



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

“Caracterización molecular de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* de ovejas y cabras del estado de Jalisco”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A

Lic. En Biología Luis Donaldo Antúnez Núñez

COMITÉ DE TUTORES

Tutor Académico

Dr. en C. Roberto Montes de Oca Jiménez

Tutor adjunto

Dr. en C. Valente Velázquez Ordoñez

El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México. Agosto, 2023

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	3
2.2. Biovares de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	4
2.3. Linfadenitis caseosa	6
2.4. Transmisión	7
2.5. Factores de virulencia y patogenicidad	7
2.6. Epidemiología	10
2.7. Importancia económica	11
2.8. Diagnóstico de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en animales	12
2.8.1. Aislamiento bacteriológico	12
2.8.2. Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	13
2.8.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	14
2.9. Análisis de identidad de secuencia y filogenético	15
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
IV. JUSTIFICACIÓN	19
V. HIPÓTESIS	20
VI. OBJETIVOS	21
6.1. Objetivo general	21
6.2. Objetivos específicos	21
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Obtención de las muestras	22
7.2. Límite de espacio y tiempo	22
7.3. Aislamiento bacteriológico	22
7.4. Prueba bioquímica en cepa de campo de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>equi</i>	23
7.5. Extracción de ADN a partir de aislados de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	23

7.6.Determinación de la calidad y cuantificación de ADN	23
7.7.Estandarización del ensayo de PCR Cuádruplex	24
7.8.Diagnóstico molecular de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> mediante PCR Cuádruplex	25
7.9.Electroforesis en gel de agarosa	25
7.10. Secuenciación de los genes ARNr <i>16S</i> , <i>rpoB</i> y <i>pld</i>	25
7.11. Análisis de identidad de secuencias locales	25
7.12. Análisis filogenético de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A	26
VIII. RESULTADOS	27
8.1.Aislamiento de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	27
8.2.Identificación bioquímica de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>equi</i>	27
8.3.Estandarización del ensayo de PCR Cuádruplex	28
8.4.Diagnóstico molecular de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> mediante PCR Cuádruplex	29
8.5.Análisis de las secuencias de los genes <i>rpoB</i> , ARNr <i>16S</i> y <i>pld</i> de aislados de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i>	30
8.6.Análisis de las secuencias del gen <i>rpoB</i> de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i> en comparación con el aislado MEX30 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>equi</i>	32
8.7.Análisis de las secuencias del gen <i>rpoB</i> de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i> en comparación con el aislado MEX31 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>equi</i>	34
8.8.Análisis de las secuencias de los genes ARNr <i>16S</i> y <i>pld</i> de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>ovis</i> en comparación con los aislados MEX30 y MEX31 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> biovar <i>equi</i>	37
8.9.Análisis filogenético de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en comparación con secuencias reportadas en GenBank	38
IX. DISCUSIÓN	40
X. CONCLUSIONES	49
XI. RECOMENDACIONES	50

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
XIII. ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Aislamiento de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	27
Figura 2.	Prueba bioquímica de reducción de nitratos.	27
Figura 3.	Estandarización de PCR Cuádruplex.	28
Figura 4.	PCR Cuádruplex para la identificación del biovar de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	29
Figura 5.	Alineamiento de las secuencias del gen <i>rpoB</i> de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en comparación con las secuencias de las cepas mexicanas MEX1, MEX2 y MEX9 biovar <i>ovis</i> reportadas en la base de datos GenBank.	30
Figura 6.	Alineamiento de las secuencias del gen <i>rpoB</i> de los aislados 36A y 6J de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX30 reportada en la base de datos GenBank.	32
Figura 7.	Alineamiento de las secuencias del gen <i>rpoB</i> de los aislados 38-55-J y 61A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX30 reportada en la base de datos GenBank.	33
Figura 8.	Alineamiento de la secuencia del gen <i>rpoB</i> del aislado 36A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX31 reportada en la base de datos GenBank.	34
Figura 9.	Alineamiento de la secuencia del gen <i>rpoB</i> del aislado 6J de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX31 reportada en la base de datos GenBank.	35
Figura 10.	Alineamiento de las secuencias del gen <i>rpoB</i> de los aislados 38-55-J y 61A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX31 reportada en la base de datos GenBank.	36
Figura 11.	Alineamiento de las secuencias de los genes ARNr <i>16S</i> y <i>pld</i> de los aislados 38-55-J y 61A de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> en comparación con las secuencias de las cepas mexicanas MEX30 y MEX31 reportadas en la	37

base de datos GenBank.

- Figura 12.** Árbol filogenético construido mediante el empleo del programa MEGA11 con el método de Neighbor-Joining, basado en la secuencia del gen *rpoB* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 39

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Oligonucleótidos para la identificación por PCR Cuádruplex de los aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 24
- Tabla 2.** Aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y especies estrechamente relacionadas del GenBank para análisis filogenético. 26
- Tabla 3.** Porcentajes de similitud de la secuencia del gen *rpoB* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A en comparación con secuencias de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* reportadas en la base de datos GenBank. 31

RESUMEN

Corynebacterium pseudotuberculosis (*C. pseudotuberculosis*) es una bacteria intracelular causante de Linfadenitis Caseosa (LC) en pequeños rumiantes. *C. pseudotuberculosis* se clasifica en dos biovars, el biovar *ovis* que infecta a ovejas y cabras, y el biovar *equi* que infecta a caballos, camellos y búfalos. La identificación del tipo de biovar de *C. pseudotuberculosis* es importante para la prevención de la infección en la población animal y para establecer el comportamiento de la epidemiología de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar mediante técnicas moleculares aislados de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* de ovejas y cabras del estado de Jalisco. Se aisló e identificó mediante PCR Cuádruplex a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* en 30 de 59 muestras de abscesos cutáneos lo que representa un 50.84%. Los aislamientos presentaron únicamente la amplificación de los genes ARNr *16S* (816pb), *rpoB* (446pb) y *pld* (203pb), con un total de 8 (26.66%) animales jóvenes y 22 (73.33%) animales adultos. Fueron secuenciados los productos de amplificación (ARNr *16S*, *rpoB* y *pld*) de los aislados 36A, 6J, 38-55-J, 61A y se realizó un análisis bioinformático. El análisis de las secuencias del gen *rpoB*, presenta una identidad de secuencia de un 99.73% en correlación con las cepas biovar *ovis* MEX1, MEX2 y MEX9, mientras que con las cepas biovar *ovis* MEX25 y MEX29 presentan una identidad de un 100%. Respecto a la cepa biovar *equi* MEX30, las cepas 36A y 6J presentan una identidad de un 98.75%, mientras que las cepas 38-55-J y 61A presentan una identidad de un 98.92%. Y con la cepa biovar *equi* MEX31, las cepas 36A y 6J presentan una identidad de un 98.77%, mientras que las cepas 38-55-J y 61A presentan una identidad de un 98.92%. El análisis de las secuencias de los genes ARNr *16S* y *pld* en correlación con las cepas MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29 presentan una identidad de secuencia de un 100%. Respecto a la cepa MEX30, las secuencias del gen ARNr *16S* presentan una identidad de un 99.87%, y las secuencias del gen *pld* presentan una identidad de un 98.55%. En cuanto a la cepa MEX31, los genes ARNr *16S* y *pld* presentan las mismas similitudes que con la cepa MEX30. El análisis filogenético mostro que las 4 cepas secuenciadas son más cercanas a las cepas MEX25 y MEX29. Los resultados obtenidos son relevantes para comprender las características genómicas de los aislados circulantes y su mayor presencia en animales jóvenes; y establecer estrategias para el diagnóstico precoz y la prevención mediante la vacunación para el control de la linfadenitis caseosa en la zona de estudio.

Palabras clave: *C. pseudotuberculosis*, PCR Cuádruplex, análisis de secuencias, análisis filogenético, biovar *ovis*, biovar *equi*, pequeños rumiantes

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis (*C. pseudotuberculosis*) is an intracellular bacterium that causes Caseous Lymphadenitis (CL) in small ruminants. *C. pseudotuberculosis* is classified into two biovars, the biovar *ovis* that infects sheep and goats, and the biovar *equi* that infects horses, camels, and buffaloes. The identification of the biovar type of *C. pseudotuberculosis* is important for the prevention of infection in the animal population and to establish the behavior of the epidemiology of the disease. The objective of this work was to characterize by means of molecular techniques isolates of *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* from sheep and goats in the state of Jalisco. *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* was isolated and identified by Quadruplex PCR in 30 of 59 samples of skin abscesses, which represents 50.84%. The isolates only presented amplification of the *16S* rRNA (816bp), *rpoB* (446bp) and *pld* (203bp) genes, with a total of 8 (26.66%) young animals and 22 (73.33%) adult animals. The amplification products (*16S* rRNA, *rpoB* and *pld*) of isolates 36A, 6J, 38-55-J, 61A were sequenced and a bioinformatic analysis was performed. The analysis of the *rpoB* gene sequences shows a 99.73% sequence identity in correlation with the biovar *ovis* MEX1, MEX2 and MEX9 strains, while with the biovar *ovis* MEX25 and MEX29 strains they show 100% identity. Regarding the biovar *equi* MEX30 strain, strains 36A and 6J present an identity of 98.75%, while strains 38-55-J and 61A present an identity of 98.92%. And with the biovar *equi* MEX31 strain, strains 36A and 6J present an identity of 98.77%, while strains 38-55-J and 61A present an identity of 98.92%. The analysis of the sequences of the *16S* rRNA and *pld* genes in correlation with the strains MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 and MEX29 show a sequence identity of 100%. Regarding the MEX30 strain, the *16S* rRNA gene sequences have a 99.87% identity, and the *pld* gene sequences have a 98.55% identity. Regarding the MEX31 strain, the *16S* rRNA and *pld* genes present the same similarities as with the MEX30 strain. The phylogenetic analysis showed that the 4 sequenced strains are closest to the MEX25 and MEX29 strains. The results obtained are relevant to understand the genomic characteristics of the circulating isolates and their greater presence in young animals; and establish strategies for early diagnosis and prevention through vaccination to control caseous lymphadenitis in the study area.

Keywords: *C. pseudotuberculosis*, Quadruplex PCR, sequence analysis, phylogenetic analysis, biovar *ovis*, biovar *equi*, small ruminants

I. INTRODUCCIÓN

Corynebacterium pseudotuberculosis (*C. pseudotuberculosis*) biovar *ovis* es una bacteria intracelular Gram positiva (Burkovski, 2018) responsable de la Linfadenitis caseosa (LC), afecta principalmente a los pequeños rumiantes (Dorella *et al.*, 2006) y es considerado un patógeno de importancia zoonótica (Bastos *et al.*, 2012). *C. pseudotuberculosis* se puede clasificar en dos biovars, dependiendo de su capacidad para modificar nitrato a nitrito, las pruebas enzimáticas que resultan nitrato negativo corresponden con cepas biovar *ovis* y las cepas nitrato positivo con biovar *equi* (Almeida *et al.*, 2017a, Dorella *et al.*, 2006). *C. pseudotuberculosis* es un agente de distribución mundial; se ha reportado su prevalencia en América (Parise *et al.*, 2018), Australia (Windsor, 2014), Nueva Zelanda (House *et al.*, 1986), Europa (Parin *et al.*, 2018), Asia (Gao *et al.*, 2018) y África (Baird, 2007) causando importantes pérdidas económicas en la producción animal (Estevao *et al.*, 2006). *C. pseudotuberculosis* induce a dos formas clínicas de presentación de la enfermedad; ocasiona abscesos en nódulos linfáticos superficiales (forma cutánea) y la forma visceral a manera de abscesos en órganos como hígado, bazo, pulmón y riñón (Mahmood *et al.*, 2015; Odhah *et al.*, 2019).

En la actualidad, el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* se puede realizar mediante diferentes métodos, como el aislamiento bacteriológico a partir de medios de cultivo convencionales, la identificación mediante pruebas bioquímicas para el establecimiento del perfil enzimático y capacidad para utilizar diversas fuentes de carbono (Dorella *et al.*, 2006). También se utilizan métodos serológicos para la detección de anticuerpos específicos anti-exotoxina PLD mediante la prueba inmunoenzimática de tipo ELISA (Barral *et al.*, 2019). La técnica de PCR Multiplex permite la identificación de *C. pseudotuberculosis* mediante la amplificación de un fragmento del gen ARNr *16S*, *rpoB* y *pld* el cual diferencia *C. pseudotuberculosis* de especies estrechamente relacionadas como *Corynebacterium ulcerans* y *Corynebacterium diphtheriae* (Pacheco *et al.*, 2007). La identificación del tipo de biovar de *C. pseudotuberculosis* es importante para la prevención de la infección en la población animal y para establecer el comportamiento de la epidemiología de la enfermedad. Recientemente la técnica de PCR Multiplex fue modificada con la amplificación de un segmento del gen *narG* (nitrato reductasa) que permite diferenciar entre el biovar *ovis* y el biovar *equi*, quedando establecido un PCR Cuádruplex que permite la identificación hasta el nivel de biovar (Almeida *et al.*, 2017a; El-Sebay *et al.*, 2021).

La patogenia de *C. pseudotuberculosis* está muy ligada a su contenido genético, se han descrito varios factores de virulencia que influyen fuertemente en la capacidad de la bacteria para interactuar con el hospedero, provocando la infección (Dorella *et al.*, 2006). La exotoxina Fosfolipasa D (PLD) y los ácidos micólicos son ejemplos de estos factores en *C. pseudotuberculosis* (Sá *et al.*, 2013). A pesar de la importancia de *C. pseudotuberculosis*, se sabe poco sobre los mecanismos que controlan la expresión genética. Algunos estudios han evaluado su perfil transcripcional en diferentes condiciones ambientales (Ibraim *et al.*, 2019), la regulación transcripcional de las bacterias tiene factores de transcripción que son proteínas reguladoras que reconocen los sitios de unión del factor de transcripción en la región anterior de los respectivos genes diana, estimulando o reprimiendo su expresión (Hao *et al.*, 2018). Algunos otros estudios han investigado cepas mutantes que muestran la importancia de genes específicos, como *plD* (McKean *et al.*, 2007), el operón *fagABCD* (Billington *et al.*, 2002) y *phoP* (Tiwari *et al.*, 2014). La caracterización de nuevos factores de virulencia depende de la secuenciación del genoma del biovar (Baraúna *et al.*, 2017), considerando el papel de los genes relacionados con la patogenicidad en el genoma de *C. pseudotuberculosis*, el explorar y caracterizar dianas genéticas relacionadas con la enfermedad es de suma importancia (Araújo *et al.*, 2020). Estos métodos ayudan a comprender las características moleculares de las cepas circulantes, los brotes epidémicos, mejoran las estrategias de diagnóstico y favorecen el desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas (Miller *et al.*, 2010).

En México se han realizado algunos estudios sobre la caracterización del genoma de *C. pseudotuberculosis* (Parise *et al.*, 2018; Varela *et al.*, 2018); sin embargo, se debe ampliar y profundizar sobre los estudios de genómica en aislados de ovinos y caprinos en animales menores a 6 meses de edad, en virtud del incremento de la prevalencia en esta etapa etaria. Por ello, el objetivo del presente trabajo es realizar la caracterización molecular de aislados de *C. pseudotuberculosis* de ovejas y cabras del estado de Jalisco.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

La clasificación de *C. pseudotuberculosis* se estableció inicialmente mediante características morfológicas y bioquímicas (Jones y Collins, 1986). A la bacteria se le nombro bacilo de Preisz-Nocard, en honor al investigador Hugo von Preisz, quien la identificó por primera vez a partir de un absceso renal de cabra en 1894 (Brown y Olander, 1987). El microorganismo se renombró *C. ovis* en 1923, y luego quedó aceptada la nomenclatura de *C. pseudotuberculosis* en 1948 (Brown y Olander, 1987; Baird y Fontaine, 2007). Actualmente, *C. pseudotuberculosis* pertenece al phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Corynebacteriaceae*, género *Corynebacterium* (Von-Graevenitz y Bernard, 2006; Bernard y Funke, 2012). La bacteria *C. pseudotuberculosis* se clasifica en dos biovars (Dorella *et al.*, 2006), las cepas del biovar *ovis* que infectan a ovejas y cabras (Fontaine y Baird, 2008; Varela *et al.*, 2018), y las cepas del biovar *equi* que se han aislados de caballos, camellos y búfalos (Muñoz *et al.*, 2016; Borham *et al.*, 2017; Viana *et al.*, 2017). Esta clasificación se realizó en base a su habilidad para reducir nitratos, reducción de nitratos negativo para biovar *ovis* y reducción de nitratos positivo para el biovar *equi* (Dorella *et al.*, 2006). El género *Corynebacterium* en conjunto con *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (Dorella *et al.*, 2006) conforman el grupo de bacterias CMNR las cuales comparten algunas características en común, como la organización de la pared celular, compuesta principalmente por peptidoglicanos, arabinogalactanos, ácidos micólicos, y una proporción de guanina y citocina en el genoma (G + C = 47-74%) (de Sá Guimarães *et al.*, 2011).

C. pseudotuberculosis es un cocobacilo Gram-positivo, no esporulado, anaerobio facultativo (Oreiby, 2015; Hussain *et al.*, 2017), varia de tamaño de 0,5 µm a 0,6 µm de amplitud y 1,0 µm a 3,0 µm de longitud, presenta buen crecimiento a 37°C a un pH de 7,0 a 7,2. Tiene la capacidad de crecer en anaerobiosis, degradan la galactosa, maltosa, L-y D-arabinosa y glucosa sin producción de gases. En cultivo agar sangre en condiciones de anaerobiosis el crecimiento a las 24 horas es escaso con formación de colonias pequeñas de color blanco. Posteriormente a las 48-72h de incubación el crecimiento es abundante con formación de colonias más grandes, que toman una coloración blanca grisáceas y con visualización de hemolisis (Dorella *et al.*, 2006). El crecimiento de *C. pseudotuberculosis* en medio de cultivo caldo simple se presenta escaso sin turbidez, mientras que en caldo de Infusión Cerebro-Corazón, BHI (por sus siglas

en inglés, *Brain Heart Infusion*) se obtiene un crecimiento abundante con sedimento de color blanco amarillento. El cultivo de *C. pseudotuberculosis* se favorece cuando el medio BHI se suplementa con extracto de levadura, triptona o lactoalbúmina, así como con fosfato dibásicos, vitaminas y aminoácidos, lo que ha permitido estudiar la expresión y secreción de proteínas de este microorganismo (Pacheco *et al.*, 2011).

2.2. Biovares de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

C. pseudotuberculosis presenta dos biovares, *ovis* (reducción de nitrato negativa) y *equi* (reducción de nitrato positiva), el biovar *ovis* está asociado principalmente a la enfermedad de distribución mundial llamada Linfadenitis caseosa, que afecta los nódulos linfáticos (Mahmood *et al.*, 2015; Othman *et al.*, 2016) y los órganos viscerales de ovejas y cabras y causa pérdidas económicas al comprometer la piel, el peso, la producción de leche y carne del animal, y provoca el decomiso y la muerte (Odhah *et al.*, 2018; Faeza *et al.*, 2019). El biovar *equi* se presenta principalmente en hospederos como caballos, camellos y búfalos, tomando en cuenta síntomas variables de la enfermedad y signos viscerales (Cerdeira *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012), causando la enfermedad conocida como Linfangitis ulcerativa (Muñoz *et al.*, 2016), que se manifiesta a partir de abscesos ventrales del tórax y abdomen, y forunculosis (Connor *et al.*, 2007). Existen diversas vacunas contra *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* que están destinadas principalmente a ovinos y caprinos y proporcionan niveles de protección variables (Williamson, 2001; Windsor y Bush., 2016). Además, se han realizado más análisis basados en vacunología inversa en *C. pseudotuberculosis* biovar *equi*, con el fin de encontrar nuevas vacunas candidatas que pudieran inducir a una mayor respuesta inmunitaria contra este microorganismo (Soares *et al.*, 2013).

En un estudio de secuenciación el genoma de un total de 15 cepas de *C. pseudotuberculosis* de los biovares *ovis* y *equi*, aisladas de diferentes países y hospederos, en donde se realizó un análisis pangenómico en toda la especie con el objetivo de correlacionar las regiones de plasticidad del genoma con los patrones de la enfermedad y el hospedero de preferencia (Soares *et al.*, 2013). Se logro un mejor análisis de las secuencias del genoma de las cepas de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* aisladas de ovejas y cabras, por lo que se ha continuado realizado la secuenciación de otras cepas del biovar *ovis* e incluso del biovar *equi* de varios hospederos procedentes de diferentes países (Ramos *et al.*, 2013), en donde se identificaron 4

islas de patogenicidad PAI (por sus siglas en inglés, *Pathogenicity Island*) adicionales en *C. pseudotuberculosis* aislados de caballos (Ramos *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2012). La identificación de PAI se realizó utilizando el programa PIPS (Soares *et al.*, 2012), Artemis Comparison Tool (ACT) (Carver *et al.*, 2005) y Blast Ring Image Generator (Alikhan *et al.*, 2011). En primer lugar, se identificaron siete PAI de la cepa 316 (CP003077) de *C. pseudotuberculosis* biovar *equi* (Soares *et al.*, 2012), las islas identificadas se compararon con los siete PAI presentes en la cepa 1002 (CP001809) y la cepa C231 (CP001829.1) de *C. pseudotuberculosis* (PICP 1-7), ambas de biovar *ovis*, y la cepa CIP52.97 (CP003061) de biovar *equi*, con quienes mostro similitud (Ramos *et al.*, 2013). Sin embargo, los PAI putativos de *C. pseudotuberculosis* 4 y 5 (PICP 4 y 5) presentaron grandes deleciones en la cepa 316, incluidas 30 secuencias de codificación eliminadas (CDSs) en comparación con las cepas 1002 y C231 de *C. pseudotuberculosis*. Entre estos 30 CDS, 22 se anotaron como proteínas hipotéticas y los CDS restantes presentaron similitudes con una integrasa (Cp1002_0990), una proteína asociada al fago (Cp1002_1448), una proteína p51 (Cp1002_1449), proteína de biogénesis de ARNr *rrp5* (Cp1002_1450), factor de ARN polimerasa sigma-70 (Cp1002_1452), ADN metilasa (Cp1002_1457) y dos proteínas de unión a ATP del transportador ABC (Cp1002_1464 y Cp1002_1465). Además, PICP 5 indicó dos nuevos CDS en el genoma de la cepa 316 de *C. pseudotuberculosis* que codifican proteínas hipotéticas (Ramos *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Parise *et al.*, (2018) se analizaron seis genomas, 4 secuencias del biovar *ovis* (MEX1, MEX9, MEX25 y MEX29) y 2 secuencias del biovar *equi* (MEX30 y MEX31), en donde exclusivamente en el biovar *ovis* se encontró un grupo de genes que está relacionado con las proteínas de los sistemas de modificación de restricción (RM) de tipo III (Kwiatek *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2016), mientras que en el biovar *equi* se encontró un grupo de genes que está relacionado con las proteínas de los sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR-Cas) probablemente pertenecientes al tipo I-E (Sangal *et al.*, 2013). Ambos sistemas funcionan como sistemas de protección, defendiendo a *C. pseudotuberculosis* contra el ADN exógeno, esto se comprobó con el análisis de secuencias de 40 cepas de *C. pseudotuberculosis*, obteniendo el mismo resultado (Parise *et al.*, 2018). También en este análisis se encontró la presencia del gen *nrdF2*, en cinco de las seis cepas utilizadas. En la cepa MEX30 de *C. pseudotuberculosis*, el gen *nrdF2* se anota como una

secuencia nucleotídica similar a un gen normal pero que no se puede expresar (pseudogen). El producto de este gen es la pequeña subunidad del ribonucleótido reductasa (RNR) que participa en la síntesis de dNTP (desoxinucleótido trifosfato) que reduce los ribonucleótidos a nucleótidos. Los RNR se pueden clasificar en tres clases (I, II y III). La clase I depende del oxígeno y tiene dos subclases (Ia e Ib). La clase Ia está codificada por los genes *nrdA* y *nrdB*; la clase Ib está codificada por *nrdE* y *nrdF*. Por lo tanto, la RNR encontrada en las cepas del biovar *ovis* pertenece a la clase Ib (Kolberg *et al.*, 2004). Estudios previos (Mowa, 2009) muestran la importancia de este gen para el crecimiento en condiciones normales (*in vitro*) en *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium ammoniagenes* y *Corynebacterium glutamicum*. Además, otros estudios han señalado a este gen como un objetivo potencial de la vacuna contra *M. tuberculosis* (Mowa, 2009; Nurbo *et al.*, 2007). Se predijeron posibles nuevos objetivos farmacológicos utilizando la búsqueda de genes en la base de datos del centro de recursos de bioinformática Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) (Mao *et al.*, 2014).

2.3. Linfadenitis caseosa

La Linfadenitis caseosa (LC) es una enfermedad causada por *C. pseudotuberculosis* que afecta principalmente a poblaciones de pequeños rumiantes en diferentes países del mundo (Arsenault *et al.*, 2003). El biovar *ovis* infecta principalmente a ovejas y cabras, causando abscesos superficiales y viscerales, mientras que el biovar *equi* infecta principalmente a caballos causando linfangitis ulcerante de las extremidades distales, abscesos ventrales del tórax y abdomen, y forunculosis (Connor *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 2007). La LC se presenta en forma cutánea y visceral, con la formación de abscesos en nódulos linfáticos superficiales palpables a través de la piel y abscesos en órganos importantes como los pulmones, hígado y riñón, causando deterioro en la condición orgánica del animal hacia estados caquéticos de curso crónico (Estevao *et al.*, 2007). Las lesiones en abscesos cutáneos y nódulos linfáticos pueden ser ocasionadas por diferentes especies de microorganismos patógenos, como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Actinobacillus lignieresis*, *Arcanobacterium pyogenes* y *S. aureus* entre otros, destacándose el primero por su frecuencia en ovinos y caprinos (Batey, 1986; Andrade *et al.*, 2012).

2.4. Transmisión

La transmisión de *C. pseudotuberculosis* entre ovejas y cabras se produce principalmente a través de la contaminación de heridas superficiales (Aleman y Spier, 2001). La transmisión horizontal se favorece mediante contacto directo con el alimento o inhalación de polvo contaminado con el agente (O'Reilly *et al.*, 2008). La infección se inicia con el ingreso de la bacteria a través de lesiones generadas en el manejo de los animales, como la esquila y en menor medida cortes de cola, marcaje y castraciones (Cheuquepan *et al.*, 2008). El microorganismo se propaga rápidamente a los nódulos linfáticos en donde se desarrollan piogranulomas microscópicos que aumentan de tamaño y forman abscesos (Baird y Fontaine, 2007). *C. pseudotuberculosis* puede sobrevivir durante varias semanas en el medio ambiente, su supervivencia se ve mejorada en condiciones de humedad y bajas temperaturas, contribuyendo a su capacidad de propagarse dentro de un rebaño (Rizvi *et al.*, 1997).

2.5. Factores de virulencia y patogenicidad

Los estudios realizados en *C. pseudotuberculosis* se han centrado principalmente en dos factores de virulencia conocidos e identificados como fosfolipasa D (PLD) y ácidos micólicos. Se considera que el principal factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis* es la fosfolipasa D (Egen *et al.*, 1989; Songer, 1997; Sá *et al.*, 2013), exotoxina PLD que cataliza la disociación de la esfingomielina y el aumento de la permeabilidad vascular. Esto da como resultado la propagación (Hodgson *et al.*, 1994; Corrêa *et al.*, 2018) y supervivencia de *C. pseudotuberculosis* dentro de las células del hospedero (Baird y Fontaine, 2007). Aunque no se ha observado que la exotoxina PLD sea directamente hemolítica, se ha visto que es capaz de producir hemólisis sinérgica (Gyles *et al.*, 2008). Se ha informado que la expresión de PLD puede verse afectada por factores ambientales como la temperatura, el pH y la osmolaridad (Ruiz *et al.*, 2011). Además, la resistencia a diversos cambios ambientales puede estar asociada a la capacidad de supervivencia y persistencia de las bacterias patógenas en el hospedero (Pinto *et al.*, 2014). Algunos factores de virulencia importantes de *C. pseudotuberculosis* incluyen, el operón *FagABCD*, que codifica para una proteína de membrana integral (*FagA*), un transportador de enterobactina de hierro (*FagB*), la proteína de la membrana citoplasmática que se une a ATP (*FagC*) y la proteína de unión (*FagD*), que participan en la absorción de hierro (Sá *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018).

Una característica común de los factores de virulencia de esta bacteria es su alta concentración dentro de las islas de patogenicidad (PAI), una clase de islas genómicas GEIs (por sus siglas en inglés, *Genomic Islands*). Las PAI son grandes regiones genómicas adquiridas a través de la transferencia horizontal de genes, que tienen en común: desviaciones en el contenido de G + C y el uso de codones; la presencia de transposasa y factores de virulencia; secuencias de inserción flanqueantes y/o genes de ARNt; y la ausencia en organismos no patógenos del mismo género o especies relacionadas (Azevedo *et al.*, 2011). Para predecir PAIs en las secuencias del genoma de *C. pseudotuberculosis*, se ha desarrollado un software llamado PIPS (Pathogenicity Island Prediction Software), que predice PAIs teniendo en cuenta la concentración de las características antes mencionadas a lo largo de la secuencia del genoma (Soares *et al.*, 2012).

Se han identificado 16 PAI en *C. pseudotuberculosis*, denominadas PiCp, donde la presencia de un gen de transposasa en la PiCp1, posiblemente permitió la incorporación de esas islas de patogenicidad en el genoma. Estas regiones contienen varios genes implicados en la adhesión, invasión, colonización, propagación dentro del hospedero, supervivencia en el interior de las células infectadas y la evasión del sistema inmune (Ruiz *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2017). Las secuencias de las PiCp presentan un alto nivel de similitud (82-100%) intra-biovar en las cepas *ovis*, así como un menor nivel de similitud (78-91%), con respecto al biovar *equi*, con un patrón de delección conservado en las mismas islas de patogenicidad, independientemente de la cepa. Las cepas de biovar *equi* contienen grandes delecciones y un menor nivel de similitud intra-biovar (77-88%) y también en comparación con las PiCp de biovar *ovis* (62-74%) (Soares *et al.*, 2013).

En el análisis de una cepa de *C. pseudotuberculosis*, se reportó la presencia de 2 grupos de genes *pili*, los cuales podrían contribuir al comportamiento intracelular facultativo de esta especie al codificar proteínas con funciones en los mecanismos de adhesión e internalización. Los grupos de genes *pili* se nombran de acuerdo con su gen principal de pilina de la siguiente manera: los grupos spaA (srtB-spaA-srtA-spaB spaX-spaC) y spaD (srtC spaD-spaY-spaE-spaF), donde srtA y srtB son las sortasas específicas del grupo spaA; spaA, spaB y spaC codifican las proteínas pilina principal, base y punta, respectivamente, del grupo spaA; srtC es la sortasa específica del grupo spaD; spaD, spaE y spaF codifican las proteínas pilina principal, base y punta, respectivamente, del grupo spaD; y spaX y spaY tienen funciones desconocidas.

Además, una sortasa de limpieza (srtD) probablemente sea responsable de anclar los pili a la pared celular (Trost *et al.*, 2010).

La polimerización de las estructuras de pili en *C. pseudotuberculosis* no se ha estudiado en profundidad aún, sin embargo, existen varios estudios sobre especies estrechamente relacionadas, *C. diphtheriae* (Mandlik *et al.*, 2007). Brevemente, en *C. diphtheriae*, la sortasa forma intermediarios con las proteínas precursoras (los productos de la pilina mayor, menor y de la punta, designados como A, B y C, respectivamente) y la sortasa específica cataliza la polimerización y transferencia del pilus. el polímero de pilus al lípido II. Cabe destacar que la polimerización de la estructura completa requiere todos los genes relacionados y también, la polimerización de la pilina menor y la punta depende de la presencia de la pilina principal. En ausencia de una sortasa específica de pilus, la pilina mayor y menor se unen a la pared celular como monómeros y lo mismo es cierto para la pilina menor cuando la sortasa específica de pilus está presente y la pilina mayor está ausente (Mandlik *et al.*, 2008).

La alta prevalencia de *C. pseudotuberculosis* en ovejas y cabras ha hecho que los estudios sobre las formas de detectar sus factores de virulencia sean cada vez más importantes. Los avances en genómica han permitido el descubrimiento de nuevos genes, especialmente los relacionados con la patogenicidad y el estilo de vida del microorganismo. Dentro de los factores de virulencia más estudiados se encuentran los ácidos corynomicólicos, moléculas que forman parte de la estructura de la pared celular (Ruiz *et al.*, 2011). La estructura lipídica formada por los ácidos corynomicólicos actúa como una barrera, con permeabilidad selectiva, mediada por proteínas integrales de membranas llamadas porinas (Schiffler *et al.*, 2007). Se realizó un estudio histopatológico en ovejas infectadas con ácidos corynomicólicos, donde se observó la formación de lesiones como congestión, degeneración y necrosis en los órganos reproductivos (Jesse *et al.*, 2020). Estas moléculas son uno de los factores de virulencia externos más estudiados y constituyen la primera barrera de protección que presenta la bacteria (Burkovski, 2013). Los factores de virulencia promueven la diseminación bacteriana al aumentar la permeabilidad vascular después de la infección, lo que provoca la fuga de plasma de los vasos sanguíneos y los tejidos circundantes, y posteriormente en el drenaje linfático (Carne y Onon, 1978). Además, provoca lesiones dermonecróticas y, en dosis más altas, es letal para varias especies diferentes de animales domésticos y de laboratorio (Egen *et al.*, 1989; Songer, 1997). La patogenia de *C. pseudotuberculosis* está intrínsecamente ligada a su contenido genético.

Previamente se han descrito varios factores de virulencia que influyen fuertemente en la capacidad de la bacteria para interactuar con el hospedero, causando infección (Dorella *et al.*, 2006). Debido a la función de los genes relacionados con la patogenicidad en el genoma de *C. pseudotuberculosis*, la caracterización de estas secuencias genéticas relacionadas con la enfermedad es de vital importancia (Araújo *et al.*, 2020). Por lo cual, es importante recalcar que la caracterización de estos y nuevos factores de virulencia depende de la secuenciación de nuevos genomas del biovar (Baraúna *et al.*, 2017).

2.6. Epidemiología

La LC está presente en la mayoría de las zonas geográficas definidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE); sin embargo, es poco comunicada y la prevalencia en pequeños rumiantes es subestimada debido a la falta de notificación en muchos países (Ivanović *et al.*, 2009). La enfermedad es generalmente multicontinental y se ha informado que tiene una amplia prevalencia en la mayoría de las unidades de producción de ovejas. Sin embargo, solo unos pocos países del mundo han realizado estudios epidemiológicos o investigaciones destinadas a establecer tasas de prevalencia de la enfermedad, los cuales la mayoría fueron investigaciones basadas en granjas y mataderos (Osman *et al.*, 2012). La diseminación de este patógeno en todo el mundo probablemente se produjo a través de la importación de animales infectados (Baird y Fontaine, 2007), la frecuencia de presentación de la enfermedad en cada región o país depende principalmente del tipo de explotación. La infección es más frecuente en países tropicales y subtropicales. Sin embargo, la prevalencia es menor en animales de sistemas de producción extensivos, a diferencia del sistema intensivo donde la infección se manifiesta desde edades tempranas (Fontaine y Baird, 2008).

Se ha identificado a *C. pseudotuberculosis* en grandes criaderos de ovejas y cabras en diferentes países de América, Europa, África, Australia (Dorella *et al.*, 2006) y Asia (Li *et al.*, 2018), es un microorganismo prevalente con distribución mundial (de Sá Guimarães *et al.*, 2011). En un estudio realizado en el Reino Unido, la prevalencia de LC en pequeños rumiantes se encontró en un 45% (Binns *et al.*, 2002). En otro estudio realizado en Canadá, se encontró que la tasa de prevalencia de LC era del 36% (Arsenault *et al.*, 2003). Mientras que la prevalencia promedio de LC se estimó en Australia en un 26% en pequeños rumiantes (Paton *et al.*, 2003). En Venezuela la prevalencia de LC en cabras se registró en 2.50% (Chirino *et al.*, 2006). En Egipto, se registró una prevalencia de LC en cabras y ovejas del 19.23% (Al-Gaabary *et al.*,

2009). En Brasil, la prevalencia de LC en rebaños de cabras se observó en 31.4% (Seyffert *et al.*, 2010). En Argelia, la prevalencia de LC en cabras y ovejas se observó en 1.6 y 8.9% respectivamente (Alloui *et al.*, 2011). En Malasia, se registraron brotes de LC con una frecuencia de un 11.1% (Osman *et al.*, 2012). En Etiopía, la prevalencia de LC se examinó en un 10.68% en cabras (Abebe y Sisay Tessema, 2015). En Italia se observó una prevalencia de LC del 37.9% en cabras (Minozzi *et al.*, 2017). En España, se detectó una prevalencia de LC en pequeños rumiantes causada por *C. pseudotuberculosis* del 26.3% (de la Fuente *et al.*, 2017). La prevalencia de LC causada por *C. pseudotuberculosis* en cabras fue del 39.22% en China (Li *et al.*, 2018). En India, la prevalencia general de LC en cabras se observó en 14.44% (Kumaresan *et al.*, 2018). En México, se reportó una frecuencia de infección por LC en ovinos y caprinos del 33% (Varela *et al.*, 2018). En Tailandia, se encontró que la prevalencia de LC en rebaños de cabras era del 5.06% (Thongkwow *et al.*, 2019), pero en un estudio más reciente, la prevalencia de LC se calculó en rebaños de cabras brasileños en 25.33% (da Costa Barnabé *et al.*, 2020). Sin embargo, en otro estudio realizado durante el mismo año en Etiopía reporto que se encontró una prevalencia de LC en cabras del 18.8% (Yitagesu *et al.*, 2020).

2.7. Importancia económica

Las principales pérdidas económicas atribuidas a la infección por *C. pseudotuberculosis* incluyen desórdenes reproductivos, decomiso de carcasas y vísceras (Belchior *et al.* 2009), la disminución de la producción de lana (Paton *et al.*, 1994), carne (Collett *et al.*, 1994) y leche (Schreuder *et al.*, 1990), la disminución del aumento de peso, la reducción del valor de las pieles debido a las cicatrices y el costo de los medicamentos y mano de obra necesarios para tratar la enfermedad (de Sá Guimarães *et al.*, 2011). En ocasiones puede provocar la muerte del animal sin que haya una causa aparente, lo que se traduce en pérdidas para el productor (Carrillo *et al.*, 2005). Es de suma importancia velar de forma continua por la salud del ganado, para determinar las diferentes patologías que afectan al rebaño para implementar las medidas de prevención y control de las enfermedades y padecimientos que afectan a los pequeños rumiantes, las cuales ocasionan graves daños a la economía de la producción (Cheuquepan *et al.*, 2008).

En Australia se realizó un análisis de tres granjas de la región Occidental, para un total de 600 animales evaluados, lo que permitió establecer que la infección por *C. pseudotuberculosis* produjo la disminución en la producción de lana grasa en 3.8-4.8% y de lana limpia en 4.1-

6.6% (Paton *et al.*, 1994). En áreas endémicas como Australia, la LC ha llevado a una pérdida estimada de \$12 a 13 millones de dólares australianos (AUD) por año para la producción de carne (Paton *et al.*, 2003). En la producción ovina australiana se considera una pérdida aproximada de \$17 millones de AUD por año en la producción de lana (Paton *et al.*, 1994). Otros estudios indican que las pérdidas en general serían de alrededor de \$30 a 40 millones de dólares, contemplando el rechazo de carne y canales (Windsor, 2011). En los Estados Unidos los estudios realizados indicaron que la infección por LC tuvo un efecto económicamente significativo en las tasas de sacrificio y la eficiencia reproductiva en las ovejas (Renshaw *et al.*, 1979). En Canadá se identificó que entre un 3 a 5% de la carne y 0.02 a 0.03% de los animales, son rechazados durante procesos de inspección de las plantas productoras (Williamson, 2001). En Medio Oriente, las pérdidas económicas ocurren debido al decomiso de canales de cordero con lesiones de LC, más comúnmente en los nódulos linfáticos submandibulares. En Egipto, se estima que las infecciones por LC causan graves pérdidas y le cuestan a la industria de producción de carne aproximadamente 1,76 millones de dólares anuales (Osman *et al.*, 2018). Estos hechos tienen un impacto negativo en las exportaciones, disminuyendo las posibilidades de comercialización (Aleman y Spier, 2001).

2.8. Diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en animales

2.8.1. Aislamiento bacteriológico

Para el aislamiento del microorganismo se realiza la siembra de las muestras a evaluar en medios de cultivos como gelosa sangre para la obtención de colonias aisladas y puras. El crecimiento de la bacteria en agar sangre de 24-48 horas permite la formación de colonias pequeñas blancas, secas y rodeadas de una β hemólisis tenue. La observación de la bacteria mediante la técnica de tinción de Gram y Ziehl Neelsen se realiza para el diagnóstico diferencial entre bacilos ácido alcohol resistentes (Chirino *et al.*, 2006). En la tinción de Gram se pueden reconocer formas coco-bacilares de color violeta, para una clasificación de la bacteria como Gram positiva (Literák *et al.*, 1999; Chirino *et al.*, 2006). Posteriormente se realiza la identificación de *C. pseudotuberculosis* mediante pruebas bioquímicas convencionales (Dorella *et al.*, 2006; D´Afonseca *et al.*, 2008).

2.8.2. Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Las pruebas inmunoenzimáticas de tipo ELISA (por sus siglas en inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que utilizan como antígeno cultivos bacterianos, toxinas y proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis*, como la PLD (Dercksen *et al.*, 2000; Binns *et al.*, 2007), son eficaces en los programas de control y erradicación de la Linfadenitis caseosa. El ELISA indirecto basado en proteínas secretadas ha mostrado una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 93.5% y 100% respectivamente, en el diagnóstico de la enfermedad en pequeños rumiantes (Carminati *et al.*, 2003). Los anticuerpos frente a la toxina comienzan a detectarse a partir de la cuarta semana post-infección alcanzando un pico máximo en la decimoséptima semana y perdurando por lo menos veintisiete semanas (Belchior *et al.*, 2006). Un marcador de inmunidad mediada por células para la determinación de IFN- γ por ELISA ha sido utilizado para el diagnóstico de infección por *C. pseudotuberculosis*, mostrando una sensibilidad del 91% y una especificidad del 98%, demostrando su potencial para su uso en programas de erradicación de la Linfadenitis caseosa. La prueba para detectar IFN- γ por ELISA es más sensible para identificar infecciones tempranas en cabras en comparación con el ELISA de anticuerpos normal, y no parece estar influenciado por la vacunación (Menzies *et al.*, 2004). 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). 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). El diagnóstico de la LC mediante ELISA se ha establecido en ensayos experimentales mediante el uso de proteínas obtenidas por vía recombinante. El desarrollo de un ELISA indirecto empleando una combinación de PLDr y CP40r como antígenos en una proporción 1:1, presentó un 96.9% de sensibilidad y 98.4% de especificidad para muestras procedentes de cabras. Mientras que para ovejas los mejores resultados se obtuvieron con el ELISA en base a PLD recombinante con una sensibilidad de 91% y 98.7% de especificidad (Barral *et al.*, 2019). El método de ELISA para el diagnóstico se ha mostrado particularmente prometedor (Çetinkaya *et al.*, 2002).

2.8.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las técnicas moleculares se han utilizado para el diagnóstico de Linfadenitis caseosa. La PCR (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*), utilizada para identificar *C. pseudotuberculosis*, es una alternativa en comparación con los métodos de diagnóstico convencionales, con la ventaja de ser más rápida y específica (Çetinkaya *et al.*, 2002). La PCR multiplex basada en la amplificación de los genes ARNr *16S*, *rpoB* y *pld*, tiene una sensibilidad diagnóstica del 94.6% para aislamientos de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.*, 2007). El ADNr *16S* como secuencia codificante del ARN ribosomal *16S*, se ha utilizado en ensayos previos tanto para el diagnóstico como para el análisis filogenético del género *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2005). El gen ARNr *16S* es el componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariotas, y permite la unión de la secuencia líder de los ARNm (Secuencia de Shine-Dalgarno) para el inicio de la traducción de los genes. La secuencia de este gen se encuentra altamente conservada y presenta bajas tasas de evolución, se utiliza para la reconstrucción de filogenia. El uso de este gen ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Çetinkaya *et al.*, 2002). Este gen permite diferenciar *C. diphtheriae* de *C. pseudotuberculosis* presentando una similitud en un 97.8%, lo que indica que estas especies tienen una estrecha relación, pero son diferentes (Pascual *et al.*, 1995). El gen *rpoB* corresponde a la subunidad β de la ARN polimerasa, y su secuencia codificante se ha utilizado para estudios filogenéticos de algunos géneros bacterianos (Dorella *et al.*, 2006; D'Afonseca *et al.*, 2008). A través de su secuencia también se han identificado especies del género *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2004; Khamis *et al.*, 2005). El gen *rpoB* codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa (Khamis *et al.*, 2004) y la amplificación de un fragmento de 434 a 452 pb permite la identificación a nivel de especie ya que presenta un elevado polimorfismo. El mayor grado de semejanza de esta secuencia parcial entre dos especies ha sido de 95.9% frente a un 99.7% de la secuencia completa de ARNr *16S* (Khamis *et al.*, 2005). El gen *pld* es un blanco de amplificación en ensayos de PCR para discriminar entre aislados de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, especies genotípicamente muy relacionadas (Pacheco *et al.*, 2007). Además, la PCR basada en genes *pld* es más fiable que las basadas en genes *rpoB* para el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* (Nabih *et al.*, 2018). Los genes ARNr *16S*, *rpoB* y *pld*, son los más importantes para el diagnóstico de la especie *C. pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.*, 2007). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Multiplex ha explorado como un método rápido, sensible y fiable para el diagnóstico de patógenos (Cantekin *et al.*, 2015; Charaya *et al.*, 2015; Ashraf *et al.*, 2017).

Actualmente, existe el método de PCR Cuádruplex para la diferenciación de biovares (*ovis* y *equi*) de *C. pseudotuberculosis* a partir de la amplificación de segmentos de los genes ARNr *16S*, *rpoB*, *pld* y un segmento del gen *narG* (nitrato reductasa) el cual permite la identificación y diagnóstico de cepas del biovar *equi* de *C. pseudotuberculosis* (Almeida *et al.*, 2017a). Una característica muy importante que diferencia a los biovares de *C. pseudotuberculosis* es la presencia del operón de reducción de nitrato en las cepas del biovar *equi*, además de que estas cepas tienen 15 genes que están ausentes en las cepas del biovar *ovis*, como el operón *narKGHJI* y un grupo de genes que codifican las molibdopterinas *moeB*, *moaE*, *molB*, *molA*, *moeY*, *moaC*, *moeA* y *moaA* y dos proteínas hipotéticas (Almeida *et al.*, 2017b). La PCR Cuádruplex es confiable en la identificación de biovares de *C. pseudotuberculosis* en laboratorios microbiológicos (El-Sebay *et al.*, 2021; de Sá Guimarães *et al.*, 2011).

2.9. Análisis de identidad de secuencia y filogenético

La secuenciación de ADN permite determinar el orden de los nucleótidos (A, G, C, T) de una molécula de ADN, esto es importante, ya que este orden es el que determina la información genética para el funcionamiento de los organismos (Ongay y Códiz, 2021). Sanger y colaboradores propusieron el método de secuenciación enzimática, la primera versión se publicó en 1975 (Sanger y Coulson, 1975), ésta fue mejorada y sustituida por el método conocido como de terminación de la cadena, que se convirtió en el método más utilizado para la secuenciación de ADN y se sigue utilizando en la actualidad. El método se basa en la síntesis enzimática de ADN con una ADN polimerasa y en presencia de nucleótidos modificados (Sanger *et al.*, 1977), dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) que carecen del hidroxilo en el carbono 3' del azúcar, que es esencial para que se pueda llevar a cabo el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos durante la síntesis de la cadena de ADN (Integrated DNA Technologies, 1911). El gen *rpoB* codifica para la subunidad I de la ARN polimerasa (las mutaciones en este gen condicionan la aparición de resistencia de diferentes microorganismos a rifampicina) (Khamis *et al.*, 2004; Khamis *et al.*, 2005). La secuencia completa de este gen es de aproximadamente 3500pb. El punto de corte del grado de semejanza para definir especies y subespecies del género *Corynebacterium* ha sido establecido en 98% respectivamente. Pero la

secuenciación de un fragmento de 434 a 452 pb permite identificar acertadamente especies del género *Corynebacterium*. El mayor grado de semejanza de esta secuencia parcial entre dos especies ha sido de 95.9% frente a un 99.7% de la secuencia completa de ADNr *16S* (1, 500pb) (programa SVARAP) (Renaud *et al.*, 2007), secuencia codificante del ARNr *16S* que se ha utilizado en ensayos tanto para el diagnóstico como para el análisis filogenético de especies del género *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2005), sin embargo, la secuencia de este gen se encuentra altamente conservada (Çetinkaya *et al.*, 2002), al igual que la secuencia del gen *pld* (Soares *et al.*, 2013), el cual también se utiliza para discriminar entre especies del género *Corynebacterium* (Pacheco *et al.*, 2007). En un estudio realizado mediante el método de PCR se logró identificar genes involucrados en la virulencia, en donde los 57 aislamientos amplificaron los genes *FagA*, *C* y *D*; con respecto al gen *FagB*, estuvo presente únicamente en 56 de los aislamientos a excepción del aislado 3540. Por último, el gen *hsp60* se presentó en los 57 aislamientos analizados (Varela *et al.*, 2018).

La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio. Es decir, el objetivo final es un árbol filogenético que sea reflejo del proceso de evolución donde las entidades biológicas son el resultado de “descendencia con modificación” (Huson *et al.*, 2010) entre especies ancestrales y descendientes. Una manera de cumplir este objetivo es mediante la búsqueda de indicios de descendencia con modificación en las especies, ya sea caracteres morfológicos o moleculares (Peña, 2011). El método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) es una herramienta para aumentar el conocimiento (heurística) ampliamente utilizada para la reconstrucción filogenética a partir de una matriz de distancia, se ha aplicado a muchos conjuntos de datos biológicos (Cuadros *et al.*, 2007). Neighbor-Joining se reconoce por la construcción rápida de filogenias que están cerca del óptimo cuando el número de taxones no es demasiado grande (Telles *et al.*, 2018). En Chile, se realizó un análisis filogenético de secuencias locales del gen *rpoB* de *C. pseudotuberculosis* mediante el método de Neighbor-Joining con un valor Bootstrap de 1000 repeticiones en donde se incluyó a *C. ulcerans*, especie estrechamente relacionada del género *Corynebacterium*, en donde se obtuvieron resultados de variabilidad genética entre los aislados de *C. pseudotuberculosis* obtenidos a partir de ovinos, caprinos y equinos, además de la diferenciación entre especies (Retamal *et al.*, 2011), mientras que en México otro análisis filogenético de secuencias locales de *C. pseudotuberculosis* realizado también mediante el

método de Neighbor-Joining con un valor Bootstrap de 1000 repeticiones agrupo 57 aislamientos junto con cepas biovar *ovis* reportadas en la base de datos GenBank, además de una cepa de la especie *C. ulcerans* y otra de la especie *C. diphtheriae*, donde se obtuvieron identidades de 98, 99 y 100%, además de que se identificaron las especies y subespecies a las que pertenecen todos los aislamientos utilizados en el estudio (Varela *et al.*, 2018).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Linfadenitis caseosa es considerada una de las enfermedades infecciosas más importantes que afecta la producción ovina y caprina. Existen evidencias de su prevalencia a nivel mundial y en México. El principal problema consiste en que muchos productores no cuentan con las instalaciones adecuadas, pues en la mayoría de los casos son adaptaciones de otros sistemas productivos y diversas especies animales en convivencia diaria. En este sentido uno de los principales factores adversos es la presencia de objetos punzocortantes en las instalaciones y equipos, que pueden provocar laceraciones en los animales y de esta forma favorecer la entrada del patógeno al animal. Esta enfermedad tiene implicaciones zoonóticas en el personal dedicado a la cría y explotación ovina y caprina. Además, el tratamiento de la Linfadenitis caseosa es difícil, debido a que es provocada por una bacteria intracelular facultativa que se caracteriza por producir la enfermedad de manera crónica y latente. Aunque existe una amplia gama de antibióticos que podrían ser empleados, debido a la encapsulación del microorganismo en los abscesos la acción de estos no es eficaz para eliminar la infección. También la resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo. Actualmente, son pocos los casos que se han reportado en animales jóvenes, sin embargo, se piensa que son más susceptibles debido a una inmunidad poco desarrollada y a la convivencia con animales adultos en ambientes contaminados corriendo el riesgo de contraer la enfermedad. Por tales motivos actualmente se trabaja en función de la caracterización molecular de las cepas que circulan en las unidades de producción para el estudio de factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos y nuevas formulaciones vacunales para la prevención, control y la erradicación de la enfermedad.

IV. JUSTIFICACIÓN

La ovinocultura mexicana se ha fortalecido de manera considerable, incrementando el número de unidades de animales a más de 8 millones, con distribución en diferentes estados del territorio nacional. Sin embargo, la producción no logra cubrir la demanda nacional, por ello se importa carne de otros países como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Chile. *C. pseudotuberculosis* es un microorganismo patógeno que afecta a ovinos y caprinos entre otras especies animales, es responsable de la Linfadenitis caseosa (LC) y adicionalmente representa una zoonosis importante. Se ha reportado su prevalencia en diferentes países del mundo como Reino Unido, Israel, Chile, Estados Unidos, Sudáfrica, Turquía, Australia, Venezuela, Canadá, Brasil, España, Hungría y Argentina, siendo la Linfadenitis caseosa una de las enfermedades que más afecta a las unidades de producción ovina y caprina. En la actualidad, existen evidencias de su prevalencia en México en los estados de Durango, Zacatecas, México y Jalisco. La propagación de *C. pseudotuberculosis* a otros países resalta la importancia de mejorar la comprensión de esta bacteria, debido a esto, la identificación del tipo de biovar de *C. pseudotuberculosis* es de suma importancia para la prevención de la infección en la población animal y para establecer el comportamiento de la epidemiología de la enfermedad, así como la realización de estudios filogenéticos y la detección de pequeños cambios genéticos como SNPs (por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) e INDELS (por sus siglas en inglés, *Insertion/Deletion Polymorphism*) ya que las bacterias tienen una densidad genética muy alta y, por lo tanto, las mutaciones puntuales pueden afectar fuertemente la respuesta biológica del patógeno. La caracterización genómica de las cepas es de importancia para lograr un mejor conocimiento de los mecanismos de virulencia, patogénesis, desarrollo de nuevos medios diagnósticos, vacunas y tratamientos ante este microorganismo.

V. HIPÓTESIS

La caracterización molecular permitirá obtener información genética de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* de ovejas y cabras del estado de Jalisco.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Caracterizar mediante técnicas moleculares aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* de ovejas y cabras del estado de Jalisco.

6.2. Objetivos específicos

- 1) Identificar mediante la técnica de PCR Cuádruplex aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* de ovejas y cabras del estado de Jalisco.
- 2) Secuenciar los genes ARNr *16S*, *rpoB* y *pld* de los aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* de ovejas.
- 3) Realizar mediante herramientas bioinformáticas el análisis de identidad de secuencia y estudio filogenético de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Obtención de las muestras

Se obtuvieron 59 muestras mediante un muestro por conveniencia de abscesos de casos clínicos de ovinos y caprinos de unidades de producción del estado de Jalisco de los municipios de Arandas (2 muestras) y Tepatitlán de Morelos (4 muestras) de la región Altos Sur; los municipios El Salto (12 muestras), Zapotlanejo (12 muestras), Villa Corona (5 muestras) y Zapopan (15 muestras) de la región Centro; el municipio San Juan de los Lagos (6 muestras) de la región Altos Norte; y el municipio El Grullo (3 muestras) de la región Sierra de Amula. Las muestras fueron obtenidas de 18 animales jóvenes (3 a 6 meses) y 41 animales adultos (> 1 año) con manifestaciones clínicas asociadas a la Linfadenitis caseosa identificadas mediante la inspección visual y palpación de los nódulos linfáticos. Las muestras de abscesos se obtuvieron mediante una punción utilizando jeringas y agujas estériles para obtener un volumen aproximado de 5mL de exudado; previa limpieza y desinfección del área de punción con solución de yodo al 0.1%. Las jeringas con el contenido purulento se depositaron en bolsas plásticas con la identificación del animal y se conservaron en refrigeración a 4 °C para su transporte al laboratorio de bacteriología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

7.2. Límite de espacio y tiempo

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México. El CIESA se localiza en el kilómetro 12.5 de la carretera Panamericana en su tramo Toluca–Atlacomulco. La investigación se efectuó en un periodo de tiempo comprendido desde el 02 de febrero del 2021 al 21 de diciembre del 2022.

7.3. Aislamiento bacteriológico

Las muestras se cultivaron en agar gelosa sangre suplementado con 5% de sangre de ovino y se incubaron a 37°C durante 24-48 horas en condiciones de anaerobiosis, posteriormente se seleccionaron colonias de bacterias opacas convexas, de color blanco grisáceo, con tamaño de 1mm a las 24 horas (Bastos *et al.*, 2012) y se enriquecieron en medio líquido Infusión Cerebro-

Corazón (BHI).

7.4. Prueba bioquímica en cepa de campo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi*

La cepa de campo MEX30 (CP017291.1) se identificó bioquímicamente mediante la prueba individual de medio caldo nitrato para la identificación por su capacidad para reducir los nitratos a nitrito en donde se adiciono Griess A y Griess B para la obtención del resultado (Muñoz *et al.*, 2016).

7.5. Extracción de ADN a partir de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

La extracción del ADN total de los aislados de *C. pseudotuberculosis* se realizó mediante el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante con modificaciones: se seleccionó una colonia pura y se inoculo en 5mL de medio liquido BHI y se incubo a 37 °C durante 48 horas. Posteriormente el cultivo bacteriano se centrifugo a 13,000g x 5 min, se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet de bacterias al cual se le añadió 275µL de la solución de digestión (200µL de Nuclei lysis solution, 50µL de 0.5 Molar EDTA, 20µL de Proteinasa K, 5µL de RNAsa A), se mezcló vigorosamente por vortex y se incubo durante 1 hora a 37 °C. Luego se añadió 150µL de buffer de lisis, se mezcló por vortex y se transfirió la muestra completa a una columna con tubo colector, se centrifugo a 13,000g x 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Luego se añadió 650µL de solución de lavado y se centrifugo a 13,000g x 1 min, este paso se repitió 4 veces. Adicionalmente, se centrifugo a 13,000g x 2 min para secar la columna y se pasó a un tubo estéril de 1.5mL. La elusión final se realizó con 50µL de agua libre de nucleasas y se conservó la muestra de ADN a -20 °C.

7.6. Determinación de la calidad y cuantificación del ADN

Las muestras de ADN se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% mediante la tinción con bromuro de etidio en un trasiluminador (Mini Bis Pro, DNR Bio-Imaging System, USA). Para cuantificar el ADN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop de Luz UV (UV-Vis Spectrophotometer Q500) con el software Nucleic Acid. Los resultados registrados fueron la concentración de ADN en ng/µL y para estimar la pureza del ADN se consideró la absorbancia a 260/280 nm con una proporción de 1.8 para ser aceptada como ADN puro (Alejos *et al.*, 2014).

7.7. Estandarización del ensayo de PCR Cuádruplex

El método de PCR Cuádruplex se estandarizó de acuerdo con el protocolo establecido por Almeida *et al.*, (2017a), empleando como control positivo para el biovar *ovis* la cepa ATCC 43926 y para el biovar *equi* la cepa ATCC 43924 y una cepa de campo positiva a biovar *equi* MEX30 (CP017291.1 proporcionada por el Departamento de Microbiología de la FMVZ-UNAM). El PCR Cuádruplex amplifica un segmento de los genes específicos: ARNr *16S*, *rpoB*, *pld* y *narG* (Tabla 1). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25µL conteniendo 12.5µL 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 1µL de cada cebador (100pmol/µL) y 3µL de ADN (20ng/µL), el volumen fue completado con agua libre de nucleasas. El programa de la reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne TC 512 Prime, USA) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95°C por 4 min, 30 ciclos de 95°C por 30s, 58°C por 30s y 72°C por 1.5 min; y una extensión final de 68°C por 7 min. Como control negativo se incluyó una reacción con todos los componentes excepto el ADN. Los genes amplificados se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) teñidos con bromuro de etidio y visualizados en radiación ultravioleta (UV) con un transiluminador (Mini Bis Pro, DNR Bio-Imagen System, USA).

Tabla 1. Oligonucleótidos para la identificación por PCR Cuádruplex de los aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Gen	Cebadores	Secuencias	Pb	Producto	Referencia
ARNr <i>16S</i>	<i>16S-F</i>	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	20	816pb	Cetinkaya <i>et al.</i> , 2002
	<i>16S-R</i>	TCTCTACGCCGATCTTGTAT	20		
<i>rpoB</i>	<i>rpoB-F</i>	CGTATGAACATCGGCCAGGT	20	446pb	Khamis <i>et al.</i> , 2004
	<i>rpoB-R</i>	TCCATTTCCCGAAGCGCTG	20		
<i>pld</i>	<i>pld-F</i>	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	20	203pb	Pacheco <i>et al.</i> , 2007
	<i>pld-R</i>	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCA GG	23		
<i>narG</i>	<i>narG-F</i>	ACCCGTA CTTGCACTCTTTC	20	612pb	Almeida <i>et al.</i> , 2017a
	<i>narG-R</i>	AGTCAGTACTTCCGCAGGTC	20		

7.8. Diagnóstico molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante PCR Cuádruplex

El diagnóstico molecular para la identificación de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* en las 59 muestras de campo se realizó mediante la técnica de PCR Cuádruplex siguiendo las condiciones establecidas anteriormente.

7.9. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en geles de 0.8 y 1.5% de agarosa fueron utilizados respectivamente en la detección y visualización de los fragmentos amplificados de ADN (ARNr *16S*, *pld*, *rpoB* y *narG*). Los geles se sometieron durante 50 min a 90V en una fuente de poder (AAHoefer, USA) para la separación de las moléculas de ADN. Los geles teñidos con bromuro de etidio permitieron la visualización del ADN utilizando luz UV en un trasiluminador (Mini Bis Pro, DNR Bio-Imagen System, USA). Se emplearon marcadores de peso molecular de 100pb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen, USA) y de 1Kb O'GeneRuler (Fermentas, USA).

7.10. Secuenciación de los genes ARNr *16S*, *rpoB* y *pld*

Las muestras fueron enviadas para secuenciación a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para la secuenciación por el método de Sanger. La secuenciación se solicitó con los iniciadores previamente mencionados, ARNr *16S*, *rpoB* y *pld*, diseñados a partir de las secuencias reportadas en la base de datos GenBank (NCBI) (números de acceso: X81916, AY492239 y L16587) para *C. pseudotuberculosis*.

7.11. Análisis de identidad de secuencias locales

Las secuencias de nucleótidos de los genes ARNr *16S*, *rpoB* y *pld* amplificados en los aislados mediante PCR Cuádruplex se alinearon con ayuda del programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA11) y posteriormente se analizaron con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para estimar el porcentaje de homología de los nucleótidos en comparación con las secuencias disponibles en el GenBank de la base de datos del National Library of Medicine (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

7.12. Análisis filogenético de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A

El análisis filogenético fue realizado mediante la construcción de un alineamiento múltiple y un análisis por el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) para el gen *rpoB* (Khamis *et al.*, 2004) utilizando el programa MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021), (tabla 2).

Tabla 2. Aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y especies estrechamente relacionadas del GenBank para análisis filogenético.

Cepa	Biovar	Hospedero	País	Acceso
29156	<i>Ovis</i>	Bovino	Israel	CP010795.2
NCTC4681	<i>Ovis</i>	Oveja	Australia	LR590479.1
MEX1	<i>Ovis</i>	Cabra	México	CP017711.1
MEX2	<i>Ovis</i>	Cabra	México	CP046644.1
MEX9	<i>Ovis</i>	Cabra	México	CP014543.1
MEX25	<i>Ovis</i>	Oveja	México	CP013697.1
MEX29	<i>Ovis</i>	Oveja	México	CP016826.1
1002	<i>Ovis</i>	Cabra	Brasil	CP001809.3
T1	<i>Ovis</i>	Cabra	Brasil	CP015100.2
FRC41	<i>Ovis</i>	Humano	Brasil	CP002097.2
OVIZ01	<i>Ovis</i>	Oveja	Brasil	CP035678.1
SigmaE	<i>Ovis</i>	Cabra	Brasil	CP020356.1
MIC6	<i>Ovis</i>	Oveja	Brasil	CP019769.1
C231	<i>Ovis</i>	Oveja	Australia	CP001829.2
I19	<i>Ovis</i>	Bovino	Israel	CP002251.3
MEX30	<i>Equi</i>	Caballo	México	CP017291.1
MEX31	<i>Equi</i>	Caballo	México	CP017292.1
DSM 7177-ATCC 43924	<i>Equi</i>	Caballo	Alemania	GU818740.1
31	<i>Equi</i>	Búfalo	Egipto	CP003421.4
258	<i>Equi</i>	Equino	Bélgica	CP003540.3
Cp162	<i>Equi</i>	Camello	Reino Unido	CP003652.3
316	<i>Equi</i>	Caballo	Estados Unidos	CP003077.2
ATCC 27012	<i>C. diphtheriae</i>	Humano	Estados Unidos	HM855230.1
BR-AD22	<i>C. ulcerans</i>	Perro	Brasil	FJ545133.1

VIII. RESULTADOS

8.1. Aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

El cultivo en agar gelosa sangre permitió identificar en 30 de las muestras aislamientos con formación de colonias blanco-grisáceas, secas y rodeadas de una zona de β -hemólisis, características indicativas de *C. pseudotuberculosis*. Para estos aislados la tinción de Gram resulto positiva y se observó una morfología cocobacilar. En el medio de cultivo BHI se observó un crecimiento seco y escamoso, características que distinguen a este microorganismo patógeno (figura 1).

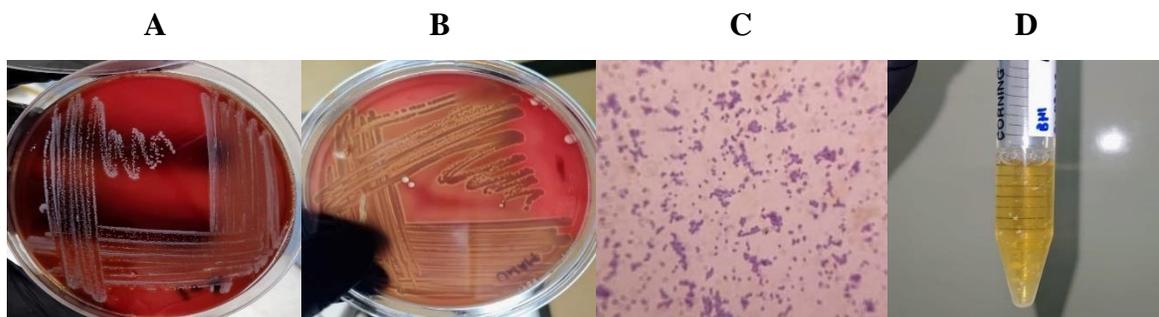


Figura 1. Aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **A)** Medio agar sangre. **B)** β -hemólisis por colonias bacterianas **C)** Tinción de Gram **D)** Enriquecimiento de cepas en medio líquido BHI.

8.2. Identificación bioquímica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi*

La prueba bioquímica de reducción de nitratos dio resultado positivo lo que confirmo que la cepa de campo MEX30 (CP017291.1) utilizada como control positivo es *C. pseudotuberculosis* biovar *equi* (figura 2).

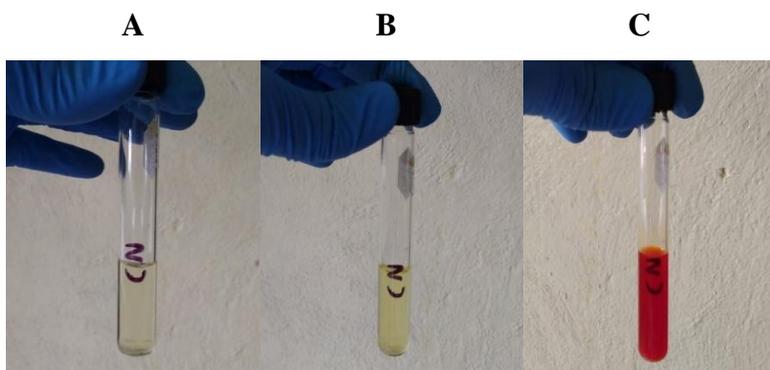


Figura 2. Prueba bioquímica de reducción de nitratos. **A)** Caldo nitrado **B)** Adición de Griess A **C)** Adición de Griess B y resultado positivo a biovar *equi*.

8.3. Estandarización del ensayo de PCR Cuádruplex

Se estandarizó la técnica de PCR Cuádruplex para la amplificación de los fragmentos de los genes ARNr *16S* (816pb), *narG* (612pb), *rpoB* (446pb) y *pld* (203pb), los cuales fueron visibles mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) los cuales presentaron un patrón electroforético según el tamaño esperado para cada uno de los controles. Los iniciadores no mostraron amplificaciones inespecíficas con los controles seleccionados para el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* (figura 3).

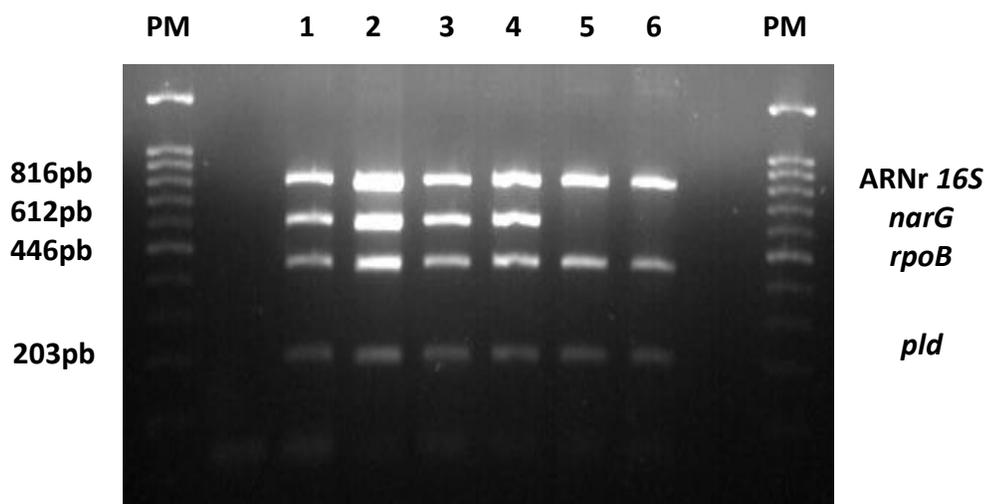


Figura 3. Estandarización de PCR Cuádruplex. PM: Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega, USA). Líneas 1 y 2: Control positivo del biovar *equi* (ATCC 43924); Líneas 3 y 4: Control positivo del biovar *equi* (MEX30) aislado de campo; Líneas 5 y 6: Control positivo del biovar *ovis* (ATCC 43926). PM: Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega, USA).

8.4. Diagnóstico molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante PCR Cuádruplex

De un total de 59 muestras 30 fueron positivas para *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* lo que representa un 50.84%. Los aislamientos presentaron únicamente la amplificación de los genes ARNr *16S* (816pb), *rpoB* (446pb) y *pld* (203pb), con un total de 8 (26.66%) animales jóvenes y 22 (73.33%) animales adultos positivos a *C. pseudotuberculosis*. Se identificó a *C. pseudotuberculosis* en 2 casos del municipio de El Salto (2/12), 10 del municipio de Zapotlanejo (10/12), 8 del municipio de Zapopan (8/15), 3 del municipio de San Juan de los Lagos (3/6), 2 del municipio de El Grullo (2/3), 4 del municipio de Tepatlán de Morelos (4/4) y 1 del municipio de Arandas (1/2), para un 87.5% de los municipios analizados. No se presentaron amplificaciones del gen *narG* (612pb) (nitrato reductasa) para la identificación del biovar *equi*, lo que indica que todos los aislamientos obtenidos corresponden a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* (figura 4).

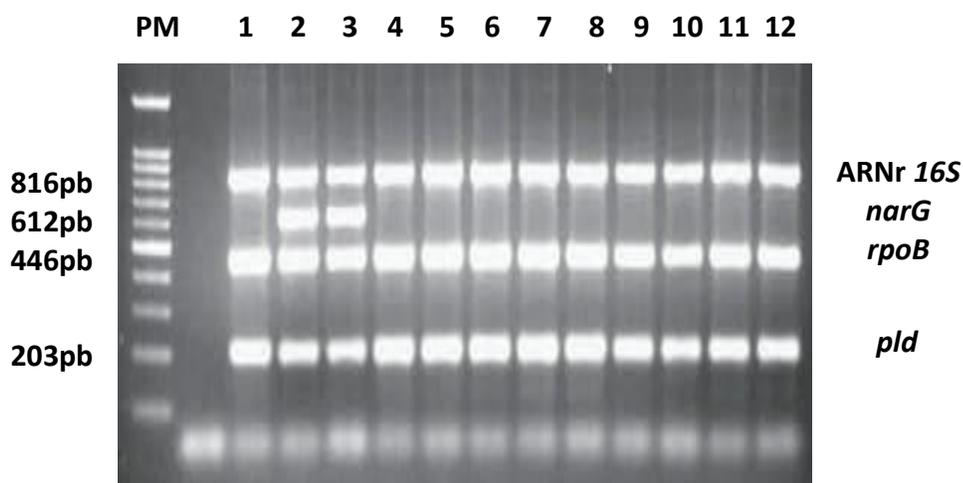


Figura 4. PCR Cuádruplex para la identificación del biovar de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. PM: Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega, USA). Línea 1: Control positivo del biovar *ovis* (ATCC 43926); Línea 2: Control positivo del biovar *equi* (ATCC 43924); Línea 3: Control positivo del biovar *equi* (MEX30); Líneas 4-12: Aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

8.5. Análisis de las secuencias de los genes *rpoB*, ARNr *16S* y *pld* de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*

El análisis de las secuencias de los genes con el empleo del programa BLAST permitió establecer que el gen *rpoB* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A, presenta una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 99.73% en comparación con las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* de origen mexicano MEX1 (CP017711.1), MEX2 (CP046644.1) y MEX9 (CP014543.1) con un cambio en la posición 137 (A/G) con una Adenina en vez de una Guanina en los aislados 36A y 6J, un cambio en la posición 186 (T/C) con una Timina en vez de una Citocina en el aislado 38-55-J, y un cambio en la posición 201 (T/C) con una Timina en vez de una Citocina en el aislado 61A. Con respecto a las cepas mexicanas MEX25 (CP013697.1) y MEX29 (CP016826.1) el porcentaje de identidad de secuencia fue de un 100%. El gen ARNr *16S* y *pld* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A, presentan una identidad de secuencia de un 100% con respecto a las cepas MEX1, MEX2, MEX9, MEX25 y MEX29 (figura 5 y tabla 3).

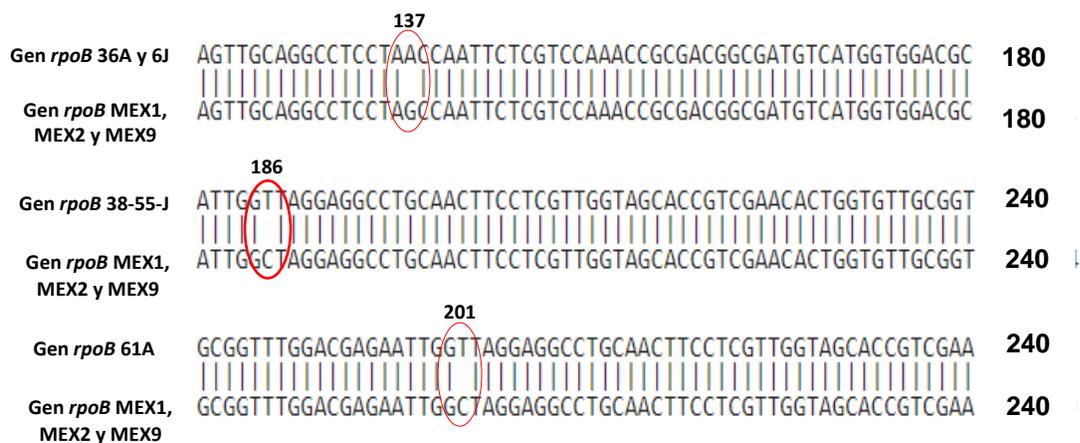


Figura 5. Alineamiento de las secuencias del gen *rpoB* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en comparación con las secuencias de las cepas mexicanas MEX1, MEX2 y MEX9 biovar *ovis* reportadas en la base de datos GenBank. Las líneas indican nucleótidos idénticos y los círculos rojos representan cambios en la secuencia. El gen *rpoB* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A presenta cambios en los nucleótidos con respecto a las secuencias de MEX1, MEX2 y MEX9.

Tabla 3. Porcentajes de similitud de la secuencia del gen *rpoB* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A en comparación con secuencias de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* reportadas en la base de datos GenBank.

Descripción, gen <i>rpoB</i> 36A, 6J, 38-55-J y 61A	Máximo puntaje	Puntaje total	Cubierta	% Identificación	Acceso
29156	689	689	100%	100.00%	CP010795.2
C231	689	689	100%	100.00%	CP001829.2
I19	689	689	100%	100.00%	CP002251.3
NCTC4681	689	689	100%	100.00%	LR590479.1
MEX29	689	689	100%	100.00%	CP016826.1
MEX25	689	689	100%	100.00%	CP013697.1
1002	684	684	100%	99.73%	CP001809.3
T1	684	684	100%	99.73%	CP015100.2
MEX2	684	684	100%	99.73%	CP046644.1
FRC41	684	684	100%	99.73%	CP002097.2
OVIZ01	684	684	100%	99.73%	CP035678.1
SigmaE	684	684	100%	99.73%	CP020356.1
MIC6	684	684	100%	99.73%	CP019769.1
MEX1	684	684	100%	99.73%	CP017711.1
MEX9	684	684	100%	99.73%	CP014543.1

8.6. Análisis de las secuencias del gen *rpoB* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* en comparación con el aislado MEX30 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi*

El análisis de las secuencias de los genes con el empleo del programa BLAST permitió establecer que el gen *rpoB* de los aislados 36A y 6J, presenta una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 98.75% en comparación con la cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* de origen mexicano MEX30 (CP017291.1), con diferentes cambios a lo largo de la secuencia, un cambio en la posición 14 (A/G) con una Adenina en vez de una Guanina, un cambio en la posición 28 (C/T) con una Citocina en vez de una Timina, un cambio en la posición 138 (A/G) con una Adenina en vez de una Guanina, y un cambio en la posición 179 (C/T) con una Citocina en vez de una Timina (figura 6).



Figura 6. Alineamiento de las secuencias del gen *rpoB* de los aislados 36A y 6J de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX30 reportada en la base de datos GenBank. Las líneas indican nucleótidos idénticos y los círculos rojos representan cambios en la secuencia. El gen *rpoB* de los aislados 36A y 6J presenta cambios en los nucleótidos con respecto a la secuencia de MEX30 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi*.

El BLAST también permitió establecer que el gen *rpoB* de los aislados 38-55-J y 61A, presenta una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 98.92% en comparación con la cepa biovar *equi* MEX30 (CP017291.1), con un cambio en la posición 146 (G/A) con una Guanina en vez de una Adenina, un cambio en la posición 187 (T/G) con una Timina en vez de una Guanina, un cambio en la posición 297 (G/A) con una Guanina en vez de una Adenina, y un cambio en la posición 311 (T/C) con una Timina en vez una Citocina (figura 7).



Figura 7. Alineamiento de las secuencias del gen *rpoB* de los aislados 38-55-J y 61A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX30 reportada en la base de datos GenBank. Las líneas indican nucleótidos idénticos y los círculos rojos representan cambios en la secuencia. El gen *rpoB* de los aislados 36A y 6J presenta cambios en los nucleótidos con respecto a la secuencia de MEX30 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi*.

8.7. Análisis de las secuencias del gen *rpoB* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* en comparación con el aislado MEX31 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi*

El análisis de las secuencias de los genes con el empleo del programa BLAST permitió establecer que el gen *rpoB* del aislado 36A, presenta una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 98.77% en comparación con la cepa biovar *equi* de origen mexicano MEX31 (CP017292.1), con diferentes cambios a lo largo de la secuencia, un cambio en la posición 14 (A/G) con una Adenina en vez de una Guanina, un cambio en la posición 28 (C/T) con una Citocina en vez de una Timina, un cambio en la posición 138 (A/G) con una Adenina en vez de una Guanina, y un cambio en la posición 179 (C/T) con una Citocina en vez de una Timina (figura 8).



Figura 8. Alineamiento de la secuencia del gen *rpoB* del aislado 36A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX31 reportada en la base de datos GenBank. Las líneas indican nucleótidos idénticos y los círculos rojos representan cambios en la secuencia. El gen *rpoB* del aislado 36A presenta cambios en los nucleótidos con respecto a la secuencia de MEX30 biovar *equi*.

El BLAST también permitió establecer que el gen *rpoB* del aislado 6J, presenta una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 98.77% en comparación con la cepa biovar *equi* MEX31 (CP017292.1), con diferentes cambios a lo largo de la secuencia, un cambio en la posición 11 (A/G) con una Adenina en vez de una Guanina, un cambio en la posición 25 (C/T) con una Citocina en vez una Timina, un cambio en la posición 35 (A/G) con una Adenina en vez de una Guanina, y un cambio en la posición 176 (C/T) con una Citocina en vez de una Timina (figura 9).



Figura 9. Alineamiento de la secuencia del gen *rpoB* del aislado 6J de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX31 reportada en la base de datos GenBank. Las líneas indican nucleótidos idénticos y los círculos rojos representan cambios en la secuencia. El gen *rpoB* del aislado 6J presenta cambios en los nucleótidos con respecto a la secuencia de MEX31 biovar *equi*.

A diferencia de las cepas 36A y 6J, los resultados obtenidos del análisis de las cepas 38-55-J y 61A realizado mediante el BLAST demostraron que tienen secuencias idénticas con cambios en las mismas posiciones de nucleótidos, con una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 98.92% en comparación con la cepa biovar *equi* MEX31 (CP017292.1), con un cambio en la posición 146 (G/A) con una Guanina en vez de una Adenina, un cambio en la posición 187 (T/C) con una Timina en vez de una Citocina, un cambio en la posición 297 (G/A) con una Guanina en vez de una Adenina, y un cambio en la posición 311 (T/C) con una Timina en vez de una Citocina (figura 10).

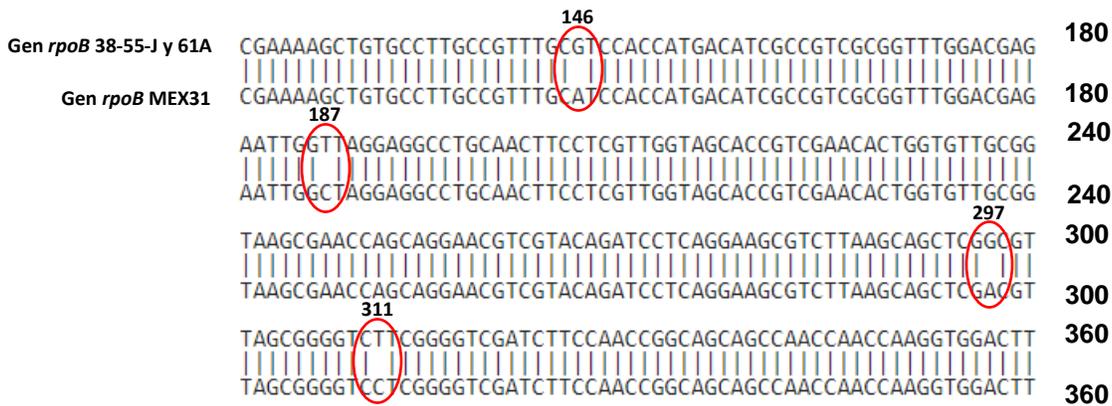


Figura 10. Alineamiento de las secuencias del gen *rpoB* de los aislados 38-55-J y 61A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en comparación con la secuencia de la cepa mexicana MEX31 reportada en la base de datos GenBank. Las líneas indican nucleótidos idénticos y los círculos rojos representan cambios en la secuencia. El gen *rpoB* de los aislados 38-55-J y 61A presenta cambios en los nucleótidos con respecto a la secuencia de MEX31 biovar *equi*.

8.8. Análisis de las secuencias de los genes ARNr *16S* y *pld* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* en comparación con los aislados MEX30 y MEX31 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi*

El análisis de las secuencias de los genes con el empleo del programa BLAST permitió establecer que el gen ARNr *16S* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A, presenta una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 99.87% en comparación con la cepa MEX30 (CP017291.1) con un cambio en la posición 220 (T/-) en donde se presenta un BLAST con hueco (gap). A diferencia del gen *pld* de las cepas 36A, 6J, 38-55-J y 61A, quien presenta una identidad de secuencia a nivel de nucleótidos de un 98.55% en comparación con la cepa MEX30 con un cambio en la posición 79 (G/A) con una Guanina en vez de una Adenina, y un cambio en la posición 121 (C/T) con una Citocina en vez una Timina. Respecto a la cepa MEX31 (CP017292.1), se obtuvieron los mismos resultados anteriormente mencionados con los dos genes, ARNr *16S* y *pld* respectivamente (figura 11).



Figura 11. Alineamiento de las secuencias de los genes ARNr *16S* y *pld* de los aislados 38-55-J y 61A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en comparación con las secuencias de las cepas mexicanas MEX30 y MEX31 reportadas en la base de datos GenBank. Las líneas indican nucleótidos idénticos y los círculos rojos representan cambios en la secuencia. El gen ARNr *16S* y *pld* de los aislados 38-55-J y 61A presentan cambios en los nucleótidos con respecto a las secuencias de MEX30 y MEX31 biovar *equi*.

8.9. Análisis filogenético de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en comparación con secuencias reportadas en GenBank

La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. El árbol de consenso Bootstrap inferido de 1000 repeticiones se tomó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Maximum Composite Likelihood y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. Este análisis involucró 32 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes (opción de eliminación completa). Hubo un total de 308 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis filogenético permitió aislar a las cepas 36A, 6J, 38-55-J y 61A junto a otras cepas pertenecientes al biovar *ovis*, mostrando más cercanía a las cepas MEX25 y MEX29 entre las cepas mexicanas reportadas por Parise *et al.*, (2018), en un mismo grupo donde también aparecieron las cepas T1, 1002, 29156, C231, NCTC4681 y I19 con diferentes valores de repeticiones (Bootstrap) (figura 12).

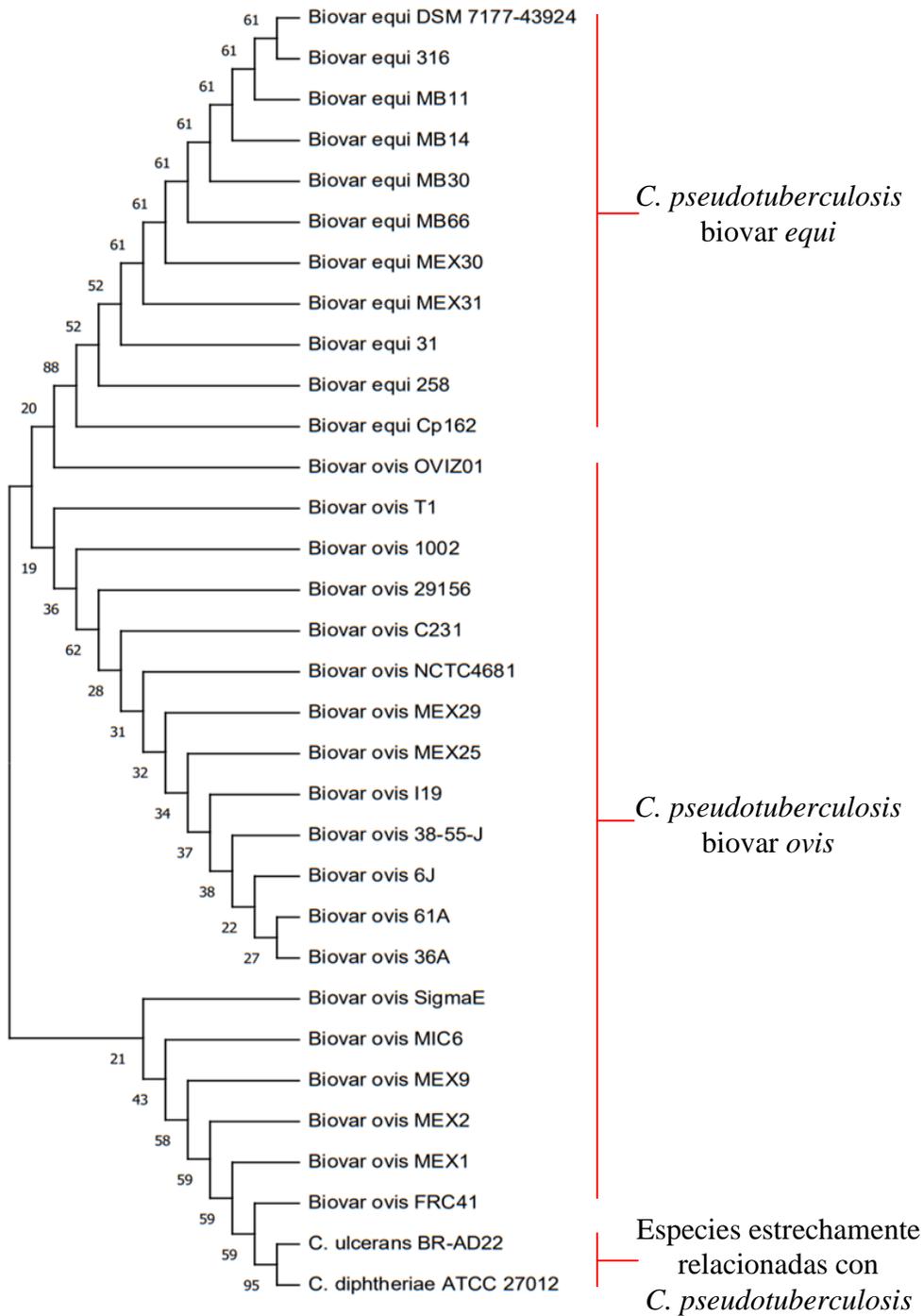


Figura 12. Árbol filogenético construido mediante el empleo del programa MEGA11 con el método de Neighbor-Joining, basado en la secuencia del gen *rpoB* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Se utilizó el modelo Maximum Composite Likelihood con un valor de Bootstrap de 1000 repeticiones, con el uso de las secuencias del gen *rpoB* de los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A biovar *ovis* en comparación con 28 cepas reportadas en la base de datos GenBank.

IX. DISCUSIÓN

La Linfadenitis caseosa (LC) causada por *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* es una enfermedad muy presente en las unidades de producción ganadera de ovinos y caprinos en diferentes regiones de México (Parise *et al.*, 2018; Varela *et al.*, 2018). La LC causa importantes pérdidas económicas en diferentes partes del mundo (Windsor *et al.*, 2014) y además constituye una zoonosis (Bastos *et al.*, 2012). La LC es poco reportada y no existen muchos informes de su prevalencia en México.

En el presente trabajo se logró confirmar la presencia de *C. pseudotuberculosis* en diferentes municipios del estado de Jalisco mediante la identificación molecular por PCR Cuádruplex, método que permite la amplificación de los genes *pld* (203pb), *rpoB* (446pb), *narG* (612pb) y ARNr *16S* (816pb), en donde se identificaron 30 aislamientos de 59 muestras para una frecuencia de presentación de un 50.84% siendo superior a la reportada por Varela *et al.*, (2018), ya que en la misma región se identificaron 57(33%) aislados de 160 muestras analizadas mediante PCR Multiplex.

Los resultados obtenidos confirman la presencia de *C. pseudotuberculosis* en la región objeto de estudio, donde existe una importante producción de pequeños rumiantes. Los datos obtenidos se consideran elevados a comparación con los valores alcanzados en un estudio previo realizado en un matadero local de la provincia de Elazig, situada al este del país de Turquía, donde de un total de 2046 canales de ovejas, 2262 de cabras y 118 muestras de ganglios con abscesos provenientes de 89 ovejas y 29 de cabras fue posible aislar diferentes especies del género *Corynebacterium* del 81.4% de los abscesos, dando una prevalencia general del 2.2% y de 3.5 y 1.1% en ovinos y caprinos, respectivamente (Çetinkaya *et al.*, 2002). Por otra parte, en Canadá mediante realización de un total de 152 necropsias en cabras, de 13 rebaños de la provincia de Quebec, se diagnosticó la LC en el 24.3% y se estimó como causa de muerte en el 3.9% del total de animales evaluados (Debien *et al.*, 2013). Otro estudio realizado en Turquía, provincia de Aydin, a partir de muestras de abscesos de nódulos linfáticos parotidos, retrofaríngeos, submandibulares, preescapulares, poplíteos y prefemorales, de 57 ovejas hembras y 43 machos, permitió identificar *C. pseudotuberculosis* en el 17% de las muestras analizadas (Parin *et al.*, 2018). Sin embargo, los resultados son bajos en comparación con estudios de seroprevalencia realizados en regiones de Brasil, donde la presentación de la

LC a nivel de granja se ha estimado de manera muy elevada. En el estado de Minas Gerais, Brasil se presentó la LC en 97 granjas con un 95.9% (Guimarães *et al.*, 2009), y en la Región Noreste del país en 230 granjas con un 87.8% (de Farias *et al.*, 2019). En la ciudad de Río de Janeiro, Brasil, de un total de 202 muestras evaluadas por PCR, el 54% fueron positivas a *C. pseudotuberculosis* (Nassan *et al.*, 2015). En China, el estudio de 19 muestras colectadas de absceso cutáneos de cabras provenientes de tres granjas en el condado de Lezhi, Jintang y Pengxi en la provincia de Sichuan, se indicó que el 57.9 % (11/19) fueron aislados de *C. pseudotuberculosis*, siendo la PCR clasificada como técnica más sensible en el diagnóstico que el cultivo bacteriano (Zhang *et al.*, 2019). Recientemente, el análisis de 2 grupos de animales, G1 conformado por 197 ovejas con nódulos linfáticos periféricos agrandados y G2 con muestras de 202 nódulos linfáticos viscerales sanos, provenientes de un matadero del estado de São Paulo, Brasil, indicó según la identificación microbiológica de *C. pseudotuberculosis* (86/197; 43.7 %), en los nódulos linfáticos con abscesos. La citología identificó 49.2% (97/197) de organismos pleomórficos grampositivos (aspecto corineforme) y la PCR Multiplex confirmó material genético de *C. pseudotuberculosis* en el 74.4% (64/86) de las muestras con aislamiento de *C. pseudotuberculosis* y en el 66% (64/97) de las muestras con aspecto citológico corineforme ($\kappa = 86.78\%$; IC 95% = 79.87-93.68%). Estos hallazgos enfatizan la prevalencia de *C. pseudotuberculosis* en la formación de abscesos entre los nódulos linfáticos periféricos de las ovejas y el valor diagnóstico de la PCR en comparación con otras técnicas (de Oliveira *et al.*, 2021).

Se identificó a *C. pseudotuberculosis* en el 87.5% del total de municipios incluidos en el presente estudio, por lo que la región seleccionada del estado de Jalisco se considera una zona de elevada prevalencia de la enfermedad. Es de suma importancia reforzar las medidas de control de la enfermedad en la zona, así como también capacitar al personal responsable del manejo de los animales en las unidades de producción. Por lo general la frecuencia de presentación en cada región o país depende principalmente del tipo de explotación, el ganadero no reporta al médico veterinario sobre la presencia de abscesos externos en sus ovejas; y los médicos veterinarios no informan los decomisos parciales, solo se notifica la enfermedad cuando ocurre el decomiso total de la canal por la existencia de abscesos internos muy extendidos afectando los órganos. Las manifestaciones clínicas se presentan en nódulos subcutáneos u órganos internos con formación de abscesos, sin embargo, en ocasiones no se

presentan manifestaciones clínicas, como los abscesos de los nódulos linfáticos internos y síntomas respiratorios por lesiones pulmonares de tal manera que la enfermedad se diagnóstica cuando el animal es sacrificado (Carrillo *et al.*, 2005). Para el manejo de los animales se realiza la búsqueda de lesiones y abscesos en los nódulos linfáticos superficiales mediante la inspección visual, principalmente en toda el área de la cabeza y el cuello. La evidencia experimental ha demostrado que las lesiones pueden aparecer hasta 2 meses después de una infección primaria, por lo tanto, los tiempos de cuarentena deben ser de al menos 2 meses, aunque a menudo esto no se realiza (Fontaine, 2015). Se deben mantener separados del resto del rebaño a los animales confirmados como positivos. Se recomienda la desinfección de los corrales y cobertizos, así como el material de esquila ya que se ha demostrado que estas prácticas disminuyen la incidencia de la enfermedad (O'Reilly *et al.*, 2008). La incidencia de la enfermedad aumenta con la edad, por lo que se recomienda que los animales mayores sean manipulados al final de la rutina, como procedimiento para minimizar el riesgo de propagación de la infección. Se recomienda no dejar que un absceso madure y drene por sí solo, puesto que conlleva a la contaminación de las instalaciones, suelo y alimento.

En el presente estudio se encontró la presencia de *C. pseudotuberculosis* en 8 animales jóvenes que representó el 26.66% de los aislamientos, resultado relevante, ya que la enfermedad se considera de mayor incidencia en animales adultos presentándose en forma cutánea y/o visceral (Estevao *et al.*, 2007). Debido a esto, es de suma importancia el diagnóstico oportuno ya que se considera como una bacteria endémica en el territorio nacional.

Son pocos los estudios que han reportado la presencia de la enfermedad en animales jóvenes, se cree que la LC en corderos se debe a una inmunidad poco desarrollada, siendo capaces de contraerla, sobre todo los animales que no estén separados por edades y que conviven en un ambiente contaminado (Yitagesu *et al.*, 2020). También se ha observado que tras ser destetados se mezclan con los animales adultos de la unidad de producción, alimentándose junto con animales de mayor edad que están en el mismo corral, y si al introducir la cabeza en los espacios de los comederos sufren algún tipo de lesión con algún objeto punzocortante, esto favorece el ingreso de la bacteria afectando a los nódulos proximales a esa zona como son los mandibulares, parotídeos, retrofaríngeos y cervicales. En los animales recién nacidos, es posible como vía de transmisión el cordón umbilical contaminado con secreciones de un absceso cutáneo o también pueden ocurrir durante el período fetal, por lo que los corderos

nacen con la enfermedad, así como también se considera importante el sistema respiratorio como sitio de infección, permitiendo que la bacteria pueda ingresar a los pulmones por esta vía y causar lesiones en forma de abscesos internos (Paton *et al.*, 1996). En animales jóvenes, la infección provoca toxemia aguda con síntomas respiratorios, pérdida de apetito, temperatura elevada, atonía ruminal, ictericia, anemia y hemoglobinuria. (O'reilly *et al.*, 2010). Los corderos adquieren inmunidad pasiva mediante el calostro, por lo que se requiere que la madre sea vacunada durante el periodo de gestación (Auad *et al.*, 2018), lo cual fue confirmado en un estudio en cabras gestantes vacunadas con Glanvac® 3, Zoetis, Australia, donde los corderos recién nacidos (48 horas después del nacimiento), mostraron niveles altos de IgG anti- *C. pseudotuberculosis* en suero. Los autores sugieren que la vacuna evaluada debe ser sometida a estudios para determinar la vida media de los anticuerpos para diseñar un calendario de vacunación para los cabritos que permita una protección prolongada (Auad *et al.*, 2018). En otro estudio en animales jóvenes se reportaron casos de LC a lo largo de tres años en las islas Malvinas, aunque el porcentaje es menor al 1% en cada año (2013-2015) (Listos *et al.*, 2016), mientras que otro trabajo en Etiopia encontró que existe un mayor riesgo de contraer LC incluso en animales recién nacidos y que es posible observar signos clínicos a los 6 meses de edad (Yitagesu *et al.*, 2020), esto difiere de la mayoría de publicaciones que indican que ha mayor edad aumenta el riesgo de contraer LC, sin embargo, en el presente estudio 8 animales jóvenes de 30 analizados resultaron positivos, lo que indica la importancia de dar seguimiento al diagnóstico en animales de este rango de edad.

También es de suma importancia mencionar que la LC se presenta más en hembras que en machos, esto de acuerdo con un estudio realizado en Iraq en donde se reportaron porcentajes del 10.6 y 0.85% respectivamente (Issa *et al.*, 2021). En comparación con lo reportado en el presente estudio se obtuvieron resultados similares en donde el 86.66% (26 animales) de los positivos utilizados son hembras y el 13.33% (4 animales) son machos, sin embargo, esto se puede deber a que las hembras permanecen más tiempo en los rebaños por su importancia en la reproducción y esto hace que estén más tiempo expuestas, y en condiciones no controladas están más propensas a contraer la enfermedad por *C. pseudotuberculosis*.

La técnica de PCR Multiplex detecta *C. pseudotuberculosis* a partir de 1pg (0.001 ng) de ADN genómico, lo que demuestra la sensibilidad del método. El límite de detección en muestras clínicas se estimó en 103 UFC (Unidad Formadora de Colonias) de *C. pseudotuberculosis*

detectado directamente en pus de ovinos y caprinos infectados (n=56) con una alta sensibilidad diagnóstica (94.6%) (Pacheco *et al.*, 2007). Por otra parte, el método de diagnóstico PCR Cuádruplex, implementado en este estudio presenta como ventaja principal la capacidad de establecer una identificación molecular a nivel de biovar de la especie (Almeida *et al.*, 2017a). La clasificación entre los biovares ha sido convencionalmente establecida mediante métodos bioquímicos, con la prueba de reducción de nitrato a nitrito, para la identificación de la acción de la enzima nitrato reductasa presente solo en cepas del biovar *equi* (Biberstein *et al.*, 1971). Sin embargo, esta práctica constituye un método laborioso que requiere de tiempo, días de cultivo en el laboratorio y de otras pruebas bioquímicas complementarias para poder establecer un diagnóstico concluyente (Çetinkaya *et al.*, 2002). La PCR Cuádruplex también presenta ventajas con respecto al PCR Multiplex (Pacheco *et al.*, 2007) donde solo se amplifican los genes *pld* (factor de virulencia principal y exclusivo de *C. pseudotuberculosis*) (D'Afonseca *et al.*, 2008), el *rpoB* (con semejanza de 95.9% en su secuencia entre dos especies del mismo género *Corynebacterium* spp.), y el *16S* del ARN ribosomal (que diferencia a la bacteria de *C. diphtheriae*, especies con una similitud de 97.8%), los cuales se utilizan para identificar hasta nivel de especie (Pacheco *et al.*, 2012). Con la incorporación de iniciadores para la amplificación de un segmento del gen *narG* (enzima nitrato reductasa) la PCR Cuádruplex logra en un solo análisis llegar a un diagnóstico hasta nivel de biovar, lo cual hace menos complicado el trabajo y resulta económico. La prueba de PCR Cuádruplex permite la detección a partir de 20ng de ADN en la muestra. La prueba estadística Chi-cuadrado para comparar la técnica bioquímica con el PCR Cuádruplex en la diferenciación de los biovares, mostró diferencia significativa ($P = 0.75$), con una razón de probabilidad de 1 (IC 95% para el odds ratio: 0.16-6.14), el valor de concordancia fue de 97.13% (338/348) de las cepas evaluadas y el valor estadístico kappa fue de 0.94 [IC 95% (0.90–0.98)], lo que denota una excelente concordancia entre pruebas bioquímicas y moleculares para nitrato reductasa (Almeida *et al.*, 2017a). Además el PCR Cuádruplex puede ser utilizado para identificar cada biovar y su capacidad de infectar diferentes tipos de hospederos, el biovar *ovis* ha sido aislado de antílopes (Muller *et al.*, 2011), vacas (Silva *et al.*, 2011), alpacas (Sprake y Gold, 2012), llamas (Lopes *et al.*, 2012), cabra montés (Colom-Cadena *et al.*, 2014), cerdos (Oliveira *et al.*, 2014) y, ovejas y cabras (Varela *et al.*, 2018), mientras que el biovar *equi* se ha identificado en aislados procedentes de equinos (Muñoz *et al.*, 2016), camellos (Hassan *et al.*, 2012; Wernery y Kinne, 2016; Borham *et al.*, 2017) y búfalos (Viana *et al.*, 2017). Recientemente, en un estudio

realizado por El-Sebay *et al.*, (2021) evaluaron el ensayo de PCR Multiplex en donde utilizaron cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* de ovinos y caprinos, y cepas de *C. pseudotuberculosis* biovar *equi* de búfalo y ganado bovino para verificar la capacidad del ensayo de identificar a *C. pseudotuberculosis* a nivel de especie. Posteriormente, el ensayo de PCR Multiplex fue modificado mediante la adición de iniciadores específicos del gen *narG* para la identificación de *C. pseudotuberculosis* biovar *equi*, gen que fue detectado en las cepas de ganado bovino y búfalo, confirmando que la PCR Cuádruplex es confiable en la identificación de biovars de *C. pseudotuberculosis* en laboratorios microbiológicos. En un estudio realizado en el estado de Zacatecas se identificó la presencia de *C. pseudotuberculosis* biovar *equi* en muestras de absceso pectoral de 2 caballos con el uso de los iniciadores *rpoB* (446pb) y *pld* (203pb), siendo el primer reporte sobre este biovar en México (Muñoz *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que, en la mayoría de las granjas de producción de pequeños rumiantes del territorio nacional, es común encontrar otras especies (ganado equino y bovino) que han sido identificadas como hospederos, el uso de la técnica de PCR Cuádruplex podría utilizarse en estudios de transmisión de *C. pseudotuberculosis* y tendencia de infección en diferentes tipos de hospederos. En la actualidad, la Linfadenitis caseosa continúa siendo un problema en las unidades de producción de ovinos y caprinos, con repercusiones en la salud pública, por lo que el diagnóstico seguro y las buenas prácticas de higiene en las instalaciones, constituyen medidas fundamentales para el control y prevención de la enfermedad.

Para el análisis de secuencias locales se seleccionaron 4 aislados al azar, en donde se tomaron 2 aislados obtenidos a partir de animales jóvenes y 2 aislados obtenidos a partir de animales adultos (36A, 6J, 38-55-J y 61A) para la comparación de secuencias principalmente del gen *rpoB* ya que se considera altamente polimórfico (Khamis *et al.*, 2005) en comparación con los genes ARNr *16S* (Çetinkaya *et al.*, 2002) y *pld* que son altamente conservados (Soares *et al.*, 2013). Además, el gen *rpoB* presenta variaciones genotípicas entre cepas de la misma especie de hospedero, e incluso entre cepas del mismo biovar (Khamis *et al.*, 2004; Khamis *et al.*, 2005), debido a esto, se utilizó para conocer la variabilidad genética que existe entre los aislados procedentes de animales jóvenes y adultos ya que se han presentado casos de manera más frecuente en animales jóvenes en el área de estudio. Entre las secuencias se presentaron variaciones de nucleótidos en el 75% de los aislados (36A, 6J, 38-55-J y 61A). Las secuencias de los aislados 36A de animal adulto y 6J de animal joven no presentaron variaciones

genotípicas ya que resultaron ser idénticas en un 100% a pesar de ser de diferentes municipios, el aislado 36A pertenece al municipio de Zapopan mientras que el aislado 6J pertenece al municipio de San Juan de los Lagos, con una distancia de 129.57 km entre estos municipios, posiblemente esto se debe a que son la misma cepa. Los aislados 36A y 6J presentaron un porcentaje de similitud de un 86% en comparación con la cepa 38-55-J de animal joven procedente del municipio de Arandas, con una distancia de 111.37 km con respecto al municipio de Zapopan, y una distancia de 60.28 km respecto al municipio de San Juan de los Lagos. En cuanto a la cepa 61A de animal adulto procedente del municipio de Zapotlanejo se presentó variabilidad genotípica con una similitud entre secuencias en un 87% en comparación las cepas 36A y 6J, con una distancia de 36.87 km respecto al municipio de Zapopan y una distancia de 103.40 km con el municipio de San Juan de los Lagos, mientras que los aislados 38-55-J y 61A presentaron variación genotípica con una similitud entre secuencias en un 99%, a pesar de existir una distancia de 75.51 km entre los municipios de Arandas y Zapotlanejo. En comparación con lo obtenido en el presente trabajo, en un estudio realizado por Varela *et al.*, (2018) también se reportó variabilidad genética con porcentajes de similitud de 98, 99 y 100% en secuencias parciales del gen *rpoB* de aislados obtenidos a partir de ovinos y caprinos de diferentes municipios del estado de Jalisco, con respecto a cepas reportadas en la base de datos GenBank. La variabilidad de nucleótidos en las secuencias del gen *rpoB* de los aislados biovar *ovis* utilizados en el presente estudio demuestran que son diferentes, comprobando que actualmente existe más variabilidad genética entre los aislados de la región objeto de estudio del estado de Jalisco. Esto se correlaciona con lo reportado por Retamal *et al.*, (2011), en donde se identificaron 3 secuencias diferentes asociadas al hospedero, lo que sugiere que existen diferentes genotipos en ovinos, caprinos y equinos con valores diferentes de similitud de nucleótidos entre ellos. Además, se han reportado diferencias fenotípicas entre aislados de *C. pseudotuberculosis* obtenidos a partir de abscesos cutáneos y viscerales por LC en ovinos (Barrientos *et al.*, 2008), lo que puede estar relacionado con las características moleculares de la bacteria. Actualmente no se conoce mucho sobre la expresión de los genes de virulencia en diferentes condiciones ambientales en las que se puede encontrar la bacteria (Ibraim *et al.*, 2019), sin embargo, un estudio realizado por Silva *et al.*, (2017) mostro que los pases *in vitro* alteran la expresión del proteoma extracelular de *C. pseudotuberculosis* lo que induce a una virulencia reducida, mientras que un solo pase *in vivo* en un modelo murino puede provocar cambios significativos en su proteoma extracelular contribuyendo al aumento de su virulencia.

En otro estudio realizado por Corrêa *et al.*, (2018) también se observó una expresión hasta 8 veces mayor en abscesos que en cultivos, esto indica que, si existe una expresión genética de la bacteria *in vitro*, sin embargo, los factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* tienen una mayor expresión *in vivo*.

Las secuencias del gen *rpoB* de los aislados seleccionados 36A, 6J, 38-55-J y 61A de ovejas del estado de Jalisco, México, presentaron cambios en las secuencias a nivel de nucleótidos con variaciones genotípicas en comparación con las cepas biovar *ovis* reportadas en la base de datos GenBank, la cepa MEX1 (CP017711.1) del estado de Tlaxcala, MEX2 (CP046644.1) del estado de Puebla y MEX9 (CP014543.1) del estado de Guanajuato, obtenidas a partir de cabras con un porcentaje de similitud de un 99.73%, con diferencias en la ubicación geográfica de 40-50 km aproximadamente entre estos aislados. A diferencia de las cepas biovar *ovis* MEX25 (CP013697.1) del estado de Guanajuato y MEX29 (CP016826.1) del estado de México obtenidas a partir de ovejas, con quienes los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A mostraron tener secuencias idénticas del gen *rpoB* con porcentajes de similitud de un 100%. Las cepas MEX25 y MEX9 con una distancia de 450 km con respecto a las cepas MEX1, MEX2 y MEX9 (Parise *et al.*, 2018). En cuanto a los genes ARNr *16S* y *pld* de las cepas 36A, 6J, 38-55-J, y 61A se obtuvieron los resultados esperados presentando secuencias idénticas en un 100% entre estos aislados y en correlación con todas las cepas biovar *ovis* utilizadas del GenBank. En el análisis con las cepas biovar *equi* MEX30 (CP017291.1) y MEX31 (CP017292.1) del GenBank se presentaron diferencias genotípicas significativas en las secuencias de los 3 genes, ARNr *16S*, *rpoB* y *pld* con respecto a los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A biovar *ovis*, con porcentajes de similitud en el gen *rpoB* de 99.75 y 98.92% con la cepa MEX30, y una similitud de 98.77 y 98.92% con la cepa MEX31. Los genes ARNr *16S* y *pld* presentaron porcentajes de similitud de 99.87 y 98.55%, respectivamente. Esto también demuestra que existe variabilidad en las secuencias de los genes entre los biovars *ovis* y *equi* debido a que son de diferente grupo genómico.

El análisis filogenético se realizó mediante el gen *rpoB* debido a que se considera como el de elección para *C. pseudotuberculosis*, ya que ayuda a diferenciar a nivel de subespecie en comparación con el gen ARNr *16S* (Retamal *et al.*, 2011; Pavan *et al.*, 2012). Mediante este análisis los aislados 36A, 6J, 38-55-J y 61A obtenidos a partir de ovejas mostraron ser más cercanos a las cepas MEX25 y MEX29 obtenidas a partir de ovejas ya que se agruparon en un

mismo clado. A diferencia de las cepas MEX1, MEX2 y MEX9 que se presentaron en un clado independiente junto con las otras dos especies utilizadas del género *Corynebacterium*, *C. diphtheriae* y *C. ulcerans*. No se mostró correlación de los aislados analizados con ninguna de las cepas utilizadas biovar *equi*, entre ellas la cepa MEX30 y MEX31, ya que se mostró un clado independiente de cepas biovar *equi* sin la presencia de cepas biovar *ovis* utilizadas en el análisis filogenético. Diversos estudios han demostrado que las cepas biovar *ovis* contienen un alto grado de clonalidad, con más secuencias conservadas y capacidad de infectar diferentes tipos de hospederos (Connor *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2013), pero no se agrupan filogenéticamente en los clados de la misma manera que las cepas biovar *equi* (Viana *et al.*, 2017). Mientras que las cepas del biovar *ovis* forman un grupo con cepas obtenidas de diferentes tipos de hospederos, las cepas del biovar *equi* son más variables, están bajo un proceso de mutación constante, presentando diferencias de cepas establecidas que hacen que su distribución en el árbol filogenético sea más específica y separada por grupos, incluso por tipo de hospederos (Soares *et al.*, 2013; Dorneles *et al.*, 2014). El análisis de secuencias locales del gen *rpoB* mediante el programa BLAST y el análisis filogenético mediante el programa MEGA11 con el método de Neighbor-Joining demostraron que hay más correlación entre cepas por el tipo de hospedero que por la ubicación geográfica de origen de los aislados, permitiéndonos conocer las variaciones genotípicas puntuales a nivel de nucleótidos que presentan cada uno de los aislados analizados y diferenciar aislados a nivel de subespecie. El seguir realizando caracterización molecular *in silico* permitirá el desarrollo de nuevas vacunas experimentales como alternativa para la prevención de la LC, ya que se buscan los principales factores de virulencia que permitan la activación del sistema inmune humoral y celular (de Pinho *et al.*, 2021). Por lo que la caracterización molecular de aislados de *C. pseudotuberculosis* es de suma importancia para la implementación de vacunas y métodos de diagnóstico para estudios posteriores.

X. CONCLUSIONES

1. Se aisló e identificó mediante PCR Cuádruplex a *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* en 30 de 59 muestras de abscesos cutáneos lo que representa un 50.84%. Los aislamientos presentaron únicamente la amplificación de los genes ARNr *16S* (816pb), *rpoB* (446pb) y *pld* (203pb), con un total de 8 (26.66%) animales jóvenes y 22 (73.33%) animales adultos.
2. La caracterización molecular mediante PCR Cuádruplex permitió la identificación de biovares de *C. pseudotuberculosis* en aislamientos obtenidos de ovinos y caprinos del estado de Jalisco; y reafirma la presencia de este microorganismo patógeno en el territorio nacional mexicano en pequeños rumiantes adultos y por primera vez en México se pone en evidencia en animales jóvenes de entre tres a seis meses de edad.
3. La secuenciación y análisis filogenético de las secuencias de los genes ARNr *16S*, *rpoB* y *pld* de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* del estado de Jalisco, México, permitió agrupar ciertos aislamientos (36A, 6J, 38-55-J y 61A) con cepas de referencia previamente reportadas en la base de datos GenBank. Particularmente, el análisis basado en el gen *rpoB* permitió conocer que las cepas 36A, 6J, 38-55-J y 61A son más cercanas a las cepas mexicanas MEX25 y MEX29 reportadas previamente.
4. El presente estudio muestra la necesidad de seguir realizando estudios de caracterización molecular para la prevención y control de la enfermedad en unidades de producción de ovinos y caprinos.

XI. RECOMENDACIONES

1. Identificar el biovar de *C. pseudotuberculosis* mediante el método de PCR Cuádruplex.
2. Secuenciar los productos de amplificación mediante el método de Sanger.
3. Realizar análisis de identidad de secuencias locales mediante el programa BLAST en comparación con cepas reportadas en la base de datos GenBank.
4. Realizar análisis filogenético de cepas mediante el programa MEGA11 con el método de Neighbor-Joining.
5. Realizar análisis de secuenciación del genoma completo de la bacteria y profundizar en el estudio genómico de factores de patogenicidad de cara al desarrollo de vacunas y medios de diagnóstico para la linfadenitis caseosa en México.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abebe**, D., y Sisay Tessema, T. (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.
2. **Alejos**, V.L.P., Aragón, M.M. del C., y Cornejo, R.A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En: Cornejo, R.A., Serrato, D.A., Rendón, A.B., y Rocha, M.G. (Eds). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. (pp. 1-25). México: SEMARNAT.
3. **Aleman**, M., y Spier, S.J. (2001). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. En: Smith, P.B. (Ed). *Large Animal Internal Medicine*. (pp. 1076-1084). Saint Louis: Mosby Co.
4. **Alikhan**, N.F., Petty, N.K., Ben Zakour, N.L., y Beatson, S.A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*, 12: 402.
5. **Almeida**, S., Dorneles, E.M.S., Diniz, C., Abreu, V., Sousa, C., Alves, J., *et al.* (2017a). Quadruplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differentiating biovar *Ovis* and *Equi*. *BMC Veterinary Research*, 13, 290.
6. **Almeida**, S., Sousa, C., Abreu, V., Diniz, C., Dorneles, E.M.S., Lage, A.P., Barh, D., y Azevedo, V. (2017b). Exploration of nitrate reductase metabolic pathway in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *International Journal of Genomics*, 1, 1-12.
7. **Alloui**, M.N., Kaba, J., y Alloui, N. (2011). Prevalence and risk factors of caseous lymphadenitis in sheep and goats of Batna area (Algeria). *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 1, 162-164.
8. **Al-Gaabary**, M.H., Osman, S.A., y Oreiby, A.F. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Ruminant Research*, 87, 116-121.
9. **Andrade**, J.S.L., Azevedo, S.S., Andreey, J.A.T., Higino, S.S.S, y Azevedo, E.O. (2012). Occurrence and risk factors associated with the *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and goats from the semiarid region of the

- Paraíba state, Northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32, 116-120.
10. **Araújo**, C.L., Blanco, I., Souza, L., Tiwari, S., Pereira, L.C., Ghosh, P., Azevedo, V., Silva, A., y Folador, A. (2020). *In silico* functional prediction of hypothetical proteins from the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. *Peer J*, 8, e9643.
 11. **Arsenault**, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J.R., *et al.* (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.
 12. **Ashraf**, A., Imran, M., Yaqub, T., Tayyab, M., Shehzad, W., y Thomson, P.C. (2017). A novel Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically significant bacterial pathogens associated with bovine mastitis. *Molecular and Cellular Probes*, 33, 57-64.
 13. **Auad**, J., Cerutti, J., Cooper, L. G., Camussone, C. M., Lozano, N. A., Crespo, F. M., y Lozano, A. (2018). Humoral immune response of pregnant goats to two *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin formulations. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 50(2), 101-105.
 14. **Azevedo**, V., Abreu, V., Almeida, S., Santos, A., Soares, S., Ali, A., Pinto, A., Magalhães, A., Barbosa, E., Ramos, R., Cerdeira, L., Carneiro, A., Schneider, P., Silva, A., y Miyoshi, A. (2011). Whole genome annotation: *in silico* analysis. En: Mahdavi, M.A. (Ed). *Bioinformatics - trends and methodologies*. (pp. 679-704). Brazil: IntechOpen.
 15. **Baird**, G.J., y Fontaine, M.C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*, 137, 179-210.
 16. **Baraúna**, R.A., Ramos, R.T., Veras, A.A., de Sá, P.H., Guimarães, L.C., das Graças, D.A., *et al.* (2017). Genomic analysis of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bv. *Equi* isolated from horses showing distinct signs of infection. *Standards in Genomic Sciences*, 12, 16.
 17. **Barral**, T.D., Barros, R.M., Krishnaswamy, R., Santos, A.J., Loureiro, D., Sokolonski, A.R., Azevedo, V., *et al.* (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microbial Biotechnology*,

12(6), 1313-1323.

- 18. Barrientos, J.,** Cortés, N., Tórtora, J., Alba, F., Del Rio, J., y Valdivia, G. (2008). Diferentes biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* están involucrados en la linfadenitis caseosa cutánea y visceral. *Revista Electrónica de Clínica Veterinaria*, 3(4).
- 19. Bastos, B.L.,** Dias, P.R.W., Dorella, F.A., Ribeiro, D., y Seyffert, N. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. *Journal of Clinical and Cellular Immunology*, 4, 1-15.
- 20. Batey, R.G.** (1986). Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at Western Australian abattoir. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 482-485.
- 21. Belchior, S. E.,** Gallardo, A., Abalos, A., Jodor, N., y Jensen, O.G. (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Revista Veterinaria Argentina*, 23, 258-278.
- 22. Belchior, E.,** Graciela, S., Gallardo, A., Abalos, M., Alvarez, L., Núñez, N., Guevara, D., y Jensen, O. (2009). *Corynebacterium Pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revisión de casos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(10), 1-16.
- 23. Bernard, K.A.,** y Funke, G. (2012). Genus *Corynebacterium*. En: Whitman, W.B. (Ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5 The actinobacteria*. (pp. 245-289). New York, USA: Springer.
- 24. Biberstein, EL.,** Knight, HD., y Jang, S. (1971). Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Record*, 89, 691-692.
- 25. Billington, S.J.,** Esmay, P.A., Songer, J., Jost, B., Hoppert, M., y Liebl, W. (2002). Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 208, 41-45.
- 26. Binns, S.H.,** Green, L.E., y Bailey, M. (2002). Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Veterinary Record*, 150, 263-268.
- 27. Binns, S.H.,** Green, L.E., y 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.
- 28. Borham, M.,** Oreiby, A., El-Gedawy, A., y Al-Gaabary, M. (2017). Caseous lymphadenitis in Sudanese and Somalian camels imported for meat consumption in

Egypt. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 55(2), 52-59.

29. **Brown**, C.C., y Olander, H.J. (1987). Caseous lymphadenitis of goat and sheep: a review. *Veterinary Bulletin*, 57, 1-12.
30. **Burkovski**, A. (2013). Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. *ISRN Microbiology*, 935736, 11.
31. **Burkovski**, A. (2018). The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111, 717-725.
32. **Cantekin**, Z., Ergün, Y., Doğruer, G., Sarıbay, M.K., y Solmaz, H. (2015). Comparison of PCR and culture methods for diagnosis of subclinical mastitis in dairy cattle. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(2), 277-282.
33. **Carillo**, G.M., Ortega, S.J.L., y Hernández, S.J.R. (2005). Prevalencia de linfadenitis caseosa en hatos caprinos de la comarca lagunera de Durango. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 4, 51-55.
34. **Carne**, H., y Onon, E.O. (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature*, 271, 246-248.
35. **Carminati**, R., Bahia, R., Costa, L.F.M., *et al.* (2003). Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2, 88-93.
36. **Carver**, T.J., Rutherford, K.M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B.G., y Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis Comparison Tool, *Bioinformatics*, 21: 3422-3423.
37. **Cerdeira**, L. T., Schneider, M. P. C., Pinto, A. C., de Almeida, S. S., dos Santos, A. R., Barbosa, E. G. V., *et al.* (2011). Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain CIP 52.97, isolated from a horse in Kenya. *Journal of Bacteriology*, 193(24), 7025-7026.
38. **Çetinkaya**, B., Karahan, M., Atil, E., *et al.* (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, 88, 75-83.
39. **Charaya**, G., Sharma, A., Kumar, A., Goel, P., y Singh, M. (2015). Detection of major mastitis pathogens by multiplex polymerase chain reaction assay in buffalo milk. *The Indian Journal Animal Sciences*, 85(3), 122-125.
40. **Cheuquepán**, V.F., Ríos, C.M., Abalos, P.P., M.Sc., M.V., Retamal, M.P., y M.S.C.,

- M.V. (2008). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: una breve actualización. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 23, 30-34.
- 41. Chirino, Z.C., Scaramelli, A., y Rey, V.C.** (2006). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research*, 65, 170-175.
- 42. Collett, M.G., Bath, G.F., y Cameron, C.M.** (1994). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. En: Coetzer, J., Thomson, G.R., y Justin, R.C. (Eds). *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*. (pp. 1387-1395). Cape Town, South Africa: Oxford University Press.
- 43. Colom-Cadena, A., Velarde, R., Salinas, J., Borge, C., Garca-Bocanegra, I., Serrano, E., Gass, D., Bach, E., et al.** (2014). Management of a caseous lymphadenitis outbreak in a new Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) stock reservoir. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 83.
- 44. Connor, K.M., Quiere, M., Baird, G., et al.** (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2633-2637.
- 45. Connor, K.M., Fontaine, M.C., Rudge, K., et al.** (2007). Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Research*, 38, 613-623.
- 46. Corrêa, J.I., Stocker, A., Trindade, S.C., Vale, V., Brito, T., Bastos, B., Raynal, J.T., Miranda, P.M., Alcantara, A.C., Freire, S.M., Costa, L.M., y Meyer, R.** (2018). *In vivo* and *in vitro* expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. *AMB Express*, 8, 89.
- 47. Cuadros, A.M., Paulovich, F.V., Minghim, R., y Telles, G.P.** (2007). *Point placement by phylogenetic trees and its application to visual analysis of document collections*. En: Proc. of IEEE VAST. (pp. 99-106). USA: IEEE Computer Society.
- 48. D'Afonseca, V., Moraes, P.M., Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Meyer, R., Portela, R.W., Miyoshi, A., y Azevedo, V.** (2008). A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular Research*, 7, 252-260.
- 49. da Costa Barnabé, N.N., Alves, J.R.A., de Farias, A.E.M., Alves, F.S.F., Faccioli-Martins, P.Y., Pinheiro, R.R., de Azevedo, S.S., y Alves, C.J.** (2020). Assessment of

caseous lymphadenitis in goats in a slaughterhouse in the Brazilian semi-arid region and estimates of economic losses due to carcass condemnation. *Semin Ciências Agrárias*, 41, 2655-2668.

- 50. de Farias, A.E.M., Alves, J.R.A, Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Faccioli, M.P.Y., Lima, A.M.C., et al.** (2019). Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 51(4), 745-752.
- 51. de la Fuente, R., de las Heras, M., Torrijos, C., de Tejada, P.D., Perez-Sancho, M., Carrion, F.C., Order, J.A., y Dominguez-Bernal, G.** (2017). Isolation frequency of bacteria causing lymphadenitis and abscesses in small ruminants in central Spain. *Small Ruminant Research*, 154, 5-8.
- 52. Debien, E, Hélie, P., Buczinski, S., Leboeuf, A., Bélanger, D., y Drolet, R.** (2013). Proportional mortality: A study of 152 goats submitted for necropsy from 13 goat herds in Quebec, with a special focus on Caseous lymphadenitis. *The Canadian Veterinary Journal*, 54, 581-587.
- 53. de Oliveira, Z.T., Ribeiro, D., Azevedo, V., Lara, G., Motta, R. G., da Silva, R. C., et al.** (2021). Bacteriological, cytological, and molecular investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mycobacteria, and other bacteria in caseous lymphadenitis and healthy lymph nodes of slaughtered sheep. *Brazilian journal of microbiology: Publication of the Brazilian Society for Microbiology*, 52(1), 431-438.
- 54. de Pinho, R.B., de Oliveira Silva, M.T., y Bezerra, F.S.B.** (2021). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105, 2287-2296.
- 55. Dercksen, D.P., Brinkhof, J.M.A., Dekker-Nooren, T., et al.** (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 75, 167-175.
- 56. de Sá Guimarães, A., do Carmo, F.B., Pauletti, R.B., Seyffert, N., Ribeiro, D., Lage, A.P., Heinemann, M.B., Miyoshi, A., Azevedo, V., y Gouveira, A.M.G.** (2011). Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. *IIOAB Journal*, 2, 33-43.
- 57. Dorella, F.A., Pacheco, L.G., Oliveira, S.C., Miyoshi, A., y Azevedo, V.** (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties,

- pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 37(2), 201-18.
- 58. Dorneles, E.M.S., Santana, J.A., Ribeiro, D., Dorella, F.A., Guimarães, A.S., et al.** (2014). Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. *PLoS ONE*, 9(6), e98758.
- 59. Egen, N.B., Cuevas, W., McNamara, P.J., Sammons, D.W., Humphreys, R., y Songer, J.G.** (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 1319-1322.
- 60. El-Sebay, N.A., Mohamed, M.M., El-Sergany, E.F., Abbas, A.M., Osman, R.M., y Abd El-Moaty, D.A.M.** (2021). Genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates in Egypt. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 6, 15-21.
- 61. Estevao, B.S., Gallardo, A., Abalos, A., Jodor, N., y Jensen, O.** (2006). Actualización sobre Linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Veterinaria Argentina*, 23(224), 258-278.
- 62. Estevao, B.S., Gallardo, A., Abalos, A., Díaz, Y., Álvarez, L., et al.** (2007). Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep from Patagonia. *Revista Argentina de Microbiología*, 39, 44-66.
- 63. Faeza, N.M.N., Jesse, F.F.A., Hambal, I.U., Odhah, M.N., Umer, M., Wessam, M.M.S., et al.** (2019). Responses of testosterone hormone concentration, semen quality, and its related proinflammatory cytokines in bucks following *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its mycolic acid infection. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 1855-1866.
- 64. Fontaine, M.** (2015). Caseous lymphadenitis in sheep. *The Moredun Foundation News Sheet*, 6(5).
- 65. Fontaine, M.C., y Baird, G.J.** (2008). Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*, 76, 42-48.
- 66. Gao, H., Ma, Y., Shao, Q., Hong, Q., Zheng, G., y Li, Z.** (2018). Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain KM01, isolated from the abscess of a goat in Kunming, China. *Genome Announc*, 6(11), e00013-18.
- 67. Guimarães, A.S., Seyffer, N., Bastos, B.L., Portela, R.W.D., Carmo, F.B., Meyer, R., Azevedo, V., et al.** (2009). Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of

- Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Ruminant Research*, 87, 86-91.
- 68. Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., y Thoen, C.O. (2008).** Pathogenesis of bacterial infections in animals. (3ra edición). John Wiley & Sons. USA.
- 69. Hao, T., Wu, D., Zhao, L., Wang, Q., Wang, E., y Sun, J. (2018).** The genome-scale integrated networks in microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 296.
- 70. Hassan, S.S., Schneider, M.P., Ramos, R.T., Carneiro, A.R., Ranieri, A., Guimarães, L.C., Ali, A., Bakhtiar, S.M., et al. (2012).** Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp162, isolated from camel. *Journal of Bacteriology*, 194(20), 5718-5719.
- 71. Hodgson, A.L., Tachedjian, M., Corner, L.A., y Radford, A.J. (1994).** Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, 62, 5275-5280.
- 72. House, R.W., Schousboe, M., Allen, J.P., y Grant, C.C. (1986).** *Corynebacterium ovis* (pseudo-tuberculosis) lymphadenitis in a sheep farmer: a new occupational disease in New Zealand. *The New Zealand Medical Journal*, 99(809), 659-662.
- 73. Hussain, R., Khaliq, S.A., Siddique, A.B., Khan, I.A., Hassan, M.F., y Younus, M. (2017).** Clinico-pathological and bacteriological studies on caseous lymphadenitis in small ruminants. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54, 437-442.
- 74. Huson, D., Rupp, R., y Scornavacca, C. (2010).** *Phylogenetic Networks. Concepts, Algorithms and Applications*. New York: Cambridge University Press.
- 75. Ibrahim, I.C., Dornelles, Parise, M.T., Parise, D., Tadra, M.Z., de Paula, T.L., Wattam, A.R., et al. (2019).** Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation. *BMC Genomics*, 20, 663.
- 76. Integrated DNA Technologies. (1911).** DNA sequencing. *Integrated DNA Technologies (IDT)*, 1-9.
- 77. Issa, N., Fatah, R., Taha, Z., Hussen, M., Kareem, K., Hamadamin, H., et al. (2021).** Prevalence and molecular investigation of caseous lymphadenitis among the slaughtered sheep at Duhok Abattoirs; experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in rabbits. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(2), 263-270.
- 78. Ivanovi, S., Zuti, M., Pavlovi, I., y Zujovi, M. (2009).** Caseous lymphadenitis in goats. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6), 999-1007.

- 79. Jesse, F.F.A., Odhah, M.N., Abbad, Y., Garba, B., Mahmood, Z., Hambali, I.U., Haron, A.W., et al.** (2020). Responses of female reproductive hormones and histopathology in the reproductive organs and associated lymph nodes of Boer does challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic corynomycolic acid Extract. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103852.
- 80. Jones, D., y Collins, M.D.** (1986). Irregular, nonsporing Gram-positive rods. En: Smeath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., y Holt J.G. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (pp. 1261-1282). Baltimore, USA: Williams and Wilkins.
- 81. Kaba, J., Kutschke, L., y Gerlach, G.F.** (2001). Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Veterinary Microbiology*, 78(2), 155-163.
- 82. Khamis, A., Raoult, D., y La Scola, B.** (2004). *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3925-3931.
- 83. Khamis, A., Raoult, D., y La Scola, B.** (2005). Comparison between *rpoB* and *16S* rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1934-1936.
- 84. Kolberg, M., Strand, K.R., Graff, P., y Andersson, K.K.** (2004). Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-proteins and Proteomics*, 1699(1), 1-34.
- 85. Kumaresan, G., Singh, D.D., Pawaiya, R., Andani, D., Gangwar, N.K., Mishra, A.K., Chaturvedi, V., y Kumar, A.** (2018). Investigation of an outbreak of caseous lymphadenitis in goats. *Indian Journal of Small Ruminants*, 24, 95-100.
- 86. Kwiatek, A., Mrozek, A., Bacal, P., Piekarowicz, A., y Adamczyk-Popławska, M.** (2015). Type III methyltransferase M. NgoAX from *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 regulates biofilm formation and interactions with human cells. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1426.
- 87. Li, H., Yang, H., Zhou, Z., Li, X., Yi, W., Xu, Y., Wang, Z., y Hu, S.** (2018). Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. *Small Ruminant Research*, 168, 69-75.
- 88. Listos, P., Gryzinska, M., Martychiewicz, M., Pointing, S., Barton, A., y Dylewska,**

- M. (2016). Caseous lymphadenitis in sheep in the Falkland Islands. *Acta Veterinaria*, 66(3), 406-412.
- 89. Literák, I.,** Horváthová, A., Jahnová, M., Rychlík, I., y Skalka, B. (1999). Phenotype and genotype characteristics of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 32, 107-111.
- 90. Lopes, T.,** Silva, A., Thiago, R., Carneiro, A., y Dorella, F.A. (2012). Complete Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp267, isolated from a llama. *Journal of Bacteriology*, 194, 3567-3568.
- 91. Mahmood, Z.K.H.,** Jesse, F.F., Saharee, A.A., Jasni, S., Yusoff, R., y 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.
- 92. Mandlik, A.,** Swierczynski, A., Das, A., y Ton-That, H. (2007). *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 64(1), 111-124.
- 93. Mandlik, A.,** Swierczynski, A., Das, A., y Ton-That, H. (2008). Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in Microbiology*, 16(1), 33-40.
- 94. Mao, C.,** Abraham, D., Wattam, A.R., Wilson, M.J., Shukla, M., Yoo, H.S., *et al.* (2014). Curation, integration and visualization of bacterial virulence factors in PATRIC. *Bioinformatics*, 31(2), 252-258.
- 95. McKean, S.C.,** Davies, J.K., y Moore, R.J. (2007). Expression of phospholipase D the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology*, 153, 2203-2211.
- 96. Menzies, P.I.,** Hwang, Y-T., y Prescott, J.F. (2004). Comparison of an interferon- γ phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*, 100, 129-137.
- 97. Miller, J.R.,** Koren, S., y Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 95, 315-27.

- 98. Minozzi, G., Mattiello, S., Grosso, L., Crepaldi, P., Chessa, S., y Pagnacco, G.** (2017). First insights in the genetics of caseous lymphadenitis in goats. *Italian Journal of Animal Science*, 16, 31-38.
- 99. Mowa, M.B.** (2009). Function and expression of class I ribonucleotide reductase small subunit-encoding genes in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* (doctoral dissertation).
- 100. Muller, B., de Klerk-Lorist, L.M., Henton, M.M., Lane, E., Parsons, S., Gey van Pittius, N.C., Kotze, A., van Helden, P.D., y Tanner, M.** (2011). Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Veterinary Microbiology*, 147(3-4), 340-345.
- 101. Muñoz, B.A.V., Cortés, P.Y.A., Arellano, R.B., Hernández, G.M., Hernández, C.R., y Díaz, A.E.** (2016). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from muscular abscesses in two horses: First report in Mexico. *Equine Veterinary Education*, 29(8), 431-435.
- 102. Nabih, A.M., Hussein, H.A., El-Wakeel, S.A., Abd El-Razik KA, y Gomaa, A.M.** (2018). *Corynebacterium pseudotuberculosis* mastitis in Egyptian dairy goats. *Veterinary World*, 11(11), 1574-1580.
- 103. Nassar, A.F., Miyashiro, S., Gregori, F., Piatti, R.M., Daniel, G.T., y 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.
- 104. Nassar, A.F.C., Daniel, G.T., Miyashiro, S., Ruiz, R., Scannapieco, E.M., de Souza, J., y Gregory, L.** (2015). Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, 1-6.
- 105. Nurbo, J., Roos, A.K., Muthas, D., Wahlström, E., Ericsson, D.J., Lundstedt, T., et al.** (2007). Design, synthesis and evaluation of peptide inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase. *Journal of Peptide Science*, 13(12), 822-832.
- 106. Odhah, M.N., Jesse, F.F.A., Lawan, A., Idris, U.H., Marza, A.D., Mahmood, Z.K., et al.** (2018). Responses of haptoglobin and serum amyloid A in goats

inoculated intradermally with *C. pseudotuberculosis* and mycolic acid extract immunogen. *Microbial Pathogenesis*, 117, 243-246.

107. **Odhah**, M.N., Jesse, F.F.A., Teik, C.E.L., Mahmood, Z., Wahid, H.A., Mohd, L.M.A., *et al.* (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.
108. **Ongay**, L.L., y Códiz, H.G. (2021). Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena Sanger. *Mensaje Bioquímico*, 45(2021), 23-34.
109. **Oliveira**, M., Barroco, C., Mottola, C., Santos, R., Lemsaddek, A., Tavares, L., y Semedo-Lemsaddek, T. (2014). First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *Veterinary Research*, 10, 218.
110. **Oreiby**, A.F. (2015). Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. *Small Ruminant Research*, 123, 160-166.
111. **O'Reilly**, K.M., Green, L.E., Malone, F.E., y Medley, G.F. (2008). Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, 83, 242-259.
112. **O'Reilly**, K.M., Medley, G.F., y Green, L.E. (2010). El control de la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en rebaños de ovejas: Un modelo matemático del impacto de la vacunación, pruebas serológicas, examen clínico y punción de abscesos. *Medicina veterinaria preventiva*, 95(1-2), 115-126.
113. **Osman**, A.Y., Abdullah, F., y Saharee, A.A. (2012). Sero-prevalence of Caseous lymphadenitis evaluated by agar gel precipitation test among small ruminant flocks in east coast economic regions in Peninsular Malaysia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11, 3474-3480.
114. **Osman**, A.Y., Nordin, M.L., Kadir, A.A., y Saharee, A.A. (2018). The epidemiology and pathophysiology of caseous lymphadenitis: A review. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 5(3), 1129.
115. **Othman**, A.M., Abba, Y., Jesse, A., Ilyasu, Y.M., Saharee, A.A., Haron, A.W., *et al.* (2016). Reproductive pathological changes associated with experimental subchronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in nonpregnant Boer

Does. *Journal of Pathogens*, 7.

116. **Pacheco**, L.G.G., Pena, R.R., Castro, T.L.P., *et al.* (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.
117. **Pacheco**, L.G., Castro, T.L., Carvalho, R.D., Moraes, P.M., Dorella, F.A., Carvalho, N.B., Slade, S.E., Scrivens, J.H., Feelisch, M., Meyer, R., *et al.* (2012). A role for Sigma factor $\sigma(E)$ in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/peroxide stress. *Frontiers in Microbiology*, 3, 126.
118. **Pacheco**, L.G.C, Slade, S.E, Seyffert, N., Santos, A.R., y Castro, T.L.P. (2011). A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *BMC Microbiology*, 11: 12.
119. **Parin**, U., Kirkan, S., Ural, K., Savasan, S., Erbas, G., Gultekin, M., Yuksel, H., *et al.* (2018). Molecular identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Acta Veterinaria Brno*, 87, 3-8.
120. **Parise**, D., Parise, M.T.D., Viana, M.V.C., Muñoz, B.A.V., Cortés, P.Y.A., Arellano, R.B., *et al.* (2018). First genome sequencing and comparative analyses of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains from Mexico. *Standards in Genomic Sciences*, 13, 21.
121. **Pascual**, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A., Gimenez, M.N., y Collins, M.D. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on *16S* rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 724-728.
122. **Paton**, M.W., Rose, I.R., Hart, R.A., Sutherland, S.S., Mercy, A.R., y Ellis, T.M., (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Australian Veterinary Journal*, 71, 47-49.
123. **Paton**, M.W, Rose, I.R, Hart, R.A, Sutherland, S.S, Mercy, A.R, y Ellis, T. (1996). Post-shearing management affects the seroincidence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 26(3-4), 275-284.
124. **Paton**, M.W., Walker, S.B., Rose, I.R., y Watt, G.F. (2003). Prevalence of Caseous lymphadenitis and usage of Caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Veterinary Journal*, 81, 91-95.

125. **Pavan**, M.E., Robles, C.A., Cairo, F.M., Marcellino, R., Pettinari, M.J. (2012). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). *Research in Veterinary Science*, 92, 202-206.
126. **Peña**, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265-267.
127. **Pinto**, A.C., Caracciolo, G., de Sá P.H., Ramos, R.T.J., Barbosa, S., Barbosa, H.P.M., Ribeiro, A.C., *et al.* (2014). Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics*, 15, 14.
128. **Ramos**, R. T.J., Carneiro, A.R., Soares, S.de C., Santos, A.R. dos, Almeida, S., Guimarães, L., Figueira, F., Barbosa, E., Tauch, A., Azevedo, V., y Silva, A. (2013). Tips and tricks for the assembly of *Corynebacterium pseudotuberculosis* genome using a semiconductor sequencer. *Microbial Biotechnology*, 6(2), 150-156.
129. **Renaud**, F.N., Le, Coustumier, A., Wlhem, N., Aubel, D., Riegel, P., Bollet, C., y Freney, J. (2007). *Corynebacterium hansenii* sp. nov., an H-glucosidase–negative bacterium related to *Corynebacterium xerosis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1113-1116.
130. **Renshaw**, H.W., Graff, V.P., y Gates, N.L. (1979). Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Moraxella* spp from internal abscesses in emaciated ewes. *American Journal of Veterinary Research*, 40, 1110-1114.
131. **Retamal**, P., Ríos, M., Cheuquepán, F., Abalos, P., Pizarro-Lucero, J., Borie, C., y Gutiérrez J. (2011). Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis rpoB* gene sequence. *Veterinary Microbiology*, 151: 400-3.
132. **Rizvi**, S., Green, L.E., y Glover, M.J. (1997). Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Veterinary Record*, 140, 586-587.
133. **Ruiz**, J.C., D'Afonseca, V., Silva, A., Ali, A., Pinto, A.C., Santos, A.R., Rocha, A.A.M.C., Lopes, D.O. Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C. Costa, M.P., *et al.* (2011). Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*, 6, e18551.
134. **Sá**, M. da C.A. de., Gouveia, G.V., Krewer, C. da C., Veschi, J.L.A., Mattos-

- Guaraldi, A.L. de., y Costa, M.M. da. (2013). Distribution of *PLD* and *FagA*, *B*, *C* and *D* genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 265-268.
135. Saitou, N. y Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
136. Sangal, V., Fineran, P.C., y Hoskisson, P.A. (2013). Novel configurations of type I and II CRISPR–Cas systems in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology*, 159(10), 2118-26.
137. Sanger, F., y Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448.
138. Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
139. Schiffler, B., Barth, E., Daff'e, M., y Benz, R. (2007). *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of channel-forming protein in the cell wall. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7709-7719.
140. Schreuder, B.E., Ter Laak, E.A., y De Gee, A.L. (1990). *Corynebacterium pseudotuberculosis* in milk of CL affected goats. *Veterinary Record*. 127(15), 387.
141. Seyffert, N., Guimarães, A.S., Pacheco, L.G.C., Portela, R.W., Bastos, B.L., Dorella, F.A., *et al.* (2010). High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Research in Veterinary Science*, 88, 50-55.
142. Silva, A., Schneider, M.P.C., Cerdeira, L., Barbosa, M.S., y Ramos, R.T.J. (2011). Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. *Journal of Bacteriology*, 193, 323-324.
143. Silva, W. M., Dorella, F.A., Soares, S.C., Souza, G.H.M., Castro, T.L.P., Seyffert, N., Figueiredo, H., *et al.* (2017). A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. *BMC Microbiology*, 17, 55.
144. Soares, S.C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., *et al.* (2013). The Pan-

genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar *ovis* and *equi* strains. *PLOS ONE*, 8, e53818.

145. **Soares**, S.C., Abreu, V.A.C., Ramos, R.T.J., Cerdeira, L., Silva, A., Baumbach, J., Trost, E., Tauch, A., Hirata Jr., R., Mattos-Guaraldi, A.L., Miyoshi, A., y Azevedo, V. (2012). PIPS: Pathogenicity Island Prediction Software. *PLoS ONE*, 7(2), e30848.
146. **Songer**, J.G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*, 5, 156-160.
147. **Sprake**, P., y Gold, J.R. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis* liver abscess in a mature alpaca (*Lama pacos*). *The Canadian Veterinary Journal*, 53, 387-390.
148. **Tamura**, K., Stecher, G., y Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
149. **Tan**, A., Hill, D.M., Harrison, O.B., Srikhanta, Y.N., Jennings, M.P., Maiden, M.C., *et al.* (2016). Distribution of the type III DNA methyltransferases *modA*, *modB* and *modD* among *Neisseria meningitidis* genotypes: implications for gene regulation and virulence. *Scientific Reports*, 6, 21015.
150. **Telles**, G.P., Araújo, G.S., Walter, M.E.M.T., Brigido, M.M., y Almeida, N.F. (2018). Live Neighbor-Joining. *BMC Bioinformatics*, 19, 172.
151. **Tiwari**, S., da Costa, M.P., Almeida, S., Hassan, S.S., Jamal, S.B., Oliveira, A., Folador, E.L., Rocha, F., de Abreu, V.A., Dorella, F., *et al.* (2014). *C. pseudotuberculosis* *Phop* confers virulence and may be targeted by natural compounds. *Integrative Biology*, 6(11), 1088-1099.
152. **Thongkwow**, S., Poosiripinyo, N., Pongkornkumpon, N., Saengsakchai, S., Klinkhiew, N., Chalatan, T., Kanistanon, K., Lerk-u-suke, S., y Rerkyusuke, S. (2019). Distribution and risk factors of clinical caseous lymphadenitis in small-holder goat herds in Northeastern Thailand. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 49, 343-351.
153. **Trost**, E., Ott, L., Schneider, J., Schröder, J., Jaenicke, S., Goesmann, A., Husemann, P., Stoye, J. Dorella, F.A., Rocha, F.S., *et al.* (2010). The complete

genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, 11, 728.

154. **Varela**, G.J.A., Montes de Oca, J.R., Acosta, D.J., Hernández, L.F., Morales, E.V., y Monroy, S.H.G. (2018). Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in México. *Microbial Pathogenesis*, 117, 304-309.
155. **Viana**, M.V.C., Figueiredo, H., Ramos, R., Guimares, L.C., Pereira, F.L., Dorella, F.A., Salah, A., *et al.* (2017). Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. *PLoS ONE*, 12(4), e0176347.
156. **Von-Graevenitz**, A. y Bernard, K. (2006). The Genus *Corynebacterium*-Medical. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes*. (pp. 819-842). New York, USA: Springer.
157. **Wernery**, U., y Kinne, J. (2016). Caseous Lymphadenitis (Pseudotuberculosis) in Camelids: A Review. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 3(1), 1022.
158. **Williamson**, L.H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America*, 17(2), 359-371.
159. **Windsor**, P.A. (2011). Control of Caseous Lymphadenitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27(1), 193-202.
160. **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*, 5, 11-22.
161. **Windsor**, P.A., y Bush, R.D. (2016). Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? *Small Ruminant Research*, 142, 6-10.
162. **Yitagesu**, E., Alemnew, E., Olani, A., Asfaw, T., y Demis, C. (2020). Survival analysis of clinical cases of Caseous lymphadenitis of goats in North Shoa, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2020.
163. **Zhang**, S., Dao, X., Li, Y., Ma, Y., y Yang, F. (2019). Isolation and identification of etiological bacteria of subcutaneous abscess in goats. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 46(3), 949-956.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* de ovejas y cabras del estado de Jalisco.

Identificación	Estado	Municipio	Localidad	Condición corporal	Hospedero	Raza	Sexo	Tipo de exudado
2J	Jalisco	San Juan de los Lagos	El Sauz	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Sanguinolento
6J	Jalisco	San Juan de los Lagos	El Sauz	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seropurulento
7J	Jalisco	San Juan de los Lagos	El Sauz	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Caseoso
32J	Jalisco	Zapopan	Tesistan	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seropurulento
36A	Jalisco	Zapopan	Tesistan	Buena	Ovino	Black Belly	M	Caseoso
41A	Jalisco	Zapopan	Nestipac	Buena	Ovino	Cruza	H	Caseoso
45A	Jalisco	El Salto	El Salto	Buena	Ovino	Pelifolk	M	Caseoso
50A	Jalisco	El Salto	El Salto	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seropurulento
56A	Jalisco	El Grullo	El Aguacate	Buena	Ovino	Pelifolk	M	Caseoso
58A	Jalisco	El Grullo		Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seropurulento
61A	Jalisco	Zapotlanejo	Purísima	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Caseoso
38-55-J	Jalisco	Arandas	Arandas	Buena	Ovino	Pelifolk	M	Seropurulento
005	Jalisco	Zapotlanejo	El Trapiche	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Caseoso
006	Jalisco	Zapotlanejo	El Trapiche	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Sanguinolento
019	Jalisco	Zapopan	Tesistan	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Purulento
030	Jalisco	Zapopan	Tesistan	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Purulento
033B	Jalisco	Zapotlanejo	Tesistan	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seroso
039	Jalisco	Zapopan	Tesistan	Buena	Ovino	Black Belly	H	Purulento
047	Jalisco	Zapopan	La Mojonera	Buena	Ovino	Pelibuey	H	Purulento
1-6	Jalisco	Zapotlanejo	Santa Fé	Buena	Caprino	Saanen	H	Seropurulento
2-4	Jalisco	Zapotlanejo	Santa Fé	Buena	Caprino	Alpina	H	Seropurulento
1-2-2LJ	Jalisco	Zapotlanejo	Santa Fé	Buena	Caprino	Saanen	H	Seropurulento
1-6-2L-J	Jalisco	Zapotlanejo	Tauquilla	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seropurulento
1-19-2L-J	Jalisco	Zapotlanejo	Tauquilla	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seropurulento
3612PK	Jalisco	Tepatitlan	Capilla de Milpillás	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seropurulento
585790	Jalisco	Tepatitlan	Capilla de Milpillás	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seropurulento
632935	Jalisco	Zapotlanejo	Lomas de San Juan	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Caseoso
728930	Jalisco	Tepatitlan	Capilla de Milpillás	Buena	Ovino	Black Belly	H	Seropurulento
9575R	Jalisco	Tlapeaque	Santa Anita	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Seroso
H14X	Jalisco	Tepatitlan	Capilla de Milpillás	Buena	Ovino	Pelifolk	H	Purulento

Anexo 2. Envío de artículo científico a revista indexada. Título: Diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* mediante PCR Cuádruplex en rebaños ovinos y caprinos del estado de Jalisco. Autores: Luis Donaldo Antúnez Núñez, Roberto Montes de Oca Jiménez, Valente Velázquez Ordoñez, Maria Carla Rodríguez Domínguez.

The screenshot shows the journal's submission interface. At the top, the journal title "Tropical and Subtropical Agroecosystems" is displayed. A navigation menu includes links for HOME, ABOUT, USER HOME, SEARCH, CURRENT, ARCHIVES, and ANNOUNCEMENTS. The page is for article #4904, with a breadcrumb trail: Home > User > Author > Submissions > #4904 > Summary.

On the left sidebar, there are utility sections: "LANGUAGE" with a dropdown set to "English" and a "Submit" button; "FONT SIZE" with icons for adjusting text size; "OPEN JOURNAL SYSTEMS"; "INFORMATION" with links for Readers, Authors, and Librarians; "Signatory of DORA" and "San Francisco Declaration on Research Assessment"; and "Additional classification systems or journal metrics that include TSAES" with a note in Spanish: "[Sistemas adicionales de clasificación o métricas de revistas que incluyen a TSAES]". At the bottom left is the "CONACYT-Mexico" logo.

The main content area is titled "#4904 Summary" and includes tabs for "SUMMARY", "REVIEW", and "EDITING". The article title is "Submission". The authors listed are Luis Donaldo Antúnez Núñez, Roberto Montes de Oca Jiménez, and Valente Velázquez Ordoñez, Maria Carla Rodríguez Domínguez. The title of the submission is "DIAGNÓSTICO DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* BIOVAR *Ovis* MEDIANTE PCR CUÁDRUPLEX EN REBAÑOS OVINOS Y CAPRINOS DEL ESTADO DE JALISCO".

Metadata includes: Original file (4904-21533-1-SM.DOCX, 2023-04-15), Supp. files (4904-21534-1-SR.PDF, 2023-04-15, with a link to "ADD A SUPPLEMENTARY FILE"), Submitter (Roberto Montes de Oca Jiménez), Date submitted (April 15, 2023 - 10:32 PM), Section (Research Papers), and Editor (None assigned).

The "Status" section shows: Status (Awaiting assignment), Initiated (2023-04-15), and Last modified (2023-04-15).

At the bottom of the main content area is the "Submission Metadata" section. On the right sidebar, there are sections for "USER" (logged in as robertomontes with links for My Journals, My Profile, and Log Out), "AUTHOR" (Submissions: Active (2), Archive (0), New Submission), and "JOURNAL CONTENT" (Search bar, Search Scope dropdown set to "All", and Browse options: By Issue, By Author, By Title, By Sections, Other Journals).

The journal's name "Tropical and Subtropical Agroecosystems" is repeated at the bottom right of the page.