla principalmente de infecciones en pequeños rumiantes y el biovar *equi* se aísla de caballos y grandes rumiantes. *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* causa la linfadenitis caseosa; con una forma cutánea que afecta a los nódulos linfoides superficiales y la forma visceral que afecta a los nódulos linfoides profundos, el hígado, riñón y pulmón. En ambas formas, se presentan abscesos de tamaño variable con exudado que va desde seroso a caseoso (Ruiz *et al*., 2020). Esta patología provoca un deterioro general de los animales enfermos y disminuye la producción de lana, carne y leche (Ruiz *et al*., 2020). Para el control de la infección asociada a *C. pseudotuberculosis*, el uso de antimicrobianos ayuda en el tratamiento en las primeras etapas de la infección. Sin embargo, se ha demostrado que *C. pseudotuberculosis* presenta diferentes mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Abebe *et al*., 2015).

En *C. pseudotuberculosis* se pueden destacar tres mecanismos de resistencia antimicrobiana característicos de este patógeno. El primero son los ácidos micólicos o corinomicólicos, que actúan proporcionando una barrera muy hidrofóbica al acceso de los antibióticos formando una barrera de resistencia antibacteriana. Esta capacidad de bloquear el acceso a los antibióticos hidrofílicos descarta antibióticos de uso común como la penicilina. El segundo mecanismo antimicrobiano intrínseco involucra el tipo de lesión generada por *C. pseudotuberculosis*. Los abscesos generados tras la infección crónica presentan un centro de necrosis con exudado purulento o caseoso rodeado por varias capas de tejido conjuntivo y leucocitos que le confieren un aspecto de "aros de cebolla". Todas las capas celulares del absceso impiden que los antibióticos lleguen a las bacterias dentro del piogranuloma, lo que lo se convierte en un mecanismo de resistencia antimicrobiana (Fontaine *and* Baird, 2008). Además, las bioplacas actúan como un mecanismo de resistencia antimicrobiana al reducir la penetración de antibióticos. También se presentan las bombas de eflujo de antibacterianos capaces de eliminar los antibióticos de la bioplaca (Hajiagha *and* Kafil, 2023). Se ha observado que las colonias bacterianas tienden a exhibir una resistencia a los antibióticos 1000 veces mayor en comparación con sus cepas planctónicas (Mulcahy *et al*., 2008).

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos basadas en cultivos son el método principal empleado por los laboratorios clínicos. Aunado a esto, la secuenciación del genoma completo para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos ofrece el potencial de proporcionar predicciones rápidas, consistentes y precisas de cada fenotipo de resistencia conocido para una cepa, así como proporciona simultáneamente datos de vigilancia valiosos. Aun no es posible predecir la resistencia antibacteriana basado únicamente en la secuencia del genoma, por lo que comprender las implicaciones de esta relación, facilitaría la elección de un esquema de tratamiento optimo, reduciendo las pérdidas ocasionadas por *C. pseudotuberculosis* en diversas especies animales, particularmente en ovinos, caprinos y equinos.

El objetivo de este estudio es analizar la relación entre el genotipo y el fenotipo de resistencia en *C. pseudotuberculosis*. Para esto, se realizó un análisis comparativo entre la resistencia antibacteriana reportada en la literatura y las secuencias de resistencia antibacteriana predichas por análisis *in silico* utilizando el software Identificador de Genes de Resistencia (RGI) de la Base de datos completa sobre resistencia a los antibióticos (CARD) (Alcock *et al*., 2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

Predicción de resistomas

RGI es el algoritmo de CARD para la predicción computacional de genotipos y fenotipos de Resistencia Antimicrobiana (RAM) a partir de datos genómicos utilizando los modelos de detección bioinformática curados en CARD. Las ventajas de utilizar RGI sobre otros softwares de análisis de resistencia es que cuenta con una anotación detallada de genes de resistencia y clases de fármacos específicos, además, cuenta con una interfaz web más o puede utilizarse en línea de comandos. Este software trabaja hacia la armonización con otras bases de datos de RAM, incluidas específicamente las proporcionadas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), como el Catálogo de Genes de Referencia

de Detección de Patógenos. La base de datos completa de resistencia a los antibióticos CARD combina la ontología de resistencia a los antibióticos (ARO) con secuencias de genes RAM (ARG) curadas y mutaciones que confieren resistencia para proporcionar un marco informático para la anotación e interpretación de resistomas. Este análisis se realizó con 227 genomas de *C. pseudotuberculosis* y se consideraron los resultados que tienen una identidad superior al 40% en comparación con las secuencias ontológicas. Para este análisis se tomó el total de la base de datos de secuencias de referencia (RefSeq) de genomas reportados de *C. pseudotuberculosis.* Las secuencias de genomas fueron tomadas del National Library of Medicine of The National Center for Biotechnology Information. Que inicialmente se descargaron en formato FASTA. Posteriormente las secuencias se analizaron en el Identificador de Genes de Resistencia (RGI), versión 6.0.3, base de datos CARD 4.0.0, predicción de marco de lectura abierto con Prodigal, detección de homólogos con DIAMOND y significancia estricta basada en puntos de corte de bits seleccionados por CARD. Para el análisis se utilizaron las opciones, Tipo de datos; Secuencia de ADN, Seleccionar criterios; Golpes perfectos, estrictos y sueltos, que detecta variantes previamente desconocidas de genes RAM conocidos, incluido el cribado secundario de mutaciones clave, utilizando modelos de detección con los puntos de corte de similitud curados de CARD para garantizar que la variante detectada sea probablemente un gen funcional. Nudge mayor al 95% de identidad de impactos sueltos, Excluir; este parámetro ajusta secuencias como estrictas, independientemente de la longitud de la alineación, Calidad de la secuencia; Baja. El parámetro calidad/cobertura, permite la predicción del marco de lectura abierto. La base de datos completa de resistencia a los antibióticos CARD combina la ontología de resistencia a los antibióticos con secuencias de genes de resistencia a antimicrobianos curadas y mutaciones que confieren resistencia para proporcionar un marco informático para la anotación e interpretación de resistomas (Alcock *et al*., 2021; Clark *et al.*, 2016).

RESULTADOS

Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos reportados

Para comprender los mecanismos de RAM en *C. pseudotuberculosis*, se realizó una búsqueda exhaustiva de antibióticos reportados con resistencia a este organismo. Como resultado se obtuvieron diversas publicaciones que reportan resistencia antimicrobiana a diferentes antibióticos, entre los cuales se encuentran trece betalactámicos diferentes. De las cuales, la resistencia al grupo de las penicilinas se ha referenciado seis veces; la amoxicilina muestra cuatro referencias con alta resistencia y una referencia con resistencia intermedia. Seguido de la penicilina y la ampicilina con dos referencias cada uno. La cefalosporina doxiciclina también tiene dos referencias de alta resistencia a los antimicrobianos. La gentamicina es el antibiótico con mayor número de referencias con cinco referencias de resistencia intermedia. La lincosamida clindamicina tiene cuatro reportes de alta resistencia. El macrólido eritromicina tiene tres referencias de alta resistencia, al igual que trimetoprima/sulfametoxazol.

La tabla 1 muestra la compilación de datos bioquímicos para cuarenta y un antibióticos reportados con resistencia antimicrobiana en *C. pseudotuberculosis* desde el 2015 a la fecha. En la primera columna se muestra la clasificación de los mecanismos de acción de los diferentes antimicrobianos encontrados en la búsqueda bibliográfica. En la columna grupo se muestra la clasificación de los antimicrobianos, donde las betalactámicas y sulfonamidas tienen una subclasificación. Luego se muestra el antimicrobiano, seguido de la referencia bibliográfica donde se reportó la resistencia, esta puede ser alta o intermedia.

Se analizaron doscientos veintisiete genomas con software RGI (Alcock *et al.*, 2021). Las similitudes se clasificaron en siete mecanismos de resistencia; bombas de eflujo de antibióticos, inactivación de antibióticos, alteración del objetivo de antibióticos, reemplazo del objetivo de antibióticos, permeabilidad reducida a antibióticos, protección del objetivo de antibióticos y alteración del objetivo de antibióticos-reemplazo del objetivo. Los genomas analizados se obtuvieron del conjunto de datos NCBI GenBank (Clark *et al.*, 2016). Las secuencias sin similitudes en el genoma se muestran en color azul. Las secuencias con una similitud se muestran en verde, las secuencias con dos similitudes se muestran en amarillo, las secuencias con tres similitudes se muestran en naranja, mientras que las secuencias con cuatro similitudes se muestran en rojo (ver material suplementario).

Tabla 1. Antimicrobianos registrados resistentes a *C. pseudotuberculosis.*

Mecanismo de acción	Grupo		Antimicrobiano	Resistencia	Resistencia intermedia
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	Betalactamicos	Penicilinas	Penicilina	[4, 5]	
			Amoxicilina	[2, 3, 4,8]	[3]
			Ampicilina	[1, 7]	[1]
			Oxacilina	[4]	
			Piperacilina	[4]	
			Bencilpenicilina	[7]	
		Cefalosporinas	Ceftriaxona	[4]	
			Cefotaxima		[3]
			Doxiciclina	[1, 4]	[1]
			Cefuroxima	[4]	
			Cefradina	[4]	
			Cefaclor	[7]	
		Carbapenems	Meropenem		[7]
	Glucopéptidos		Vancomicina	[1, 4]	[1]
	Bacitracina		Bacitracina	[4]	
Inhibición de la síntesis proteica	Aminoglucósidos		Gentamicina	[1, 2]	[1, 3, 5, 8, 9]
			Kanamicina	[1, 4, 8]	[1]
			Estreptomicina	[4]	
			Amicacina	[4]	
			Neomicina	[4]	
	Anfenicoles		Florfenicol	[1, 4]	[2]
	Lincosamidas		Clindamicina	[4, 5, 8]	[1, 2]
	Macrólidos		Claritromicina		[3]
			Eritromicina	[4, 5, 8]	
			Azitromicina	[8]	
	Tetraciclinas		Tetraciclina	[1]	[1]
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Quinolonas		Norfloxacino	[1, 2]	[1, 2]
			Ácido nalidixico	[4]	
			Enrofloxacino	[2]	
			Ciprofloxacino	[2]	[2]
	Rifamicinas		Rifampicina	[3, 4]	[3]
	Nitrofuranos		Nitrofurantoina	[6]	
			Furazolidona	[6]	
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Sulfonamidas	Trimetoprima sulfametoxazol	Trimetoprima /sulfametoxazol	[2, 3, 4]	[3]

1.-Abebe and Sisay (2015), 2.- Abd *et al.* (2019), 3.- Abdulrahman (2021), 4.- El Damaty *et al.* (2023), 5.- Gallardo *et al.* (2019), 6.-Li *et al.* (2018), 7.- Markova *et al.* (2024), 8.- Torky *et al.* (2023), 9.- Yeshitila *et al.* (2023)

Predicción *in silico* de genes de resistencia a *C. pseudotuberculosis*

Los datos obtenidos de la predicción se muestran como un mapa de calor en la Figura 1. Para este análisis se consideraron doscientas veintisiete secuencias reportadas en NCBI (Clark *et al.*, 2016). Se observó que los genomas en promedio tenían una longitud de 2334.8 pb, con un contenido promedio de GC de 52% y 2121 genes codificando 2014.4 proteínas. El perfil del resistoma basado en las secuencias genómicas reportadas indicó la prevalencia de una amplia variedad de genes de resistencia a antimicrobianos. Estos están asociados a fenotipos de resistencia a múltiples fármacos con una alta probabilidad de tener orígenes ambientales. Una gran parte de los genes de resistencia predichos son constitutivos ya que se encuentran en todos los genomas analizados. Esto puede ser porque originalmente tenían otra función dentro del ciclo de vida celular (Gaurav *et al.*, 2023). En este estudio, se predijo una combinación de genes de resistencia, quince genes involucrados en alterar los objetivos de los antibióticos, de los

cuales gyrB, EF-Tu, gyrA, vanI, ImrC, mupB, murA, uL3, embC, pncA y thyA estuvieron presentes de manera uniforme con doscientas veintisiete similitudes en total, mientras que los genes clbB, vanG obtuvieron ciento treinta y doscientos una, similitudes sucesivamente, mientras que folP únicamente obtuvo una similitud. El gen folP codifica la enzima dhps dirigida a sulfonamidas, y en este caso se observó el polimorfismo de un solo nucleótido T53P. También se obtuvieron diez genes vinculados a bombas de eflujo de antibióticos, de los cuales se observó que los genes que codifican los sistemas de bombas de eflujo aiIR, nalc, bcrA, tet(3) se conservaron en todas las secuencias y se presentaron al menos una vez, mientras que macB obtuvo un total de ochocientas cuarenta y seis similitudes. Este gen se presentó en todos los genomas, aunque en algunos no alcanzaba la identidad mayor al 40%, debido a esto en algunos casos se excluyó del mapa de calor. Por otro lado, se encontró que algunos genes de bomba de eflujo no estaban presentes en todos los genomas, como Lmrs, AmvA, aadT, TaeA, de los cuales el gen que obtuvo el menor número de resultados fue LmrS con un solo resultado.

Para una mejor comprensión de los resultados, fueron clasificados por tipo de antibiótico. En la Tabla 2 se muestran la resistencia a antibióticos y los genes predichos. En este análisis se puso en evidencia la resistencia a veintiún tipos de antibióticos. Los macrólidos se destacan por tener ontología con siete genes, encontrándose cinco genes en el mecanismo de resistencia a bomba de eflujo, un gen en alteración de diana antibiótica y otro gen en protección de diana antibiótica. La aminocumarina muestra ontología con tres genes, dos en eflujo de antibióticos y uno en alteración de la diana antibiótica. Las fluoroquinolonas también muestran tres genes de resistencia dos en eflujo de antibióticos y uno en alteración de blancos de antibióticos. Así como las cefalosporinas que muestran dos genes en inactivación de antibióticos y un gen en reducción de permeabilidad a antibióticos. Los antibióticos que presentaron dos genes para diferentes mecanismos de resistencia fueron los aminoglucósidos con un gen de bomba de eflujo e inactivación del antibiótico. La oxazolidina presentó un gen de bomba de eflujo y uno de alteración de la diana antibiótica. La sulfonamida presentó un gen de bomba de eflujo y uno de reemplazo del blanco del antibiótico. La cefalosporina también presentó dos genes de resistencia en diferentes mecanismos de inactivación del antibiótico y reducción de la permeabilidad al antibiótico. Los antibióticos que presentaron solo un mecanismo fueron; diaminopirimidina y tetraciclina ambos con genes de bomba de eflujo. Mientras que carbapenem, monobactam y fenicol mostraron cada uno una inactivación del gen del antibiótico. Por otro lado, elfamicina, glicopéptido, lincosamida, estreptogramina, pleuromutilina, poliamina, pirazina y ácido salicílico mostraron resistencia debido a una alteración del gen del blanco del antibiótico. El mecanismo que obtuvo mayor cantidad de resistencia a diferentes antibióticos fue el de bombas de eflujo con dieciséis genes diferentes, seguido de la alteración del blanco del antibiótico que presentó doce genes diferentes. Mientras que los mecanismos con menor número de genes fueron la reducción de la permeabilidad a los antibióticos y la alteración del blanco del antibiótico con reemplazo del blanco del antibiótico.

También se predijeron cuatro genes relacionados con la inactivación de antibióticos, de los cuales LHK-3 y catB2 obtuvieron doscientos veintisiete resultados cada uno, mientras que APH(3')-lla y TEM-116 obtuvieron ocho y siete resultados sucesivamente. Además, se encontraron tres genes relacionados con la protección de dianas de antibióticos, de los cuales ImrC y RbpA obtuvieron doscientos veintisiete resultados cada uno, mientras que el gen carA obtuvo cincuenta y cuatro.

Como resultado del análisis se observó una abundancia de genes de resistencia a antimicrobianos en donde los genes con mayor abundancia fueron el gen macB seguido de mupB y bcrA (Figura 1A). Por otro lado, los antibióticos que presentaron una mayor cantidad de secuencias de resistencia fueron; en primer lugar, los macrólidos, seguido de las fluoroquinolonas, los antimicrobianos tipo mupirocina, rifampicina, lincosamida y los glucopéptidos, es necesario señalar que el análisis arrojo cinco secuencias de multirresistencia que se ha detectado confieren resistencia a diferentes antibióticos (Figura 1B). En relación con los mecanismos de resistencia con un mayor porcentaje de secuencias presentes en nuestro análisis, en primer lugar, se apreció la resistencia antimicrobianos por alteración de la diana antibiótica, seguido de las bombas de eflujo y en tercer lugar la protección antibiótica (Figura 1C).

Se realizó un gráfico comparativo entre en porcentaje de genes de resistencia encontrados en el resistoma y el porcentaje de antibióticos

reportados con resistencia a antimicrobianos frente a *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Figura 2).

Al comparar los antibióticos con un mayor porcentaje de genes obtenidos en nuestro análisis contra los antibióticos con mayores referencias de resistencia a antimicrobianos, se observa que las coincidencias son mínimas; algunas de estas son: los fenicoles, lincosamidas, peptídicos, pirazinas, rifampicinas y tetraciclinas. Mientras que los antibióticos con mayor porcentaje en ambos casos no presentan incrementos en conjunto.

DISCUSIÓN

Los mecanismos de transferencia génica a menudo pueden promover la propagación simultánea de la resistencia antimicrobiana a varias clases de antibióticos no relacionados, especialmente si los genes para dicha resistencia se ubican en los mismos elementos genéticos móviles, estos genes son capaces de propagarse en el entorno animal y ambiental. Nuestros resultados demuestran la eficacia de estos mecanismos presentes en diferentes organismos. Y que convergen en el genoma de *C. pseudotuberculosis* preservando el ciclo celular de este patógeno. Aunque, no todos los genes que logramos predecir originalmente eran de importancia veterinaria, nuestro estudio abre el panorama para comprender la capacidad de transferencia de estas secuencias. Y implicaciones que conlleva la elección de tratamiento para esta patología.

Tabla 2. Antibióticos y ontología de genes de resistencia.

Antibiótico	Mecanismo de resistencia	Gen
Aminocumarina	Bomba de eflujo de antibióticos	novA, nalC
	Alteración del objetivo del antibiótico	gyrB
Fluoroquinolona	Bomba de eflujo de antibióticos	arlR, nalC
	Alteración del objetivo del antibiótico	gyrA
Macrólido	Bomba de eflujo de antibióticos	LmrS, macB, AmvA, nalC, aadT
	Alteración del objetivo del antibiótico	myrA
	Protección del objetivo antibiótico	carA
Aminoglucósido	Bomba de eflujo de antibióticos	Lmrs
	Inactivac ión de antibióticos	APH(3')-IIa
Oxazolidina	Bomba de eflujo de antibióticos	Lmrs
	Alteración del objetivo del antibiótico	clbB
Diaminopirimidina	Bomba de eflujo de antibióticos	Lmrs, nalC
Sulfonamida	Bomba de eflujo de antibióticos	nalC
	Reemplazo del objetivo antibiótico	sul4
Tetraciclina	Bomba de eflujo de antibióticos	aadT, tet(338)
Cefalosporina	Inactivación de antibióticos	LHK-3, TEM-116
	Permeabilidad reducida a los antibióticos	IreK
Carbapenémico	Inactivación de antibióticos	LHK-3, TEM-116
Monobactam	Inactivación de antibióticos	TEM-116
Fenicol	Inactivación de antibióticos	catB2
Elfamicina	Alteración del objetivo del antibiótico	EF-Tu
Glicopéptido	Alteración del objetivo del antibiótico	vanI, vanG
Lincosamida	Alteración del objetivo del antibiótico	ImrC, clbB
Estreptogramina, estreptogramina A	Alteración del objetivo del antibiótico	clbB
Pleuromutilina	Alteración del objetivo del antibiótico	clbB, uL3
Poliamina	Alteración del objetivo del antibiótico	embC
Pirazina	Alteración del objetivo del antibiótico	pncA
Ácido salicílico	Alteración del objetivo del antibiótico	thyA
Rifamicina	Alteración del objetivo de los antibióticos, reemplazo del objetivo de los antibióticos	rpoB
	Protección del objetivo de los antibióticos	RbpA

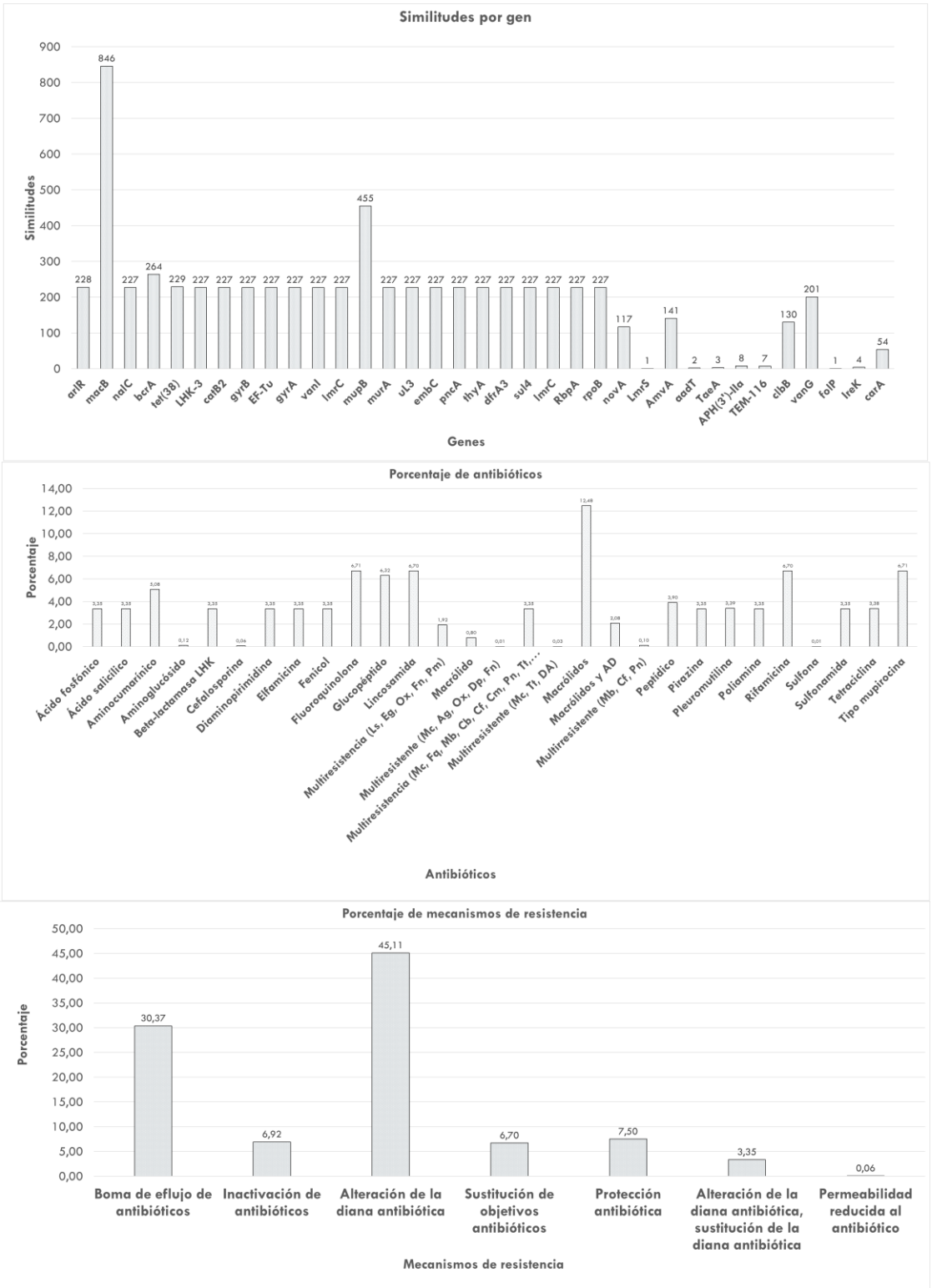

Figura 1. Análisis de genes de resistencia en *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **A.** Distribución de los genes de resistencia y el número de similitudes encontradas en la predicción del resistoma. **B.** Porcentaje de distribución de los antibióticos encontrados en el resistoma. **C.** Distribución del porcentaje de los diferentes mecanismos de resistencia

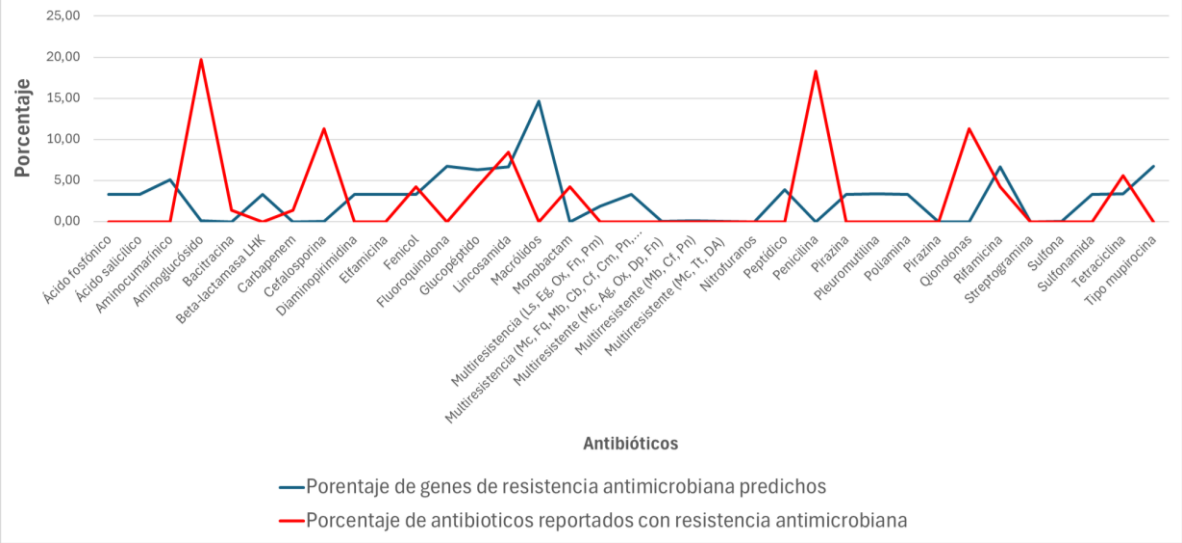

Figura 2. Análisis comparativo de la resistencia antimicrobiana de *Corynebacterium pseudotuberculosis.*

Entre los hallazgos de esta investigación, se predijo la presencia de los genes vanI y vanG, dos genes homólogos que confieren niveles medios a altos de resistencia a la vancomicina y resistencia media a la teicoplanina en *Desulfitobacterium hafniense* (Jagielski *et al.*, 2018). También se detectaron de tres a cuatro copias de macB en cada genoma. Este gen es una bomba de eflujo tripartita para la expulsión de antibióticos y factores de virulencia en bacterias Gram negativas (Zaw *et al.*, 2018).

Aunque las bombas de eflujo no se han estudiado en *C. pseudotuberculosis*, se han encontrado en *Corynebacterium striatum* (Nageeb *and* Hetta., 2023). En este trabajo informamos de la predicción de diez genes relacionados con las bombas de eflujo, para diferentes tipos de antimicrobianos. Estas son características de las bacterias formadoras de bioplaca (Jamal *et al.*, 2015). Además, el gen LmrS, esta reportado como un gen de bomba de eflujo de lincomicina en *Staphylococcus aureus* (Flemming *et al.*, 2007). También se detectaron de tres a cuatro copias de macB en cada genoma. Este gen es una bomba de eflujo tripartita para la expulsión de antibióticos y factores de virulencia en bacterias Gram negativas (Zaw *et al*., 2018).

Cabe destacar que los genes son LHK-3, que pertenece a la familia de las betalactamasas LHK y también se cree que está involucrado en la mediación de un mecanismo de retroalimentación que regula negativamente las infecciones bacterianas en la epidermis de la raíz (Held *et al.*, 2014). CatB2 por otro lado, es un gen relacionado con el reemplazo de dianas de antibióticos. Este gen es una variante de catB, un gen inducible por cloranfenicol en *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria que parasita plantas, este gen está regulado por atenuación de la traducción (Mak *et al.*, 2014).

Además, se identificó un gen asociado con la reducción de la permeabilidad a los antibióticos. El gen Irek codifica una quinasa transmembrana que regula la homeostasis de la pared celular, generando una fosforilación protectora de la pared celular y dando lugar a la resistencia a los antimicrobianos (Iannetta *et al.*, 2021). También se identificó un gen relacionado con la alteración y sustitución de la diana antibiótica. El gen rpoB produce resistencia a los antimicrobianos, y la misma mutación encontrada en este análisis (D516G, H526T, L511R) se ha descrito en *Mycobacterium gordonae* (Cabello-Vílchez *et al.*, 2022).

Los genes ImrC y RbpA confieren resistencia a la rifampicina y la lincosamida respectivamente y ambos han sido reportados en *Mycobacterium tuberculosis.* Otro hallazgo interesante fue el de las betalactamasas penicilinas y cefalosporinas, ya que encontramos un mayor registro de resistencia en cepas tratadas con amoxicilina. Nuestro análisis no reveló ningún gen de resistencia, lo que puede parecer contradictorio. Aunque el tratamiento de este patógeno con betalactámicos se considera una buena opción, especialmente cuando se administra por vía intravenosa; el uso constante de betalactámicos ha generado alta resistencia. Por lo tanto, es necesario considerar la penetrabilidad de

los abscesos por los antibacterianos debido a que algunos betalactámicos como la ampicilina tiene baja liposolubilidad, lo que dificulta el acceso del antibiótico a la lesión. Además, se debe considerar la barrera hidrofóbica de los ácidos corinomicólicos en la membrana celular. En contraste, el comportamiento de las cefalosporinas es consistente con el análisis genómico. Se ha reportado que los carbapenémicos tienen baja resistencia, y sus características químicas los hacen una buena opción para el tratamiento de *C. pseudotuberculosis*. Sin embargo, el gen LHK-3 codifica una betalactamasa y está presente en todas las cepas analizadas, lo que podría conferir resistencia.

Aunque los aminoglucósidos presentan pocos genes de resistencia, no se consideran la primera opción de tratamiento contra *C. pseudotuberculosis*. Debido a que su absorción disminuye en ambientes anaeróbicos o ácidos, pueden ser inactivados por materiales purulentos que también son hidrofílicos, impidiéndoles penetrar el absceso (Rhodes *et al.*, 2015) y la barrera del ácido corinomicólico. La gentamicina es el aminoglucósido más frecuentemente reportado, donde se muestra la mayor resistencia intermedia, y también destaca la lincosamida clindamicina. Por otro lado, entre los antibióticos que presentan mayor actividad contra *Corynebacteryum* spp. se encuentra la vancomicina, es un antibiótico hidrofílico con derivados hidrofóbicos (Kim *et al.*, 2021) que ha demostrado tener una buena penetración en los tejidos capsulares y pericapsulares.

Existe una tendencia mundial hacia la predicción de la resistencia antimicrobiana en *C. pseudotuberculosis*. Esto puede ser altamente complejo porque se deben considerar diferentes factores, incluyendo el biovar. Donde se han observado diferencias significativas en la resistencia antimicrobiana entre el biovar *equi* y el biovar *ovis*, se ha observado una mayor resistencia a los aminoglucósidos en este último. Las mismas diferencias entre biovar pero a menor escala se han encontrado para antibióticos como tilosina, cefalotina, espiramicina, cefalosporina y espectinomicina (Rhodes *et al.*, 2015). También es necesario destacar que no siempre se observa una correlación total entre los genes de resistencia y la expresión del fenotipo. Esto puedes ser debido a que, si la expresión de la resistencia implica un coste biológico, su regulación conlleva un ahorro energético (Depardieu *et al.*, 2007). También se debe considerar que las bacterias se adaptan al medio ambiente (clima, humedad, temperatura, luz, pH, localización anatómica, hospedero) (Jufri., 2020). Dado que el desarrollo del análisis pangenómico sería solo una parte para considerar, no se puede descartar en primera instancia las pruebas de sensibilidad *in vitro* para observar el fenotipo de resistencia y que se emplea con mayor frecuencia para el diagnóstico y tratamiento; y confiere la ventaja de disponer de una gran cantidad de datos.

CONCLUSIÓN

En este trabajo fueron predichos treintaicinco genes de resistencia de los cuales veintitrés son intrínsecos a este organismo y doce podrían considerarse extrínsecos, ya que no se encuentran en todos los genomas analizados. Al analizar la relación entre fenotipo y genotipo, se observa que, aunque este organismo porta múltiples genes de resistencia, en muchos casos no se ha reportado su expresión. Esto puede deberse a diferentes factores difíciles de predecir. Por ello, conocer la evolución de la linfadenitis caseosa es fundamental para su tratamiento. Para encontrar una solución funcional a este problema se necesita una herramienta capaz de correlacionar datos fenotípicos, genotípicos y ambientales, permitiendo una visión completa de la expresión fenotípica de la resistencia bacteriana.

Funding. DIZV thanks the COMECYT Chairs Program for the financial resources under number CAT2024-0090 and UAEM Project 7208/2025CIC.

Conflict of interest. The authors have no competing interests to declare.

Compliance with ethical standards. This project was approved by the Bioethics and Animal Welfare Committee of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the UAEM, with registration number DICARM-2021.

Data availability. Data are available from Dan Israel Zavala-Vargas at danisraelz@gmail.com.

Supplementary material. Figure and data is available at: http://zenodo.org/10.5281/zenodo.15326420

Author contribution statement (CRediT). D.I. Zavala-Vargas, conceptualization, funding acquisition, methodology. **R.M. Montes-de-Oca-Jiménez**, conceptualization, funding acquisition, methodology. **J.A. Ibancovichi-Camarillo**, data curation. **M.E. Ruiz-Riva-Palacio,** data curation. **A.delC. Gutiérrez-Castillo**, data curation. **S.de-**

Castro-Soares, data curation. **P.E. Rivadeneira-Barreiro**, data curation, supervision. **G. Arteaga-Troncoso**, supervision. **P.C.** Zambrano-Rodríguez, supervision. **P. Sánchez-Aparicio**, supervision. **V.A. de Carvaho Acevedo**, supervision.

REFERENCES

Abd El Tawab, A.A., Rizk, A.M., Afifi, S.E. and Mohamed, S.R., 2019. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in small ruminants and molecular study of virulence and resistance genes in Beni-Suef governorate. *Benha Veterinary Medical Journal, 37*, pp. 122-127.

Abdulrahman, R.F., 2021. Virulence potential, antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from caseous lymphadenitis in sheep and goats in Duhok City, Iraq. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9(6), pp. 919-925. https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.6.919.925

Abebe, D. and Tessema, T.S., 2015. Determination of the prevalence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. *Letters in Applied Microbiology*, 61(5), pp. 469–476. https://doi.org/10.1111/lam.12482

Alcock, B.P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K.W., Raphenya, A.R., Wlodarski, M.A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S.A., Tsang, K.K., Baker, S.J.C., Dave, M., McCarthy, M.C., Mukiri, K.M., Nasir, J.A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., Kwong, M., Liang, Z.C., Niu, K.C., Shan, P., Yang, J.Y.J., Gray, K.L., Hoad, G.R., Jia, B., Bhando, T., Carfrae, L.A., Farha, M.A., French, S., Gordzevich, R., Rachwalski, K., Tu, M.M., Bordeleau, E., Dooley, D., Griffiths, E., Zubyk, H.L., Brown, E.D., Maguire, F., Beiko, R.G., Hsiao, W.W.L., Brinkman, F.S.L. and Van Domselaar, G., 2023. CARD 2023: Expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), pp.D690–D699. https://doi.org/10.1093/nar/gkac920

Britz, E., Spier, S.J., Kass, P.H., Edman, J.M. and Foley, J.E., 2014. The relationship between *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* phenotype with location and extent of lesions in horses. *The Veterinary Journal*, *200*(2), pp. 282–286. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.009

Cabello-Vílchez, A.M., Dávila-Barclay, A. and Tsukayama, P., 2022. Isolation and genomic analysis of an intracellular *Mycobacterium gordonae* from a free-living *Acanthamoeba* sp. in a hospital environment in Lima, Peru. *Microbiology Resource Announcements*, 11(11), pp. e00784-22. https://doi.org/10.1128/mra.00784-22

Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Sayers, E.W., 2016. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D67-D72. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276

Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E. and Courvalin, P., 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), pp. 79–114. https://doi.org/10.1128/CMR.00015-06

El Damaty, H. M., El-Demerdash, A.S., Abd El-Aziz, N.K., Yousef, S.G., Hefny, A.A., Abo Remela, E.M., Shaker, A. and Elsohaby, I., 2023. Molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from caseous lymphadenitis of smallholder sheep and goats. *Animals*, 13(14), 2337. https://doi.org/10.3390/ani13142337

Flemming, H.C., Neu, T.R. and Wozniak, D.J., 2007. The EPS matrix: The "house of biofilm cells." *Journal of Bacteriology*, 189(22), pp. 7945–7947. https://doi.org/10.1128/JB.00858-07

Fontaine, M.C. and Baird, G.J., 2008. Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*, 76(1-2), pp. 42–48.

https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.007.12.025

Gallardo, A.A., Toledo, R.A., González Pasayo, R.A., Azevedo, V., Robles, C., Paolicchi, F.A. and Estevao Belchior, S.G., 2019. *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*: Evaluación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(2), pp. 123–129. https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.12.001

Gaurav, A., Bakht, P., Saini, M., Pandey, S. and Pathania, R., 2023. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology*, 169(5), 001333. https://doi.org/10.1099/mic.0.001333

Hajiagha, M.N. and Kafil, H.S., 2023. Efflux pumps and microbial biofilm formation. *Infection, Genetics and Evolution*, 112, 105459. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105459

Held, M., Hou, H., Miri, M., Huynh, C., Ross, L., Hossain, M.S., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Wang, T.L. and Szczyglowski, K., 2014. *Lotus japonicus* cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *The Plant Cell*, 26(2), pp. 678–694. https://doi.org/10.1105/tpc.113.119362

Iannetta, A.A., Minton, N. E., Uitenbroek, A.A., Little, J.L., Stanton, C.R., Kristich, C.J. and Hicks, L.M., 2021. IreK-mediated, cell wall-protective phosphorylation in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Proteome Research*, 20(11), pp. 5131–5144. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00635

Jamal, M., Tasneem, U., Hussain, T. and Andleeb, S., 2015. Bacterial biofilm: Its composition, formation, and role in human infections. *Research Reviews in Microbiology and Biotechnology*, 52(4), pp. 1701–1718. https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x

Jufri, R.F., 2020. The effect of environmental factors on microbial growth. *Journal of Louisiana Lifesciences*, 1(1), pp. 12-17.

Kim, D.W. and Cha, C.J., 2021. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: Understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental & Molecular Medicine*, 53, pp. 301–309. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z

Li, H., Yang, H., Zhou, H., Li, Z., Yi, X., Xu, W., Wang, Y. and Hu, Z., 2018. Isolation, antibiotic resistance, virulence traits, and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*, *168*, pp. 69–74. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.09.015

Mak, S., Xu, Y. and Nodwell, J.R., 2014. Antibiotic resistance in antibiotic-producing bacteria. *Molecular Microbiology*, 93(3), pp. 391–402. https://doi.org/10.1111/mmi.12689

Markova, J., Langova, D., Babak, V. and Kostovova, I., 2024. Ovine and caprine strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* on Czech farms: A comparative study. *Microorganisms*, 12(5), 875. https://doi.org/10.3390/microorganisms12050875

Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. and Lewenza, S., 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000213. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213

Nageeb, W.M. and Hetta, H.F., 2023. Pangenome analysis of *Corynebacterium striatum*: Insights into a neglected multidrug-resistant pathogen. *BMC Microbiology*, 23(1), 252. https://doi.org/10.1186/s12866-023-02996-6

Rhodes, D.M., Magdesian, K.G., Byrne, B.A., Kass, P.H., Edman, J. and Spier, S.J., 2015. Minimum inhibitory concentrations

of equine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates (1996–2012). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(1), pp. 327–332. https://doi.org/10.1111/jvim.12534

Ruiz, H., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Baselga, C., Alzuguren, O., Tejedor, M.T., de Miguel, R. and 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

Schlicher, J., Schmitt, S., Stevens, M.J.A., Stephan, R. and Ghielmetti, G., 2021. Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated over a 15-year period in Switzerland. *Veterinary Sciences*, 8(8), 151. https://doi.org/10.3390/vetsci8080151

Szwako, A., Ortíz, N. and López, D., 2014. Prevalencia de linfadenitis caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) en caprinos de establecimientos lecheros del departamento central - Paraguay, 2012. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 4(1), pp. 24–29.

Swain, S.S., Sharma, D., Hussain, T. and Pati, S., 2020. Molecular mechanisms of underlying genetic factors and associated mutations for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), pp. 1651–1663. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1785334

Terab, A.M.A., Abdel Wahab, G.E.D., Ishag, H.Z.A., Khalil, N.A.H., El Tigani-Asil, E.T.A., Hashem, F.M., Halafalla, A.I., Shah, A.A.M. and Al Muhairi, S.S.M., 2021. Pathology, bacteriology, and molecular studies on caseous lymphadenitis in *Camelus dromedarius* in the Emirate of Abu Dhabi, UAE, 2015–2020. *PLoS ONE*, 16(6), e0252893. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252893

Torky, H.A., Saad, H.M., Khaliel, S.A., Kassih, A.T., Sabatier, J.M., Batiha, G.E.S., Hetta, H.F., Elghazaly, E.M. and De Waard, M., 2023. Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Association with proinflammatory cytokines in caseous lymphadenitis pyogranulomas. *Animals*, 13(2), 296. https://doi.org/10.3390/ani13020296

Yeshitila, G., Gocmen, H., Tamakan, Y. and Hazel, H., 2023. Determination of antibiotic resistance pattern and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from lymph node samples of sheep and goats in Ethiopia. *Pakistan Journal of Zoology*, 55(1), pp. 1–7.

Zaw, M.T., Emran, N.A. and Lin, Z., 2018. Mutations within the rifampicin resistance-determining region of the *rpoB* gene associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Public Health*, 11(5), pp. 605–610. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.005