



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Corynebacterium
pseudotuberculosis* AISLADOS DE MUESTRAS DE CASOS
CLÍNICOS DE LINFADENITIS CASEOSA EN OVINOS Y
CAPRINOS

TESIS

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

PRESENTA:

FERNANDO HERNÁNDEZ LEÓN

El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México diciembre de 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Corynebacterium
pseudotuberculosis* AISLADOS DE MUESTRAS DE CASOS
CLÍNICOS DE LINFADENITIS CASEOSA EN OVINOS Y
CAPRINOS

TESIS

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

PRESENTA:

FERNANDO HERNÁNDEZ LEÓN

COMITÉ DE TUTORES

Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez. Tutor Académico

Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat. Tutor Adjunto

Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán.

El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México diciembre de 2015.

DEDICATORIAS

A mis padres, por haberme brindado la oportunidad y el apoyo económico para cursar con muchos esfuerzos una Licenciatura, fue el primer paso para estar ahora en un posgrado. Los amo.

A mis Hermanos, que creen en mi capacidad para lograr mis objetivos y siempre son un apoyo indiscutible.

A mis amigos, por hacer los días más estresantes en momentos inolvidables.

A mis Tutores: Dr. Roberto Montes de Oca, Dr. Jorge Pablo Acosta y Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán por brindarme la oportunidad de desarrollar esta investigación y creer en mi capacidad para llevarla a cabo; además del valioso aprendizaje que siempre me brindaron.

RESUMEN

Caracterización Molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* Aislados de Muestras de Casos Clínicos de Linfadenitis Caseosa en Ovinos y Caprinos

La Linfadenitis caseosa (LC) o pseudotuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa, de evolución crónica, causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Debido a su curso crónico y poca respuesta al tratamiento es difícil erradicar la infección una vez que se establece. Por ello, las estrategias para establecer los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad deben ser integrales. Algunos de los aspectos limitantes para el control de LC es que no existen pruebas de diagnóstico suficientemente sensibles y específicas para establecer el diagnóstico en la fase precoz y fase clínica visceral; además, las vacunas y bacterinas no han arrojado resultados satisfactorios en modelos de animales experimentales. En investigaciones previas se han aislado cepas de diferentes lesiones que afectan a cabras y ovinos, estas han sido secuenciadas totalmente o parte de sus genes. Sin embargo, hasta ahora en México no existe un estudio establecido donde se identifique mediante técnicas moleculares y filogenéticas las cepas circulantes en nuestras explotaciones y por tanto no se sabe si la enfermedad es sub-diagnosticada. En el presente estudio se partió de 69 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* para realizar la identificación bacteriológica, bioquímica y molecular, se utilizaron pruebas bacteriológicas y bioquímicas convencionales, un Kit comercial Api Coryne, PCR Multiplex con los genes *16s*, *rpoB* y *pld* e identificación por PCR punto final genes involucrados en la virulencia y patogenicidad *Fag A*, *Fag B*, *Fag C* y *Fag D* además de un análisis filogenético basado en la secuencia parcial del gen *rpoB*. Se logró caracterizar fenotípica y genotípicamente el 86.95% (60/69) de los aislados de campo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, además de identificar en el 98.3 % (59/60) de los aislados los genes involucrados en la virulencia y patogenicidad. Se logró identificar el 100% (60/60) de los aislamientos mediante el análisis filogenético la

especie y subespecie a la que pertenecen. Además se logró identificar por primera vez un aislado de *C. xerosis* en un absceso cutáneo de ovino.

Palabras clave: Linfadenitis caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, PCR Multiplex, Análisis filogenético.

SUMMARY

The caseous lymphadenitis (CL) or paratuberculosis is an infectious chronic disease, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Due to its chronic course and poor treatment response it's difficult to eradicate the infection once it is set. Therefore, strategies to establish prevention, control and eradication programs for the disease must be comprehensive. Some of the limiting factors for controlling CL is that there are no sufficiently sensitive and specific diagnostic tests in early clinical and visceral phases; in addition, vaccines and bacterins have not yielded satisfactory results in experimental animal models. In previous investigations strains have been isolated from different lesions that affect goats and sheep, isolates genes have been completely or partially sequenced. However, until now there is no a well-established study where CL can be identified through molecular and phylogenetic techniques for the circulating strains in our farms and therefore, it is not known if the disease is sub-diagnosed in Mexico. In the present study 69 isolates were conducted for *C. pseudotuberculosis* to perform bacteriological, biochemistry and molecular identification, We used for the conventional bacteriological and biochemical tests, an API Coryne commercial kit, Multiplex PCR for the *16s*, *rpoB* and *pld* genes, genes involved in the pathogenicity and virulence *Fag A*, *Fag B*, *Fag C* and *D* were identified by end point PCR, additionally, a phylogenetic analysis based on the partial sequence of the *rpoB* gene. Phenotypic and genotypic characterization was achieved for 86.95 % (60/69) of the field isolates for *Corynebacterium pseudotuberculosis*, moreover the identification of 98.3 % (59/60) of the isolated genes involved in virulence and pathogenicity. We achieved identify 100% (60/60) of all isolates through phylogenetic analysis the species and subspecies to which they belong. Additionally we identified for the first time a *C. xerosis* isolate in sheep skin abscess of.

Key Words: *caseous lymphadenitis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Multiplex PCR, phylogenetic analysis.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México por favorecer mi crecimiento como profesionista y persona.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), por el conocimiento adquirido con su cuerpo Académico e Instalaciones.

Al CONACYT, por el apoyo como becario dentro de Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Al PCARN por su apoyo en todos trámites y documentos semestre a semestre.

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento recibido por parte del proyecto con Financiamiento UAEM intitulado “**Epidemiología, aislamiento y caracterización molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en cuadros clínicos de Linfadenitis caseosa en ovinos en sistema de producción intensiva: aspectos epidemiológicos y microbiológicos**” con clave: 3249/2012U, y el proyecto intitulado **Identificación de genes de patogenicidad de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y desarrollo de una bacterina multicomponente**, ambos bajo la responsabilidad del Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez.

INDICE

DEDICATORIAS.....	i
RESUMEN.....	ii
SUMMARY	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	4
Taxonomía.....	5
Inmunopatogénesis.....	6
Prevalencia.....	10
Importancia económica	12
Diagnóstico.....	12
Diagnóstico molecular	15
Secuenciación del gen <i>16s</i>	15
Secuenciación del gen <i>rpoB</i>	16
Secuenciación o identificación del gen <i>pld</i>	16
Secuenciación completa del genoma	17
Genes, proteínas y vacunas	17
Estudios recientes	20
Variaciones genotípicas encontradas	24
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	28
HIPOTESIS	29
MATERIAL Y METODOS.....	30
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN	52

CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Genes de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> depositados en el Gen Pept (NCBI)	19
Cuadro 2 Lista de las 11 nuevas proteínas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	23
Cuadro 3 Cepas de referencia Gen Bank (NCBI) utilizadas en el presente estudio.	37
Cuadro 4 Tamaño del absceso y aislamientos obtenidos en ovinos y caprinos del Estado de Jalisco, México.	39
Cuadro 5 Resultado Bacteriológico por tipo de exudado de abscesos cutáneos en ovinos y caprinos del estado de Jalisco, México.	40
Cuadro 6 Aislamientos por categoría y región anatómica de abscesos cutáneos en ovinos del Estado de Jalisco, México.	40
Cuadro 7 Perfiles bioquímicos en el sistema Api coryne. Aislamientos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> obtenidos de abscesos ovinos y caprinos	42
Cuadro 8 Variaciones en Nitrato.	43
Cuadro 9 Variación de los genes en el PCR Multiplex.....	46
Cuadro 10 Aislamientos que no amplificaron genes de virulencia	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Extracción de ADN	31
Figura 2 Morfología. Colonia de aislado de <i>C. pseudotuberculosis</i>	38
Figura 3 Aislado de <i>Corynebacterium</i> spp. Crecimiento colonias amarillas.....	38
Figura 4 Tipos de exudado obtenidos de abscesos cutáneos en ovinos y caprinos del Estado de Jalisco, México.	39
Figura 5 PCR Multiplex.....	44
Figura 6 PCR Multiplex. Variación en la amplificación del gen 16S.	44
Figura 7 PCR Multiplex. Variación en la amplificación del gen 16s.	45
Figura 8 PCR Multiplex. Aislado con crecimiento pardo amarillento	45
Figura 9 PCR Multiplex. Genes de virulencia Fag C-D y Fag A	47
Figura 10 PCR sencillo. Gen de virulencia Fag B. Gel agarosa 2 %.	47
Figura 11 Porcentajes de Similitud del BLAST Gen Bank (NCBI) del gen <i>rpoB</i> de aislados de <i>C. pseudotuberculosis</i>	49
Figura 12 Porcentajes de Similitud del BLAST Gen Bank (NCBI) del gen <i>rpoB</i> del aislado de <i>Corynebacterium xerosis</i>	49
Figura 13 Árbol filogenético mediante el método Neighbor-joining.....	51

INTRODUCCIÓN

La linfadenitis caseosa es una enfermedad infectocontagiosa de las ovejas y cabras, generando además abscesos y granulomas cutáneos en equinos y bovinos y representa una zoonosis importante (Anderson *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2006; Join-Lambert *et al.*, 2006;). Esta enfermedad es de curso crónico, comportamiento enzoótico, Es causada por la bacteria Gram positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*. La enfermedad se caracteriza por la formación de abscesos en nódulos linfáticos, piel y diversos órganos internos en pequeños rumiantes (Baird y Fontaine, 2007; Pekelder, 2000; Robles, 2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* es una bacteria Gram-positiva, mesófila, patógeno intracelular facultativo que pertenece al grupo llamado CMNR (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia-Rodococcus*). La característica más distintiva de esta bacteria es su composición única de envoltura celular, caracterizada por la presencia de largas cadenas de ácidos grasos, conocidos como ácidos micólicos en la superficie de la célula; además de una exotoxina fosfolipasa D como su principal factor de virulencia (Dorella *et al.*, 2006). La distribución de *Corynebacterium pseudotuberculosis* es mundial en granjas de pequeños rumiantes (Ruiz *et al.*, 2007). Debido a su curso crónico y poca respuesta al tratamiento, es difícil erradicar la infección una vez que se establece (Baird y Fontaine, 2007; Dorella *et al.*, 2006; Williamson, 2001;). Esto conduce a severas pérdidas económicas por la disminución en la producción de carne (Baird y Fontaine, 2007; Pekelder, 2000).

Los determinantes genéticos de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no han sido suficientemente estudiados. La mayoría de esos factores codifican o modifican la expresión de genes relacionados a virulencia, por lo que pueden ser usados como blancos potenciales para el desarrollo de vacunas o para diagnóstico (Dorella *et al.*, 2006). Las técnicas diagnósticas para *Corynebacterium pseudotuberculosis* se basan principalmente en un examen

clínico de las lesiones y la identificación mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas que tienden a ser problemáticas por la variabilidad de las características bioquímicas del género *Corynebacterium* (Cetinkaya *et al.*, 2002; Dorella *et al.*, 2006; D'Afonseca *et al.*, 2008); también existen diversas pruebas serológicas (ELISAs) que tienen el inconveniente de una baja eficiencia, ya que no son capaces de discriminar entre animales previamente expuestos de aquellos que mantienen el estado de portador (Pacheco *et al.*, 2007). Recientemente se han sugerido la utilización de PCR que simplificaría la identificación de los cultivos de esta especie bacteriana; la utilización del PCR basados en el gen 16 s de RNA ribosomal para el diagnóstico en ovinos y caprinos (Cetinkaya *et al.*, 2002) el gen de la fosfolipasa D (*pld*) y el gen *rpoB* los cuales utilizados en conjunto resulta en un PCR de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficacia en el diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.*, 2007).

Los determinantes de virulencia más estudiados en *Corynebacterium pseudotuberculosis* son: la proteína PLD (fosfolipasa D), una exoproteína que promueve la difusión del patógeno mediante la activación de la permeabilización vascular, hemólisis, y la interrupción de la membrana, el operon *fagABC* y el gen *fagD*, ambos juegan un rol en la virulencia de la bacteria o la alta concentración de lípidos en la pared celular, los cuales hacen que el microorganismo resistan la digestión por enzimas celulares y así persistan como parásitos intracelulares facultativos y la proteína CP40 identificada como inmunógena que exhibe actividad proteolítica (Pinto *et al.*, 2014). Debido a la gran importancia de *C. pseudotuberculosis* en veterinaria, y teniendo en cuenta la ineficacia de los antibióticos, varias vacunas se han desarrollado, incluyendo el uso de bacterias atenuadas o inactivadas, fracciones de la pared celular y las vacunas de ADN (Dorella *et al.*, 2009). Las vacunas actuales se basan principalmente en la inactivación con formalina de la fosfolipasa D (PLD) (Hodgson *et al.*, 1999; Selvy *et al.*, 2011).

La Linfadenitis Caseosa (LC) Es una enfermedad que afecta considerablemente las explotaciones ovinas y caprinas, causando pérdidas económicas al disminuir la productividad de los animales, además del potencial zoonótico que representa. Sin embargo en México la enfermedad no se ha estudiado completamente ya que no se tienen datos precisos de la prevalencia en los rebaños y el diagnóstico de esta enfermedad se basa solo en la evaluación macroscópica y aislamiento en etapas tardías de la infección. Por lo cual, es de suma importancia conocer las técnicas diagnósticas precisas para la identificación del agente causal y mediante esto poder conocer las características genotípicas y variantes antigénicas para realizar estudios sobre ciertos antígenos que pudieran ser candidatos en la elaboración de vacunas capaces de proteger a los animales y poder aspirar a controlar y erradicar la enfermedad, contribuyendo en la salud pública y la economía del país.

ANTECEDENTES

Las lesiones abscedativas en piel y ganglios linfáticos superficiales pueden ser ocasionadas por gran variedad de agentes, *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).

La Linfadenitis caseosa o pseudotuberculosis, es una enfermedad bacteriana de curso crónico que afecta a ovinos y caprinos (Aleman y Spier, 2001). Causa pérdida de peso crónico y progresivo con la consiguiente disminución en la producción de carne, leche y lana (Patón *et al.*, 1994). La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de lesiones supurativas necrotizantes a manera de abscesos en piel, nódulos linfáticos y vísceras (Baird y Fontaine, 2007).

El agente causal de la LAC es *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*; *Corynebacterium pseudotuberculosis* es una bacteria Gram-positiva, mesófila, patógeno intracelular facultativo que pertenece al grupo llamado CMNR (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia-Rodococcus*). La mejor característica distintiva de esta bacteria es su composición única de envoltura celular, caracterizada por la presencia de largas cadenas de ácidos grasos, conocidos como ácidos micólicos en la superficie de la célula (Dorella, 2006). *C. pseudotuberculosis* ha sido aislada de ganado bovino y caballos produciendo cuadros de linfangitis ulcerativa (Aleman *et al.*, 1996; Spier and Whitcomb, 2007). También ha sido reportada la infección en camélidos, búfalos y raramente en humanos (Anderson *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2006; Join-Lambert *et al.*, 2006; Peel *et al.*, 1997; Selim, 2001). Su crecimiento es relativamente lento, crece adecuadamente en medios de gelosa sangre y produce colonias a las 24 horas a una temperatura de 37°C, las colonias tienen un diámetro de 2 mm de color crema

y están rodeadas de una zona de hemólisis incompleta. Es una bacteria anaerobia facultativa, catalasa y ureasa positiva que fermenta la glucosa, galactosa, maltosa y manosa. El biotipo *ovis* no reduce los nitratos a diferencia de los aislados de equinos. Es sensible a la kanamicina, sulfonamidas, tetraciclinas, ampicilina, eritromicina y resistente a la estreptomina (Judson y Songer, 1991).

Taxonomía

En 1888, el bacteriólogo French Edward Nocard aisló un organismo inusual de un caso de linfangitis en una vaca, 3 años después el bacteriólogo Búlgaro Hugo Von Preisz identificó una bacteria similar en un cultivo de abscesos renales en una oveja. Como consecuencia de estos descubrimientos relacionados, el organismo en cuestión se nombró como bacilo “Preiszi-Nocard”, un nombre vulgar con el que ha estado vinculado desde entonces (Baird y Fontaine, 2007). Ya en 1918 Ebersson sugirió clasificarlo renombrándolo como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Con la edición del *Manual Bergey* muchas de las discrepancias fueron solucionadas denominándose en 1923 como *Corynebacterium ovis*. Con la salida de la 6ta edición del *Manual Bergey* en 1948, el nombre oficial cambió a *Corynebacterium pseudotuberculosis* que en la actualidad resulta el término correcto para su denominación (Merchant y Parcker, 1980; Brown y Olander, 1987; Baird y Fontaine, 2007).

La clasificación de *C. pseudotuberculosis* se estableció inicialmente mediante morfología y características bioquímicas (Jones y Collins, 1986; Muckle y Gyles, 1982). La producción de nitrato reductasa fue utilizado para distinguir la *biovar equi* (aislado de caballos y bovinos; nitrato reducción positiva) de la *biovar ovis* (aislado de ovejas y cabras; nitrato reducción negativa) (Biberstein *et al.*, 1971). Más tarde, se llegó a la misma conclusión con endonucleasa de restricción (EcoRV y PstI) analizando el ADN cromosómico, y basados en los datos de reducción de nitrato (Songer *et al.*, 1988).

Más recientemente, también se observó el mismo resultado con la longitud de los fragmentos de restricción del polimorfismo del 16S-rDNA (Costa *et al.*, 1998; Sutherland *et al.*, 1996; Vaneechoutte *et al.*, 1995). Connor *et al.*, (2000) utilizó la electroforesis en gel de campo pulsado, asociado con el análisis bioquímico, para la caracterización de los aislados de *C. pseudotuberculosis*. Una estrecha relación entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* fue sugerida por el hecho de que estos organismos son únicos entre las Corynebacterias en la producción de fosfolipasa D (Buck *et al.*, 1985; Groman *et al.*, 1984). Por otra parte, algunas cepas de *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis* pueden producir toxina diftérica (DT). Además, algunas cepas no toxigénicas se convierten en toxigénicas (producción DT) por β -fagos de ocratoxinógenos de *C. diphtheriae* (Buck *et al.*, 1985; Groman *et al.*, 1984; Cianciotto *et al.*, 1985; Cianciotto *et al.*, 1986).

Métodos moleculares, incluyendo hibridación de ácidos nucleicos y análisis de la secuencia del gen rRNA 16s, se han utilizado para determinar el grado de relación entre diferentes cepas y especies de Corynebacterias (Riegel *et al.*, 1995; Hou *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1997; Khamis *et al.*, 2005;). Riegel *et al.*, (1995) encontraron que algunas cepas de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* pertenecen a un grupo monofilético, basado en el análisis filogenético de la secuencia de la pequeña subunidad de ADNr que sólo se encuentran en el grupo de CMN. También concluyeron que los biotipos *equi* y *ovis* de *C. pseudotuberculosis* no deben ser clasificadas como subespecies, debido a su alta similitud genómica.

Inmunopatogénesis

La patogénesis de CLA en las ovejas y cabras se inicia como una infección primaria de la herida, con la diseminación hematogena y linfática, seguida por la infección secundaria de los ganglios linfáticos y diversos órganos viscerales. Esto es seguido por la eliminación o contención de la infección, esta última se presenta como característica lesiones caseosas (Lopes *et al.*, 2012).

Los pasos de la infección se han separado en las siguientes fases: una fase inicial (días 1-4), caracterizada por el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de inoculación y el drenaje de los nódulos linfáticos; una fase de amplificación (5-10 días), caracterizada por el desarrollo de piogranuloma, y una fase de estabilización, que se caracteriza por la maduración y la persistencia del piogranuloma (Pepin *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2012).

Los factores bacterianos, incluyendo PLD y lípidos citotóxicos, contribuyen a la patogénesis a un nivel local, pero tienen poco efecto sobre la enfermedad sistémica. Después de que *C. pseudotuberculosis* es capturado por las células fagocíticas, tales como los neutrófilos y los macrófagos, los fagosomas se fusiona con el lisosoma, formando así el fagolisosoma (Batey, 1986). Sin embargo, *C. pseudotuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo que es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos por más de 48 horas. Esta habilidad de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir dentro de este nicho intracelular está relacionada con la composición lipídica de su pared celular, esencialmente ácidos corynomicólicos, existiendo una correlación positiva entre el contenido de estos lípidos y la habilidad de producir lesiones en ganglios poplíteos de oveja. Los lípidos de la pared celular constituyen un factor piogénico, relacionado con la infiltración masiva con leucocitos polimorfonucleares, que transportan las bacterias a los nódulos linfáticos, y con el efecto citotóxico que destruye a los fagocitos (Brown y Olander, 1987; Aleman y Spier, 2001). Durante ese tiempo, las bacterias se liberan como resultado de un proceso que conduce a la muerte de los fagocitos, aunque esta propiedad varía entre las diferentes cepas. Los mecanismos específicos de la muerte celular causada por *C. pseudotuberculosis* aún no están claros, ya que no induce la autofagia o la apoptosis de los macrófagos. Esto ha sido demostrado en líneas celulares de macrófagos murinos, como se evidencia por los niveles estables de la proteína I asociada a los microtúbulos de la cadena ligera 3 (MAP LC3-I) y la actividad de la caspasa-3 y la ausencia de fragmentación nuclear en los macrófagos infectados (Stefańska *et al.*,

2010). Las bacterias sobreviven dentro de los macrófagos debido a que algunos macrófagos no pueden producir óxido nítrico en respuesta a *C. Pseudotuberculosis* in vivo, lo que se traduce en la limpieza ineficaz del organismo (Bogdan *et al.*, 1997). Estos efectos podrían estar asociados con la capa lipídica externa en la pared celular de *C. pseudotuberculosis* y otros componentes antigénicos que atenúan la producción de óxido nítrico por los macrófagos.

Las exotoxinas fosfolipasa D y esfingomielinasa hidrolizan, respectivamente, lisofosfatidilcolina y esfingomielinina de las membranas de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos. La desestabilización de las membranas provoca la lisis celular, incrementando la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edemas y facilitando la colonización y diseminación regional y sistémica en el hospedero (Lipsky *et al.*, 1982; Peel *et al.*, 1997; Aleman y Spier, 2001). La fosfolipasa D inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la degranulación de células fagocíticas, y activa complemento por la vía alternativa, ocasionando necrosis y trombosis de vasos linfáticos favoreciendo la supervivencia y multiplicación del microorganismo (Aleman y Spier, 2001). 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 (Simón Valencia *et al.*, 1987).

Como resultado del crecimiento bacteriano incontrolado dentro de los macrófagos, el hospedero intenta restringir y limitar la infección a través de la formación de piogranulomas, que se caracterizan por la encapsulación de las células infectadas con *C. pseudotuberculosis*. La formación de piogranulomas depende de la inmunidad adaptativa, que es un proceso complejo en el caso de la infección por *C. pseudotuberculosis*, que implica tanto la respuesta inmune humoral y celular (Batey, 1986; Paule *et al.*, 2003).

Los estudios inmunohistoquímicos sobre la composición celular de las lesiones pulmonares en ovejas infectadas por *C. pseudotuberculosis* han puesto de manifiesto un predominio de macrófagos grandes que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC) en su superficie, en las paredes del absceso y rodeando el parénquima pulmonar. Los linfocitos T fueron prominentes en las mismas áreas dentro de las lesiones de origen natural, con una proporción de 3.5:1 de células T CD4 y T CD8. Los linfocitos B y granulocitos comprendían una porción menor en los infiltrados celulares. Estos datos revelaron la participación de macrófagos y MHC clase II restringido a linfocitos T en la patogénesis de CLA (Ellis, 1988).

Además de la formación de piogranulomas subcutáneos, la infección con *C. pseudotuberculosis* conduce a la formación de abscesos subcutánea que no se originan a partir de lesiones primarias de los ganglios linfáticos. Sin embargo, algunos abscesos pueden tener una cercana asociación con los ganglios linfáticos, y como resultado la destrucción de tejido asociada con abscesos y la expansión de la naturaleza de estas lesiones, microabscesos que se componen de múltiples lesiones caseosas de 0.5-1.0 cm de diámetro (Moller *et al.*, 2000).

La resistencia a la infección por *C. pseudotuberculosis* es un proceso complejo que implica componentes tanto de la respuesta del hospedero no específica y específica, en el que tanto la respuesta inmune humoral y celular son operativas (Zaki, 1976; Batey, 1986; El-Enbaawy *et al.*, 2005). La importancia de los mecanismos humorales se ha demostrado mediante la evaluación de numerosos ensayos de vacunas comerciales y experimentales, que incluyen preparaciones a base de sobrenadante inactivado de cultivo celular o toxoides (Eggleton *et al.*, 1991; Stanford *et al.*, 1998), fracciones bacterianas de pared celular (Brogden *et al.*, 1984; Braga *et al.*, 2007), bacterias atenuados y muertas (Simmons *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1998), exotoxinas y sus subunidades (Tashjian y Campbell, 1983; Hodgson *et al.*, 1999) o patógenos modificados genéticamente (Chaplin *et*

al., 1999; De Rose *et al.*, 2002). Los avances respecto a la inmunoprofilaxis se han hecho, y el uso de estas preparaciones reduce el número y tamaño de los granulomas en los animales expuestos. Sin embargo, para controlar adecuadamente la infección, debe mejorarse la activación de los macrófagos; de hecho, muchos investigadores se centran actualmente en respuesta por IFN- γ . Los estudios sugieren que la inmunidad mediada por células podría desempeñar un papel más importante que la inmunidad humoral en la resistencia a la infección por *C. pseudotuberculosis* (Irwin y Knight, 1975).

En un estudio se encontró que la producción de IFN- γ y la presencia de sus receptores se asocian directamente con el control de la infección primaria en ratones (Simmons *et al.*, 1997). Otra citocina importante que controla principalmente las infecciones por *C. pseudotuberculosis* es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Simmons *et al.*, 1997; Lan *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1995). La administración de anti-TNF- α y anticuerpos anti-IFN- γ -monoclonal (mAb) aumenta la proliferación bacteriana en órganos de ratones infectados, conduciendo a la muerte de los animales. Tanto el TNF- α y IFN- γ se requieren para la supervivencia y el desarrollo de la inmunidad protectora (Bastos *et al.*, 2012).

Prevalencia

Se ha reconocido la distribución mundial de *C. pseudotuberculosis* y que LC está presente en la mayoría de las áreas de cría de ovejas (Bair y Fontaine, 2007). En Brasil, (Langenegger *et al.*, 1991) plantearon que esta enfermedad está ampliamente diseminada en crías del noreste del país, aunque actualmente está siendo registrada en otras regiones. Ellos citan además a seis autores que registran una prevalencia de hasta el 30% de animales con ganglios linfáticos abscedados, también se refieren rebaños con 28 y 10% de reactores asintomáticos. Estos autores en su propio trabajo efectuado en la región de Río de Janeiro encontraron que el 77 % de los rebaños caprinos estaban infectados por *C. pseudotuberculosis*, con porcentajes de afectación que varían desde el 3,5 % al

100 % de la masa (Ruiz *et al.*, 2007). Esto coincide con (Aguilar *et al.*, 1994), quienes en la región del norte del estado de Ceará en Brasil hallaron que el 28,37% de 222 animales estaban afectados de linfadenitis caseosa. (Langenegger *et al.*, 1991). En Argentina encontraron en la región del Tandil una prevalencia de 7.48 % de lesiones de la enfermedad aislando *Corynebacterium pseudotuberculosis* de 10 de esos animales tomados al azar (González *et al.*, 1999). En Chile la enfermedad se ha reportado por varios investigadores, han encontrado una prevalencia de LC en animales adultos de un 11,6% al examinar lesiones en canales de 1.397 ovinos en Planta Faenadora de Carnes en Chile (Tadich *et al.*, 2005). En América del Norte reportan aislamientos de varias zonas dentro de los Estados Unidos como Arizona, Texas, Washington, Wyoming, Iowa, y en Canadá de regiones como Ontario (Songer *et al.*, 1988), Pepin *et al.*, (1988) refieren una prevalencia del 42.4 % en regiones del oeste de los Estados Unidos. Arsenault *et al.*, (2003) hallaron en carneros sacrificados una prevalencia de un 21% en Quebec, Canadá. En México Ochoa *et al.* (1996) hallaron que el 5,4% de los exudados nasales que analizaron en ovejas trashumantes en Xalatlaco presentaron *Corynebacterium spp.*, así como Barrientos *et al.*, (1996) en ese mismo país aislaron *Corynebacterium pseudotuberculosis* en el 65% de los casos que estudiaron con lesiones en los nódulos linfáticos (Songer *et al.*, 1988).

En Europa, se refiere que la enfermedad se reporta en Holanda desde 1984 (Laak *et al.*, 1992), mientras que en Francia la enfermedad se incluye como síndrome de la enfermedad de los abscesos, asociada a infecciones por *Staphylococcus aureus*, reportando una prevalencia de un 54 % (Pepin *et al.*, 1988). También se ha reportado en regiones de España, como las Islas Canarias y Granada (Real y León, 1990), en el Reino Unido se ha realizado la caracterización de la bacteria con técnicas de electroforesis (Connor *et al.*, 2000). Se han realizado investigaciones serológicas en rebaños ovinos de Irlanda (Malone *et al.*, 2006). En Asia demostraron la presencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en los rebaños bovinos como causa de la mastitis así como el importante papel que

juega en esta especie, y han descrito la enfermedad con 3 formas clínicas; la mastitis, la forma visceral y la forma cutánea (Yeruham *et al.*, 1996; Yeruham *et al.*, 1997). En Australia se reporta una incidencia de 58% (Nairn, *et al.*, 1977), Batey (1986) reportó una prevalencia del 54 %; en Tasmania Middleton *et al.*, (1991) encontraron lesiones de la enfermedad en el 26 % de los animales que investigaron.

Importancia económica

El efecto de la enfermedad, en especial el tipo visceral, causa enflaquecimiento y pérdida del estado general, que es progresivo y se traduce en la disminución de la producción de lana, carne y leche. En las hembras provoca desórdenes reproductivos con un menor porcentaje de preñez en el rebaño y en los machos rechazo de carneros en la revisión previa al servicio (Arrigo, 1984; Patón *et al.*, 1994; Williamson, 2001; Arsenault *et al.*, 2003). Además aumenta la posibilidad de padecer otro tipo de enfermedades debido a la inmunodepresión local principalmente a nivel pulmonar y de ganglios mediastínicos lesionados (Brown y Olander 1987). El daño a la ganadería ovina es importante al producir pérdidas de rendimiento en el rebaño con menor peso de vellón, menor ganancia de peso y decomiso de las vísceras afectadas (A.S.I.A. 1999; Aleman y Spier, 2001). Estos hechos podrían impactar en las exportaciones, disminuyendo las posibilidades de comercialización o el valor de las canales ovinas. Es considerada una de las enfermedades más importantes, desde el punto de vista económico, que afecta ovejas y cabras en países como USA, Canadá y Australia (Burrell, 1980; Patón *et al.*, 1994; Stanford *et al.*, 1998), habiéndose comunicado para Australia una pérdida en la producción de lana de 17 millones de dólares (Patón *et al.*, 1994).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la infección por *C. pseudotuberculosis* en vivo, se basa en la palpación de ganglios superficiales aumentados de tamaño, las características macroscópicas de los exudados, signos clínicos como fiebre o

pérdida de peso, y datos epidemiológicos como la prevalencia local, la edad del ovino (Estevao *et al.*, 2006).

El diagnóstico definitivo se establece a través del cultivo del microorganismo a partir de abscesos obtenidos por necropsia o procedimientos quirúrgicos (Alemán y Spier 2001, León *et al.*, 2002). En el análisis histopatológico de dichas muestras, se observa en general un centro amorfo y eosinófilo de necrosis rodeado por una delgada capa de linfocitos, células plasmáticas, algunas células epiteliales y neutrófilos, bordeado por una red de fibroblastos (León *et al.*, 2002).

El análisis bacteriológico incluye microscopía y cultivo de las muestras. Las coloraciones microscópicas incluyen Gram y Ziehl Neelsen para realizar el diagnóstico diferencial con infecciones producidas por bacilos ácido alcohol resistentes (Chirrido-Zarraga *et al.*, 2005). En el Gram de las muestras, se pueden reconocer formas cocobacilares positivas en masa. La cepa desarrolla en agar sangre en 48 horas predominando el desarrollo de colonias pequeñas, blancas, secas y rodeadas de una β hemólisis tenue, correspondientes a bacilos cortos positivos, algunos agrupados en empalizada, que se identifican metabólicamente. De acuerdo a diferentes trabajos realizados, cepas de diferentes orígenes, muestran el mismo perfil bioquímico. (Chirrido Zarraga *et al.*, 2005; Literak *et al.*, 1999; Songer *et al.*, 1988). El ensayo de hemólisis sinérgica frente a *Rhodococcus equi* e inhibición de la β hemolisina del *Staphylococcus aureus*, ambas pruebas positivas, ponen en evidencia la producción de exotoxinas de *C. pseudotuberculosis* (Songer *et al.*, 1988). La prueba de reducción de nitratos a nitritos diferencia los biotipos de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* y *equi* (Leardini *et al.*, 2002; Vay y Almuzara, 2002).

Se han evaluado sistemas comerciales para la identificación de corynebacterias como el sistema Api Coryne identification system (Biomerieux, France), API20S system (Analytab Productos, NY). Minitek identification system (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), 60-min Rapid Identification Method (Austin Biological

Systems, Austin, Tex), Biolog system (Biolog, Calif). Estos sistemas incluyen test enzimáticos y de fermentación de azúcares. Los métodos rápidos ayudan en la identificación pero no superan la precisión de los métodos microbiológicos convencionales, debido a que requieren de pruebas adicionales para arribar a la identificación final (Lipsky *et al.*, 1982; Coyle y Lipsky, 1990; Funke *et al.*, 1997; Hommeez *et al.*, 1999).

Generalmente, la enfermedad es detectada en etapa post-mortem del animal, sin embargo hay investigaciones que resaltan la importancia del diagnóstico serológico dado que detecta la enfermedad en estados subclínicos. Se han descrito una variedad de ensayos serológicos basados en técnicas de inmunofluorescencia indirecta (Simón Valencia *et al.*, 1987) microaglutinación, inmunodifusión (Menzies y Muckle, 1989), IHS (Ruiz *et al.*, 1995), dot blot, western blotting (Ter Laak *et al.*, 1992), fijación de complemento (Shigidi, 1979) y diferentes procedimientos de ELISA (Kaba *et al.*, 2001). Entre los métodos mencionados, se resaltan las pruebas de ELISA e IHS. La prueba de IHS mide la respuesta de IgG a la exotoxina en el suero del paciente; la prueba detecta la dilución mayor que puede prevenir la hemólisis de *Rodococcus equi* cuando se utilizan glóbulos rojos sensibilizados con exotoxina de *R equi* (Aleman y Spier, 2001; Ruiz, et al. 1995). La reacción es interpretada a las 24H. Títulos de anticuerpos en suero equivalentes a 1:128 indican exposición y títulos 1:512 o mayores indican presencia de infección. El test IHS, ha sido utilizado en ovinos y caprinos para monitorear la prevalencia y exposición de animales y detectar infecciones subclínicas. El test tiene una sensibilidad del 98% para cabras y 96% para ovinos (Aleman y Spier, 2001; Brown y Olander, 1987).

En los procedimiento de ELISA se emplearon diferentes soportes antigénicos como antígenos bacterianos de pared celular, exotoxina y exotoxina recombinante, utilizándose para detectar infecciones en ovinos (Kaba *et al.*, 2001). Comercialmente hay disponibles métodos de ELISA, que pueden determinar

infecciones subclínicas entre 30 a 60 días post-infección. Los mismos mostraron una especificidad y sensibilidad del 85%. En general, como desventaja, los métodos serológicos pueden presentar resultados falsos positivos debido a similitudes antigénicas entre diferentes especies de *Corynebacterias* y en animales vacunados contra la enfermedad (Aleman and Spier, 2001; Çetinkaya *et al.*, 2002).

En un estudio realizado en California, entre diciembre de 1999 y enero de 2004, donde resaltan la importancia de la técnica de ultrasonografía y/o radiografías, en el diagnóstico por imágenes en equinos afectados por la enfermedad en su forma visceral (Vaughan *et al.*, 2004).

Debido a la variabilidad fenotípica que tienen algunas cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* el PCR simplificaría la identificación de los cultivos de esta especie bacteriana (Cetinkaya *et al.*, 2002). Los sistemas de identificación de corynebacterias basados en la genética molecular están en continuo desarrollo y se están utilizando de manera creciente en los laboratorios de Microbiología. Permiten identificar y diferenciar especies estrechamente relacionadas. El más utilizado es el análisis de la secuencia del gen 16S rADN (Drancourt *et al.*, 2000).

Diagnóstico molecular

Secuenciación del gen 16s

Es la más utilizada en el diagnóstico genotípico bacteriano en general. La comparación de las secuencias de los genes 16S rADN o de los que los codifican, permite.

- Establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una gran repercusión en la taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente en los tratados

fundamentales de Bacteriología, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology y Prokaryotes.

- La identificación rápida y precisa de las bacterias. En Microbiología Clínica, la identificación molecular basada en la secuenciación del gen 16S rADN se utiliza para bacterias cuya identificación por otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, hecho que sucede en difteromorfos en general y en corynebacterias en particular. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la grande (50S) y la pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleo-protéico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARN ribosomal específicas.

Secuenciación del gen *rpoB*

El gen *rpoB* codifica para la subunidad I de la RNA 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 3.500 pb. El punto de corte del grado de semejanza para definir especies y subespecies del género *Corynebacterium* ha sido establecido en <96.6 y >98% respectivamente. Pero la secuenciación de un fragmento de 434 a 452 pb permite identificar acertadamente especies de *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 16S rADN (1.500 pb) (programa SVARAP) (Renaud *et al.*, 2007).

Secuenciación o identificación del gen *pld*

Que corresponde a un gen que codifica para una proteína (fosfolipasa D) la cual altera la permeabilidad vascular y afecta la función de los neutrófilos en la respuesta inflamatoria (D'Afonseca *et al.*, 2008). Es un blanco de amplificación en

ensayos de PCR para discriminar entre aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Corynebacterium ulcerans* una especie genotípicamente muy relacionada (Pacheco *et al.*, 2007).

Estos tres genes *pld*, *rpoB*, *16s*, son los más importantes para el diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y los tres fueron amplificados en un estudio de PCR multiplex con excelentes resultados; obteniendo un método de alta sensibilidad reproducibilidad y eficacia en el diagnóstico de la bacteria (Pacheco *et al.*, 2007).

Secuenciación completa del genoma

Se ha secuenciado el genoma completo de cinco corynebacterias en los últimos seis años: *C. diphtheriae* (Cerdeño-Tárrega *et al.*, 2003), *C. jeikeium* (Tauch *et al.*, 2005), *C. urealyticum* (Tauch *et al.*, 2008), *C. kroppenstedtii* (Tauch *et al.*, 2008) y *C. aurimucosum* (Tauch, 2008). El conocimiento del genoma de estas bacterias explica aspectos relacionados con su patogenicidad, virulencia, ecología y resistencia antimicrobiana (Soriano y Tauch, 2008).

Genes, proteínas y vacunas

Los datos de determinantes de virulencia más estudiados en *Corynebacterium pseudotuberculosis* son: la proteína PLD (fosfolipasa D), una exoproteína que es considerada también leucotóxica, que contribuye a la formación de lesiones y de la destrucción de macrófagos caprinos durante la infección, el operon *fagABC* y el gen *fagD*, ambos juegan un rol en la virulencia de la bacteria, la alta concentración de lípidos en la pared celular, los cuales hacen que el microorganismo resistan la digestión por enzimas celulares y así persistan como parásitos intracelulares facultativos y la proteína CP40, identificada como una proteína inmunógena que exhibe actividad proteolítica (Pinto *et al.*, 2014).

Debido a la gran importancia de *C. pseudotuberculosis* en veterinaria, y teniendo en cuenta la ineficacia de los antibióticos, varias estrategias de vacunas ya se han

desarrollado, incluyendo el uso de bacterias atenuadas o inactivadas, fracciones de la pared celular, y las vacunas de ADN (Dorella *et al.*, 2009).

Las vacunas actuales se basan principalmente en la inactivación con formalina de la fosfolipasa D (PLD), el principal antígeno protector de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y uno de los principales factores de virulencia, la cual promueve la difusión del patógeno mediante la activación de la permeabilización vascular, hemólisis, y la interrupción de la membrana (Hodgson *et al.*, 1999; Selvy *et al.*, 2011).

Sin embargo, aunque existen estrategias de vacunación, los animales vacunados presentan variables en los niveles de protección; no todas las vacunas disponibles para su uso en el ganado ovino tienen la misma eficacia en el ganado caprino (Windsor, 2011).

Por ello existe la necesidad de una mejor caracterización de los factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y realizar comparaciones completas de los factores de virulencia de los distintos biotipos para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación, que sean capaces de proteger no sólo a los pequeños rumiantes, sino también a caballos y ganado vacuno.

Existen múltiples trabajos que muestran las diferentes proteínas antigénicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* y de los cuales podemos hacer un análisis para poder elegir las posibles candidatas en elaboración de inmunógenos protectores.

Los determinantes genéticos de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* han sido pobremente caracterizados (Dorella *et al.*, 2006) y hasta el 2006 solo 19 proteínas estaba identificadas en la base de datos Gen Pept (GenBank) y las cuales se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1 Genes de *Corynebacterium pseudotuberculosis* depositados en el Gen Pept (NCBI)

Accession number (GenPept)	Putative protein	Reference
ABI29892	10-kDa chaperonin GroES	Coelho KS and Azevedo V (unpublished results)
AAV48830	60-kDa chaperonin 1	Estevam E, Miyoshi A and Azevedo V (unpublished results)
ABI75067	65-kDa heat shock protein	Flandrois J-P and Fardel G (unpublished results)
AAB71614	AroB (3-dehydroquinase synthase)	Simmons et al., 1997
AAB71615	AroB (3-dehydroquinase)	Simmons et al., 1997
P96749	AroB (3-dehydroquinase synthase)	Simmons et al., 1997
P96750	AroQ (3-dehydroquinase dehydratase)	Simmons et al., 1997
AAL79811	FagA (integral membrane protein)	Billington et al., 2002
AAL79810	FagB (iron-enterobactin transporter)	Billington et al., 2002
AAL79809	FagC (ATP-binding cytoplasmic membrane protein)	Billington et al., 2002
AAL79812	FagD (iron-siderophore binding protein)	Billington et al., 2002
P20626	Phospholipase D precursor	Hodgson et al., 1990
AAA64910	Phospholipase D	Cuevas and Songer, 1993
AAA99867	Phospholipase D	McNamara et al., 1994
CAA01541	Phospholipase D	-
AAA82608	Protein recA	Pogson et al., 1996
P48288	Protein recA	Pogson et al., 1996
AAS89201	RpoB (RNA polymerase β subunit)	Khamis et al., 2004
AAA67924	Serine proteinase precursor	Wilson et al., 1995

La mayoría de estos genes representan factores de virulencia o modulan positivamente genes de virulencia o codifican factores de virulencia que confieren características patógenas para *Corynebacterium pseudotuberculosis* (D'Afonseca *et al.*, 2008).

Sin embargo en un artículo más reciente (Bastos *et al.*, 2012) fueron enlistadas las publicaciones de 40 años sobre modelos de vacunas.

Estudios más recientes a los mencionados anteriormente y con nuevas técnicas y herramientas moleculares se han llevado a cabo, y entre ellos podemos mencionar los siguientes:

Estudios recientes

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son tradicionalmente clasificadas en base a su peso molecular, son proteínas altamente conservadas, abundantemente expresadas en organismos eucariontes y procariontes. Las proteínas de choque térmico son consideradas inmunológicamente importantes por el hecho de que son reconocidas en el hospedero en bacterias, hongos e infecciones parasitarias; induciendo una fuerte respuesta inmune humoral y celular en mamíferos. Muchos estudios han mostrado que estas versátiles proteínas pueden ser usadas como antígenos para uso como vacunas.

La proteína **Hsp60** de *Corynebacterium pseudotuberculosis* fue usada como una subunidad proteínica inmunógena contra Linfadenitis caseosa, sin embargo, falló para conferir protección en ratones contra la infección de *C. pseudotuberculosis*. Por otro lado, en un estudio donde se usó una estrategia alterna, identificaron y caracterizaron el operon bicistrónico ***hsp60-hsp10*** de la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, realizando la construcción de una vacuna ADN mediante la clonación del gen en un vector de expresión de mamífero. Ratones BALB/c fueron inmunizados por vía intramuscular con el plásmido recombinante (Pvax1/hsp60). Esta vacunación indujo significativa producción de isotipos anti-hsp60 IgG, IgG1 e IgG2a. Sin embargo la inmunización con esta vacuna de ADN no confirió inmunidad protectora (Costa *et al.*, 2011).

Ruiz *et al.*, (2011) realizó un estudio en el cual identificó las islas de patogenicidad **(PAIs)**. Menciona que en bacterias patógenas es altamente relevante para comprender las razones detrás de las diferentes respuestas a las vacunas y los mecanismos biológicos que conducen a la plasticidad del genoma. Las biovariedades *equi* y *ovis* de *C. pseudotuberculosis* causan distintas enfermedades en sus hospederos, la evaluación de los genes de virulencia podrían ayudar a identificar genes involucrados en estas diferencias específicas del hospedero.

Sá *et al.*, (2013) realizó un estudio mediante la utilización de la técnica de PCR para identificar la presencia de genes de virulencia de la fosfolipasa D (***pld***), proteína integral de membrana (***Fag A***), proteína transportadora de hierro (***Fag B***), proteína de la membrana citoplasmática ATP binding (***Fag C***) y (***Fag D***) en 168 aislados de *C. pseudotuberculosis* obtenidos de casos de linfadenitis caseosa en ovejas y cabras. Los genes de *FagA*, *FagB* y *pld* fueron detectados en las 145 cepas aisladas de abscesos de linfonodos superficiales y en 23 cepas de aislados de vísceras.

El gen *FagC* fue positivo en 167 aislados (99.4%). El gen *FagD* fue detectado en 160 aislados (95.23%). Todos los factores de virulencia analizados fueron encontrados más frecuentemente entre aislados colectados en las vísceras de animales con Linfadenitis caseosa, indicando una naturaleza multifactorial, así como las variaciones en la potencial invasión de las cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Además en este trabajo se pudo demostrar que los genes de virulencia que codifican *pld* y *FagA* y *D* están presentes en la mayoría de cepas aisladas de *C. pseudotuberculosis* de animales con Linfadenitis caseosa, indicando una amplia distribución en el campo y un alto potencial patógeno (Sá *et al.*, 2013).

Soares *et al.*, (2013) llevaron a cabo un estudio donde utilizaron la vacunología inversa para predecir proteínas antigénicas. Las proteínas predichas por SurfG + se analizaron adicionalmente con el software Vaxign, lo que resulta en la detección de proteínas con propiedades antigénicas en las cepas de *C. pseudotuberculosis* 1002, CIP 52.97, y 258. Realizaron un análisis más detallado que tomo solo en cuenta las proteínas candidatas de vacunas que son compartidos por las tres cepas, se predijo como antigénica en al menos una de las cepas, un total de 49 proteínas. Del total se encontró a la superfamilia de proteínas **HtaA** que están bien caracterizada y asociada a receptores de membrana expuestos en la superficie, que actúan en el secuestro de hemo desde el

hospedero para adquirir hierro en entornos donde este componente es escaso, por lo tanto juega un papel crítico en la capacidad de los patógenos para causar la enfermedad. *C. pseudotuberculosis* también presenta otra proteína antigénica implicada en la adquisición de hierro, representada por el gen **fhuD** que codifica para una proteína de unión al sustrato expuesto en la superficie implicada en el transporte de ferricromo u otros sideróforos de hidroxamato. Además de estas dos proteínas de adquisición de hierro, las proteínas potencialmente antigénicas **PbpA, PbpB, MalE, RpfA, RuvA, CopC** y **NrfC** también merecen atención.

Silva *et al.*, (2013) realizaron un trabajo donde se llevó a cabo una comparación de exoproteomas (proteínas extracelulares) de dos cepas de *C. pseudotuberculosis* (C231y 1002), basándose en un estudio previo por Pacheco *et al.*, (2011), como resultados obtuvieron diferencias en los exoproteomas entre estas dos cepas ya que existían diferencias en los hospederos y localización geográfica, una fue aislada en Brasil y la otra en Australia. Llevaron a cabo dos técnicas la: 2-DE y la TTP-LC/MS(gel-independet) con las cuales identificaron 11 nuevas proteínas (Cuadro 2) no identificadas en el estudio previo por Pacheco. De las 11 proteínas nuevas encontradas en este trabajo, de 3 se desconoce sus funciones (proteínas hipotéticas) y 8 han sido relacionadas a varias funciones fisiológicas y factores de virulencia.

Cuadro 2 Lista de las 11 nuevas proteínas de *C. pseudotuberculosis*.

List of the 11 proteins not identified by TPP/LCMS^E.

Protein	ID (NCBI) ^a of strains		Gel identification	
	1002	C231	1002	C231
Chaperone GroEL	ADL21673	ADL11255	Yes	Yes
Chaperone protein DnaK	ADL21757	ADL11343	Yes	Yes
Hypothetical protein	ADL21702	ADL11289	Yes	Yes
Hypothetical protein	ADL21703	ADL11290	Yes	Yes
Hypothetical protein	ADL21704	ADL11291	Yes	Yes
Elongation factor P	ADL21021	ADL10611	Yes	Yes
Enolase	ADL20605	ADL10195	Yes	No
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ADL20991	ADL10581	Yes	No
ABC-type transporter	ADL20391	ADL09988	Yes	No
Carbonic anhydrase	ADL20477	ADL20477	Yes	No
Manganese superoxide dismutase	ADL21849	ADL11437	Yes	No

^a Access number of proteins (NCBI genome project at 40687 and 40875).

En el estudio realizado por Pinto *et al.*, (2014) simularon las condiciones experimentadas por *Corynebacterium* durante la infección en su hospedero. Por secuenciación transcripta usando la plataforma SOLID™ 3 Plus (tecnología RNAseq) identificaron nuevas tarjetas (proteínas) con potentes expectativas para la supervivencia y replicación del patógeno en ambientes adversos; por consiguiente estas proteínas son candidatas potenciales para la elaboración de vacunas, kit de diagnóstico o tratamientos para linfadenitis caseosa. Estas proteínas son: factor esencial **sig A**, no esencial y alternativo **sig B** y 6 factores alternativos dentro de los factores extra-citoplasmáticos **sig C**, **sig D**, **sig E**, **sig H**, **sig K**, **sig M**.

Actualmente, hay grandes avances en la genómica, principalmente en la optimización de las técnicas de secuenciación, lo que significa que la secuenciación se ha convertido menos costosa y más precisa. Un depósito masivo de secuencias como el estudio de secuencia genómica en las bases de datos públicas ha facilitado la búsqueda de homología y predicción de nuevos genes. A través de estos avances en el campo de la genómica, el objetivo es el uso de estas herramientas para el descubrimiento de nuevos genes, nuevos métodos de

diagnóstico y vacunas más eficaces para el control de LC. Por otra parte, los genomas de varias *Corynebacterias sp* están ampliamente disponibles, donde esta información se puede utilizar en la genómica comparativa para ayudar a obtener un mejor conocimiento de contenido de genes y la organización genómica de *C. pseudotuberculosis*.

Variaciones genotípicas encontradas

En los últimos años muchos estudios han demostrado el valor de las técnicas moleculares en la identificación y diferenciación genotípica de agentes patógenos e infecciosos. Diferentes estudios sobre *C. pseudotuberculosis* ya describen hallazgos de variaciones genotípicas y polimorfismos a nivel de ácidos nucleicos observándose variabilidad entre las cepas.

En un estudio de 50 aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* del Reino Unido, se demostraron 6 pulsotipos mediante la técnica Pulsed-Field Gel Electroforesis, mostrando un arreglo de clonalidad entre los aislados de ovinos y caprinos (Connor *et al.*, 2000)

El estudio realizado por Estefanska *et al.*, (2008) utilizó tres diferentes técnicas de Fingerprinting basados en PCR (BOX-PCR, RAPD and ADSPJIS-fingerprinting) para evaluar la diversidad del genoma entre las cepas de *C. pseudotuberculosis* que causan infecciones en las cabras en Polonia. En este estudio se demostró que las cepas de *C. pseudotuberculosis* que causan infecciones en el ganado caprino en Polonia son genéticamente diversas; ya que patrones de genoma fueron idénticos en cepas aisladas de animales de rebaños de diferentes regiones y cepas que mostraron perfiles de genoma diferentes fueron aislados de un mismo rebaño.

Otro ejemplo claro fue el estudio realizado por Hoelzle *et al.*, (2013) donde por medio de la técnica SDS-PAGE Inmunoblot Analysis encontraron diferencias en

las estructuras antigénicas de aislados de campo *Corynebacterium pseudotuberculosis* de ovinos y caprinos, y que por lo tanto un diagnóstico basado en un solo antígeno como el PLD no es correcto, sino que se requiere la combinación de dos o tres proteínas inmunodominantes. El estudio realizado por Dorneles *et al.*, (2014) mediante la tipificación de *C. pseudotuberculosis* con el uso de la técnica ERIC PCR, sugiere que existe una amplia diversidad genética entre los aislados de *C. pseudotuberculosis* de municipios de Brasil ya que lograron identificar de 7 a 10 genotipos diferentes dependiendo de los cebadores utilizados.

Sá *et al.*, (2013) realizó un estudio de un total de 127 aislados de *C. pseudotuberculosis* en localidad de Minas de Gerais en Brasil mediante un análisis genotípico con la técnica de ERIC PCR. Esta técnica permitió una buena diferenciación genética de cepas de *C. pseudotuberculosis* obtenidas de lesiones de Linfadenitis caseosa, identificando de 17 a 21 genotipos distintos dependiendo de los cebadores utilizados.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la ovinocultura nacional se ha fortalecido de manera considerable, ha incrementado el número de unidades animales de 5.8 millones en 1998 a más de 7 millones en la actualidad, con distribución principalmente en los Estado de México, Hidalgo, Zacatecas, Oaxaca, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato que concentran cerca del 55% del inventario. Sin embargo, la producción no logra cubrir la demanda nacional, por ello, se importa más del 52% del consumo de carne a partir de países como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Chile.

El reto es incrementar la producción y controlar las enfermedades que limitan la producción, como el caso de linfadenitis caseosa (LC). LC es una enfermedad crónica que se caracteriza por la formación de abscesos en nódulos linfáticos, piel y diversos órganos internos principalmente en pequeños rumiantes. En países como Australia, Brasil, Canadá y Estados Unidos, es considerada una de las enfermedades infecciosas económicamente más importante que afecta la producción ovina y caprina. Causa pérdidas debido al deterioro progresivo del estado general del animal, que se traduce en disminución de la producción de lana, carne, leche; desórdenes reproductivos y decomiso de vísceras. Además aumenta la posibilidad de padecer otro tipo de enfermedades debido a la inmunodepresión local principalmente a nivel pulmonar y de nódulos linfoides mediastínicos lesionados. Además, LC tiene implicaciones zoonóticas en personal dedicado a la cría y explotación ovina y caprina.

Debido a su curso crónico y poca respuesta al tratamiento, es difícil erradicar la infección una vez que se establece. Por ello, las estrategias para establecer los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad deben considerar aspectos integrales. Algunos de los aspectos limitantes para el control de LC es que no existen pruebas de diagnóstico suficientemente sensibles y

específicos para establecer el diagnóstico de la fase precoz y en la fase clínica visceral, las vacunas y bacterinas no han arrojado resultados satisfactorios en modelos animales, por lo que se requiere investigar más sobre estos aspectos para encontrar proteínas que confieran mayor protección inmunogénica y para el diagnóstico y todo esto debido probablemente a que en estudios previos se demuestra la variabilidad genética de aislados de *C. pseudotuberculosis*, a lo cual se le atribuiría la poca respuesta de los inmunógenos existentes.

En México, la importancia de la enfermedad no se ha establecido adecuadamente, se sabe que está ampliamente difundida con prevalencias que oscilan entre 10 y 52%; pero falta precisar las cepas existentes, las diferencias moleculares de acuerdo al cuadro clínico y a la especie afectada, las proteínas inmunogénicas para la prevención y el diagnóstico.

OBJETIVOS

Realizar la caracterización molecular y el análisis filogenético de los aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de origen cutáneo.

Objetivos específicos:

1. Identificación fenotípica mediante técnicas bacteriológicas y bioquímicas de los aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
2. Identificación genotípica mediante PCR de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidos previamente de casos clínicos de linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos.
3. Identificar cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* portadoras de los genes de patogenicidad: *pId*, *Fag A*, *Fag B*, *Fag C* y *Fag D*.
4. Análisis filogenético mediante el gen *rpoB* e identificación de variabilidad genética de los aislados,

HIPOTESIS

Existen diferencias genotípicas entre los aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidos de muestras de casos clínicos de lesiones superficiales de Linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos.

MATERIAL Y METODOS

Límite de Espacio

La colección de muestras se realizó en explotaciones ovinas y caprinas en municipios pertenecientes a los Estados de Jalisco y México (Zapotlanejo, Zapopan, Tlaquepaque, Tepatlán, Acatic, Tlajomulco y Jiquipilco).

Las pruebas de identificación bacteriológicas, bioquímicas y las técnicas moleculares se realizaron en el área de Bacteriología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, CIESA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 15.5 Carretera Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México, C.P. 50090, México.

Aislados

Aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

Se partió de un total de 69 aislamientos recolectados a partir de hisopados de animales identificados con lesiones clínicas de linfadenitis caseosa ovina y caprina (Anexo 1). Se procedió a realizar el sembrado en medio de cultivo de gelosa sangre, incubándolas a 37°C por 24-48 horas, en presencia de oxígeno y en condiciones anaeróbicas. Se observó el crecimiento de colonias color crema y rodeadas de una zona de hemólisis incompleta. A los aislamientos se les realizó la tinción de Gram dando como resultado bacilos Gram positivos cortos y curvos.

Se realizaron pruebas bioquímicas clásicas catalasa y ureasa positiva, fermentación de glucosa, galactosa, maltosa y manosa. El biotipo *ovis* no reducen los nitratos a diferencia de los aislados de equinos. Se aplicaron además pruebas bioquímicas de identificación miniaturizado Api Coryne (Lab. Biomeriux, REF, 20-900. Francia). El procedimiento, realización e interpretación de la prueba se llevó a cabo de acuerdo al Manual Api Coryne suministrado por el laboratorio fabricante (anexo I).

Identificación molecular de los aislados

Extracción de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN de los 60 aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* mediante un kit comercial KAPA BIOSYSTEMS siguiendo las especificaciones del proveedor.

El protocolo fue el siguiente:

La extracción de ADN se realizó en volumen de 100 μ L establecidos de la siguiente manera:

PCR-Grade wáter: 88 μ L, 10x kapa Express Extract Buffer: 10 μ L, 1 U/ μ L Kapa Express Enzyme: 2 μ L.

Se mezclaron los componentes según el cuadro y se procedió a la lisis de la muestra a 75 °C por 10 min, para luego inactivar la enzima a 95 °C por 5 min; posteriormente un proceso de centrifugación de 1 min a 12 rpm para sedimentar los restos celulares, se extrajo el sobrenadante a un tubo nuevo y se desecha el pellet (Figura 1). Los extractos fueron estables a 4 °C durante al menos 1 mes y a -20 °C durante al menos 6 meses.

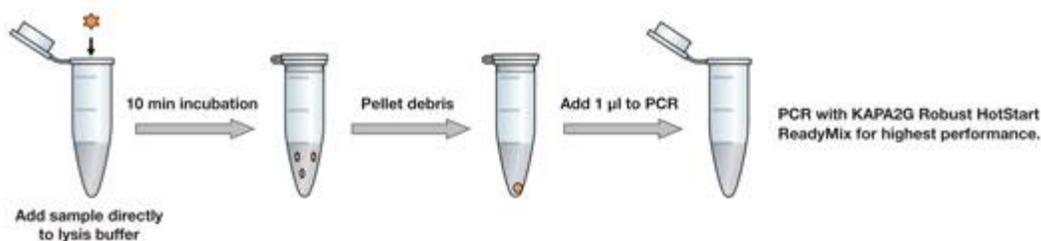


Figura 1 Extracción de ADN

Caracterización molecular

Diagnóstico genotípico

Se llevó a cabo la identificación genotípica de los 69 aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Anexo 1) mediante el uso del ADN extraído con el kit comercial KAPA BIOSYSTEMS con la técnica de PCR multiplex mediante el protocolo establecido por Pacheco (Pacheco *et al.*, 2007), la cual se basa en la utilización de tres pares de primers que amplifican tres genes específicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*: 16s, *rpoB* y *pld*, los cuales son capaces de diferenciar entre otros géneros y especies de *Corynebacterium*, garantizándonos la correcta identificación.

Los primers Utilizados fueron los siguientes:

Gen	Primer	Secuencia (5´-3´)	Longitud del Producto (Pb)	Referencia
16s rRNA	16S-F:	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	816	Cetinkaya <i>et al.</i> (2002)
	16S-R:	TCTCTACGCCGATCTTGTAT		
<i>rpoB</i>	C2700 F	CGTATGAACATCGGCCAGGT	446	Khamis <i>et al.</i> (2004)
	C3130 R	TCCATTTGCCGAAGCGCTG		
<i>pld</i>	PLD-F	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA	203	Pacheco <i>et al.</i> (2007)
	PLD-R2	ATCAGCGGTGATTGTCTTCCA GG		

El PCR Multiplex se realizó en un volumen final de 50 µl conteniendo 25 µl 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 12 µl 10x primer mix (2 µl de cada primer (dilución de 100 pmol/µl), 5 µ de DNA (10 ng/µl).

El protocolo de la reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne TC 512) es las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 58 °C por 40 s y 68 °C por 1 min 30s; y una final extensión de 68 °C por 7 min.

La amplificación de los productos se resolvieron por la técnica de Electroforesis en un gel de Agarosa al 1.5 % y visualizados con tinción de Bromuro de etidio en un trasiluminador (DNR Mini Bis Pro).

Identificación de genes de Virulencia y Patogenicidad

Se llevó a cabo un PCR sencillo y un PCR Multiplex montados en este estudio basados en el protocolo previamente establecido por Sá *et al.*, (2013) para la identificación de genes involucrados en la virulencia y patogenicidad de *C. pseudotuberculosis* de los aislados positivos por PCR multiplex. Los genes involucrados en factores de patogenicidad y virulencia que fueron analizados son los siguientes: Gen *pld* el cual fue incluido en el PCR Multiplex y los genes FagA, FagB, FagC y FagD.

Los primers utilizados para identificar estos genes fueron los siguientes:

Para los genes *fag A-D* los reportados por (Sá *et al.*, 2013).

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Longitud del Producto (Pb)	Referencia
<i>Fag_A</i>	F:	AGCAAGACCAAGAGACATGC	245	Sá <i>et al.</i> (2013)
	R:	AGTCTCAGCCCAACGTACAG		
<i>Fag_B</i>	F	GTGAGAAGAACCCCGGTATAG	291	Sá <i>et al.</i> (2013)
	R	TACCGCACTTATTCTGACACTG		
<i>Fag_C</i>	F	GTTTGGCTATCTCCTTGGTATG	173	Sá <i>et al.</i> (2013)
	R	CGACCTTAGTGTTGACATACC		
<i>Fag_D</i>	F	GAGACTATCGACCAGGCAGA	226	Sá <i>et al.</i> (2013)
	R	ACTTCTTGGGGAGCAGTTCT		

Los ensayos de PCR en punto final para el gen *Fag_B* se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 25 µl, que contenían 2.5 µl con 20 ng de ADN genómico, 12.5 µl 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 2 µl 10x primer mix (1 µl de cada primer (dilución de 100 pmol/µl)). La amplificación se realizó en un

termociclador (Teche TC-512) con el protocolo siguiente: desnaturalización inicial de 94 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40s, alineación de 58°C para *Fag_A* y 55°C para *Fag_B* por 40s y una extensión de 72 °C por 40s, terminando con un paso final de 72 °C por 10 min.

Para los genes *Fag_C* y *Fag_D* y *Fag A* se llevó a cabo un PCR Multiplex en un volumen final de reacción de 25 µl, que contenían 2.5 µl con 20 ng de ADN genómico, 12.5 µl 2X Quiagen Multiplex PCR Master Mix, 2 µl 10x primer mix (1 µl de cada primer (dilución de 100 pmol/µl). La amplificación se realizó en un termociclador (Teche TC-512) donde se ajustó la temperatura de alineación con el protocolo siguiente: desnaturalización inicial de 94 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40s, alineación de 60.5°C por 40s y una extensión de 72 °C por 40s, terminando con un paso final de 72 °C por 10 min.

La amplificación de los productos se resolvieron por la técnica de Electroforesis en un gel de Agarosa al 1.5 % y visualizados con tinción de Bromuro de etidio en un trasiluminador (DNR Mini Bis Pro).

Análisis Filogenético

Amplificación del gen *rpoB*

De los aislamientos positivos por PCR multiplex se procedió amplificar individualmente la secuencia parcial del gen *rpoB* mediante un PCR en punto final y así poder purificarlo. Para lo cual se estableció el mismo protocolo de PCR Multiplex utilizado previamente, ajustando las cantidades de la reacción con un solo un par de primers.

Purificación del Gen.

Una vez amplificada la secuencia parcial del gen *rpoB* se procedió a observarlo nuevamente mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador (Teche TC-512).

Los fragmentos del gen *rpoB* se purificaron usando el kit PROMEGA (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) siguiendo las indicaciones del proveedor. Dicho kit tiene la capacidad de purificar el fragmento a partir de la reacción de PCR, lo cual facilita la obtención y concentración adecuada de ADN purificado.

El kit cuenta con los siguientes reactivos

- Solución de unión de membrana
- Solución de lavado de membrana
- H₂O libre de nucleasas
- Minicolumnas Wizard SV

El protocolo de purificación fue el siguiente: A partir de los productos de PCR

1. Se agregó el mismo volumen de solución de unión de membrana al producto de PCR.
2. Se ensambló la minicolumna en el tubo recolector.
3. Se transfirió el producto a la minicolumna con un periodo de incubación de 1 min a temperatura ambiente.
4. Se centrifugó a 16000 gravedades por minuto.
5. Se desechó el líquido obtenido por la centrifugación del tubo recolector y se volvió a reinsertar la minicolumna.
6. Se le agregó 700 µl de solución de lavado de membrana, se centrifugó a 16000 gravedades por minuto, desechando el líquido obtenido y reinsertando la minicolumna en el tubo recolector.
7. Se repitió el paso 6 con 500 µl de solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16000 g por 5 minutos.
8. Se vertió el líquido obtenido y se ensambló la minicolumna nuevamente en el tubo recolector y se centrifugó nuevamente a 16000 gravedades por minuto sin la tapa de la centrifuga para permitir la evaporación de residuos de etanol de la solución de lavado de membrana.
9. Cuidadosamente se transfirió la minicolumna a un tubo limpio de micro centrífuga de 1.5 ml, y se le agrega 50 µL DE H₂O libre de nucleasas a la

minicolumna incubando a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 16000 g x min

10. Se desechó la minicolumna ya que el ADN se encuentra en el tubo de microcentrífuga y se almacenó de 4 a -20 °C.

Secuenciación de los genes

Una vez purificados los fragmentos se procedió a medir su concentración en un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo Scientific) alcanzando una concentración mínima de 50 ng/μl de ADN para su posterior envío a la empresa MACROGEN (USA) para su secuenciación y poder realizar en análisis de secuencias.

Análisis de secuencias

Se obtuvieron un total de 60 secuencias parciales del gen *rpoB* las cuales fueron alineadas mediante el programa estadístico Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.2). Las secuencias alineadas fueron analizadas en el programa estadístico Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para compararlas en la base de datos del Gen Bank y poder comparar el porcentaje de similitud con otras secuencias ya reportadas. Se construyó un árbol filogenético mediante un test de Maximum Likelihood y Neighbor-joining. El árbol fue derivado del alineamiento y porcentajes de similitud de la secuencia parcial del gen *rpoB*, se utilizó un valor bootstrap de 1000 repeticiones, se incluyeron los aislados *C. pseudotuberculosis* del presente estudio además de muestras de referencia del Gen Bank de las subespecies *ovis* y *equi*, una secuencia de referencia del *Corynebacterium ulcerans* y otra de *Corynebacterium diphtheriae*. Las cepas de referencia de Gen Bank utilizados en el presente estudio se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3 Cepas de referencia Gen Bank (NCBI) utilizadas en el presente estudio.

AISLADO	ESPECIE	HOSPEDERO	DESCRIPCIÓN CLÍNICA	PAÍS DEL AISLAMIENTO
1002	<i>Ovis</i>	Cabra	LCA Absceso	Brasil
C231	<i>Ovis</i>	Ovino	LCA Absceso	Australia
42/02-A	<i>Ovis</i>	Ovino	LCA Absceso	Australia
PAT 10	<i>Ovis</i>	Ovino	Absceso pulmón	Argentina
3/99-5	<i>Ovis</i>	Ovino	LCA	Escocia
267	<i>Ovis</i>	Llama	LCA Absceso	USA
P54B96	<i>Ovis</i>	Antílope	LCA Absceso	Sudáfrica
I19	<i>Ovis</i>	Bovino	Mastitis absceso	Israel
FRC 41	<i>Ovis</i>	Humano	Linfadenitis necrotizante	Francia
AY 492239.1	<i>Ovis</i>	----	----	Francia
HQ401568.1	<i>Ovis</i>	Ovino	----	Chile
GU971389.1	<i>Ovis</i>	Ovino	----	Alemania
HQ401569.1	<i>Ovis</i>	Cabra	----	Chile
GU971394.1	<i>Ovis</i>	Cabra	----	Alemania
CIP52.97	<i>Equi</i>	Caballo	Linfangitis ulcerativa	Kenia
316	<i>Equi</i>	Caballo	Absceso	USA
258	<i>Equi</i>	Caballo	Linfangitis ulcerativa	Bélgica
1/06-A	<i>Equi</i>	Caballo	Absceso	USA
Cp162	<i>Equi</i>	Camello	Absceso cuello	Inglaterra
31	<i>Equi</i>	Búfalo	Absceso	Egipto
AY492271.1	<i>C. ulcerans</i>	----	----	Francia
AY492230.1	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	----	----	Francia
FN179294.1	<i>C. xerosis</i>	----	----	España
AY492233.1	<i>C. xerosis</i>	----	----	Francia

RESULTADOS

Bacteriológicos y Bioquímicos

Un total de 69 aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* identificados mediante Bacteriología (figura 2) de los cuales 1 mostro crecimiento de colonias amarillentas y sin presencia de beta hemolisis (figura 3). En el cuadro 4 se presenta los resultados de acuerdo al tamaño del absceso.



Figura 2 Morfología. Colonia de aislado de *C. pseudotuberculosis*.



Figura 3 Aislado de *Corynebacterium* spp. Crecimiento colonias amarillas.

Cuadro 4 Tamaño del absceso y aislamientos obtenidos en ovinos y caprinos del Estado de Jalisco, México.

TAMAÑO ABSCESO	DEL	AISLAMIENTO				TOTAL
		<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	<i>Corynebacterium Spp</i>	<i>Proteus spp</i>	<i>Streptococcus spp</i>	
< 5 CM	53	2	15	4	74	
5.1 - 10 CM	11	1	7	2	21	
Sin determinar	5	0	2	1	8	
TOTAL	69	3	24	7	103	

En la figura 4 se muestran los tipos de exudados obtenidos y mencionados en la tabla 1. Nótese que para el caso de *C. pseudotuberculosis* se obtuvieron el 44.9 % (30/69) de los aislamientos de exudado seropurulento y solo el 17.4 % (12/69) del exudado caseoso (Cuadro 5).



Figura 4 Tipos de exudado obtenidos de abscesos cutáneos en ovinos y caprinos del Estado de Jalisco, México.

Cuadro 5 Resultado Bacteriológico por tipo de exudado de abscesos cutáneos en ovinos y caprinos del estado de Jalisco, México.

	Seropurulento	Caseoso	Purulento	Sanguinolento	Seroso	S/D*	Total
<i>C. pseudotuberculosis</i>	30	12	9	2	11	5	69
<i>Proteus sp</i>	15	1	2	2	-	4	24
<i>Streptococcus sp</i>	3	-	4	-	-	-	7
<i>Corynebacterium sp</i>	1	-	1	-	1	-	3
Sin crecimiento	28	13	14	4	17	30	107
Total	77	26	30	8	29	39	209

Además cabe destacar en el Cuadro 6 los aislamientos por región anatómica, destacándose la presentación en cabeza, seguida de la del cuello y miembros torácicos en ambas especies (ovino y caprino), también presentándose la región inguinal o preclural afectando el nódulo linfoide que lleva dicho nombre.

Cuadro 6 Aislamientos por categoría y región anatómica de abscesos cutáneos en ovinos del Estado de Jalisco, México.

Región anatómica	Especie (ovino)	Especie (Caprino)
Cabeza	27	6
Cuello	24	0
Miembros torácicos	1	2
Inguinal	1	4
Caudal	3	0
Glándula Mamaria	1	0

Los resultados de la prueba Api Coryne (Cuadro 7) donde se observan diferentes perfiles destacándose por ejemplo el 23. 2% (16 aislamientos) presentaron perfiles comunes al api y 17 aislamientos presentaron perfiles únicos. Además, se presenta el % de positividad a cada una de las pruebas en la parte inferior por ejemplo el 100% de los aislados presentaron reacción Catalasa positiva y Urea positiva, el 100% de los aislados fue negativo a Pyr A (ácido piroglutámico β naftilamina reacción enzimática con Pirolidonil Arilamidasa) a BNAG (1-naftil-N-acetil β D-glucosaminida reacción con β -galactosidasa) a O (testigo negativo de fermentación), aproximadamente el 50 % de las cepas fue positivo a PAL (2 naftil-fosfato reacción enzimática fosfatasa alcalina) y a MAL (fermentación de la D-Maltosa).

Cuadro 7 Perfiles bioquímicos en el sistema Api coryne. Aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidos de abscesos ovinos y caprinos

NIT	PYZ	PyrA	PAL	B GUR	B GAL	a GLU	B NAG	ESC	URE	GEL	O	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG	CAT	PERFIL Bioquímico en sistema API	
																					No de aislados	%
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	16	23.2
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	9	13.0
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	6	8.7
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	6	8.7
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	5	7.2
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	4	5.8
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	2	2.9
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	2	2.9
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	2	2.9
(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	1	1.4
(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	1	1.4
(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	1	1.4
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	1	1.4
1	3	0	52	1	1	84	0	10	100	7	0	99	97	6	23	55	1	16	1	100	69	100
Porcentaje de positividad																						

En el sistema API Coryne se obtuvieron variaciones en la reducción de nitrato en comparación con la prueba tradicional en tubo como se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8 Variaciones en Nitrato.

Identificación	Especie	Química tradicional (Nitrato)	API Corine (Nitrato)
4-4	Ovino	+	-
6-4	Ovino	+	-
728930	Ovino	+	-
1322	Ovino	+	-
028	Ovino	+	+
632835	Ovino	+	-
6-18	Ovino	+	-
694977	Ovino	+	-
616126	Ovino	+	-
694992	Ovino	+	+

A partir de las variaciones encontradas en los perfiles bioquímicos la hipótesis planteada perfilaba a ser aceptada.

Moleculares

Del total de los 69 aislamientos obtenidos por bacteriología y diagnosticados por pruebas bioquímicas y sistema comercial API Coryne, solo se logró caracterizar por PCR Multiplex (Pacheco *et al.*, 2007) un total de 60 muestras (86.95 %), la amplificación de tres genes: *16s* (816pb), *rpoB* (416pb) y *pld* (203pb) determinaría la identificación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* al ser oligos específicos de este género y especie. El perfil fue mostrado por la mayoría de los aislados (Figura 6). Sin embargo algunos aislados mostraron variación con perfiles diferentes en la amplificación del gen *16S*, línea 10. (Figura 7 y Figura 8). Un aislado en específico “colonia con crecimiento pardo amarillento” solo amplificó el

gen *rpoB* (Figura 9). En el cuadro 9 se muestran los aislados con variaciones en la amplificación del gen *16s*, en dicho cuadro se muestra la identificación, la especie animal y los genes amplificados.

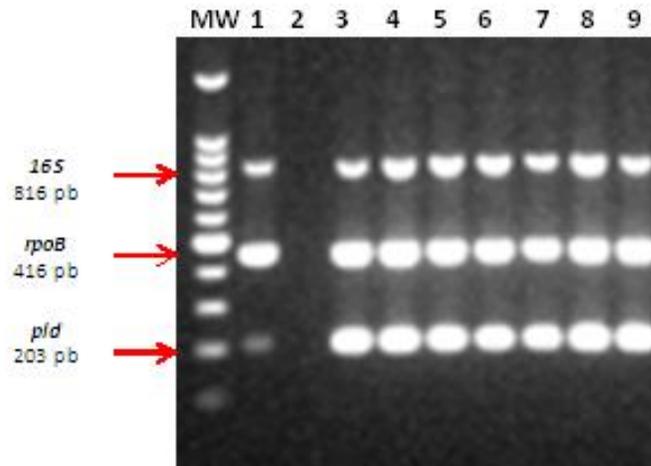


Figura 5 PCR Multiplex

Gel agarosa 1.5 %. **(MW)** Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). **(Línea 1)** Control positivo ATCC 43924. **(Línea 2)** muestra blanco. **(Líneas 3-9)** aislados *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

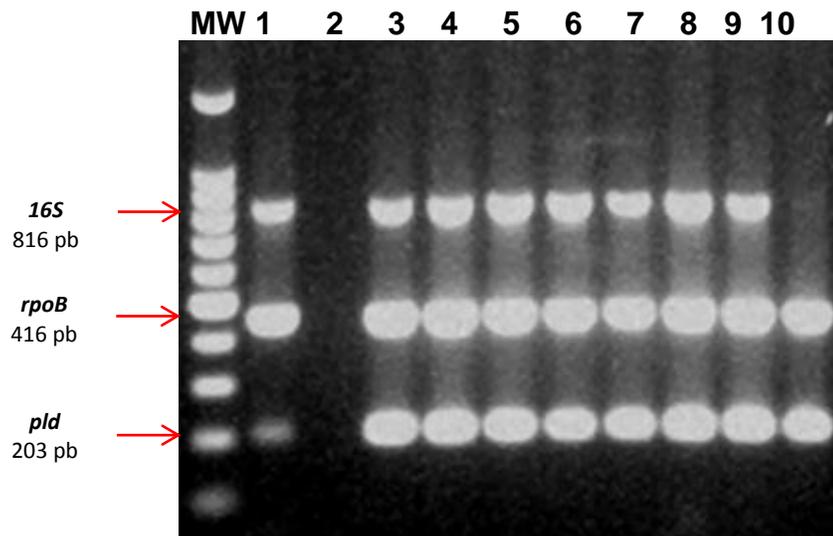


Figura 6 PCR Multiplex. Variación en la amplificación del gen 16S.

Gel agarosa 1.5 %. **(MW)** Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). **(Línea 1)** Control positivo ATCC 43924. **(Línea 2)** muestra blanco. **(Líneas 3-10)** aislados *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

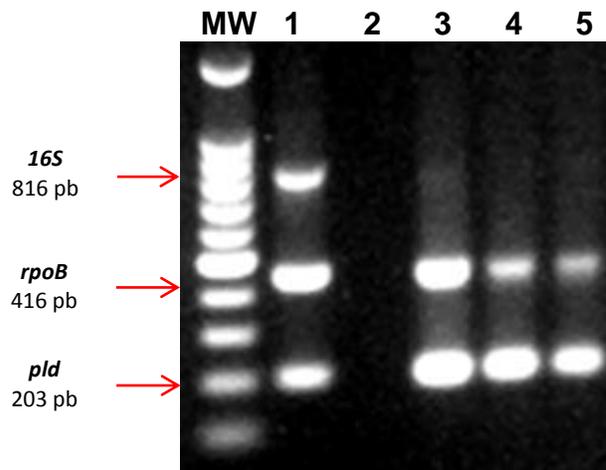


Figura 7 PCR Multiplex. Variación en la amplificación del gen 16s.
 Gel agarosa 1.5 %. **(MW)** Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). **(Línea 1)** Control positivo ATCC 43924. **(Línea 2)** muestra blanco. **(Líneas 3-5)** aislados *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

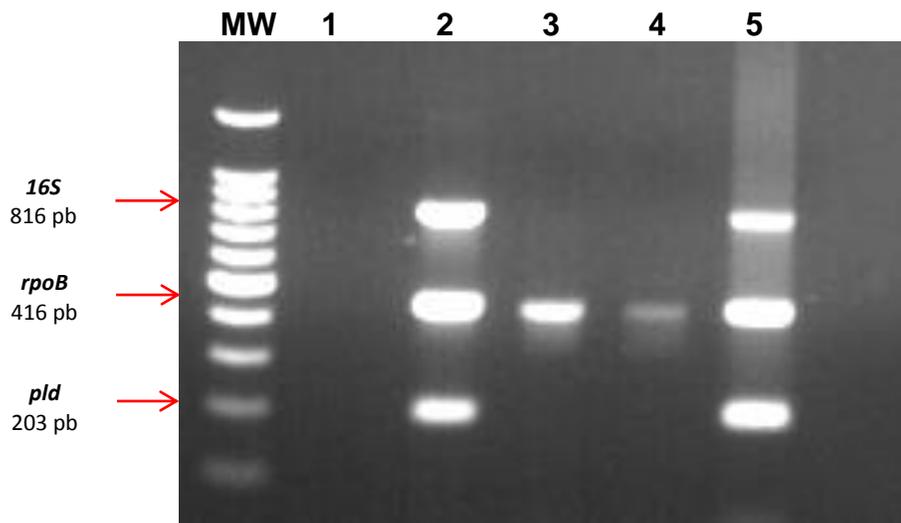


Figura 8 PCR Multiplex. Aislado con crecimiento pardo amarillento
 Amplificación del gen *rpoB*. Gel agarosa 1.5 %. **(MW)** Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). **(Línea 1)** muestra blanco **(Línea 2)** Control positivo ATCC 43924. **(Líneas 3 y 4)** aislado de *Corynebacterium spp.* Diferente concentración de ADN. **(Línea 5)** aislado *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Cuadro 9 Variación de los genes en el PCR Multiplex.

Aislado	Especie	Gen 16s (816 pb)	Gen <i>rpoB</i> (446 pb)	Gen <i>pld</i> (206 pb)
2-4	Caprino	-	+	+
002	Ovino	-	+	+
728917	Ovino	-	+	+
023b	Ovino	-	+	+
9-12	Ovino	-	+	+
024	Ovino	-	+	+
4-4	Ovino	-	+	+
701127	Ovino	-	+	+
694992	Ovino	-	+	+
028	Ovino	-	+	-

Genes de virulencia

De los 60 aislamientos caracterizados por PCR Multiplex (Pacheco *et al.*, 2012) solo en 59 (98.33%) de ellos se logró la identificación de los genes de virulencia *Fag C*, *Fag D* y *Fag A* mediante un PCR Multiplex montado en este estudio (Figura 10); sin embargo el gen *Fag B* solo se logró identificar en 58 (96.66%) de los aislamientos, en el carril 11 se muestra el aislado 3540 que no amplificó dicho gen (Figura 11). En el cuadro 10 se muestran los aislamientos que no amplificaron los

genes mencionados con anterioridad y en el cual destaca el aislamiento con crecimiento pardo amarillento.

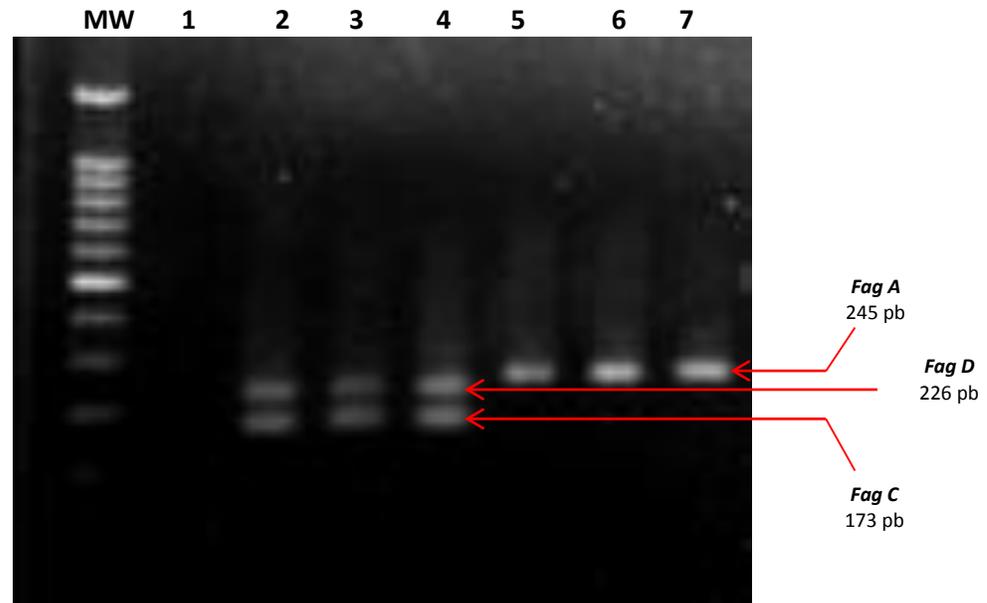


Figura 9 PCR Multiplex. Genes de virulencia Fag C-D y Fag A
 . Gel agarosa 2 %. **(MW)** Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). **(Línea 1)** muestra blanco, **(Línea 2-4)** Aislados de *C. pseudotuberculosis* gen Fag C-D, **(Líneas 5-7)** aislados de *Corynebacterium* gen *Fag A*.

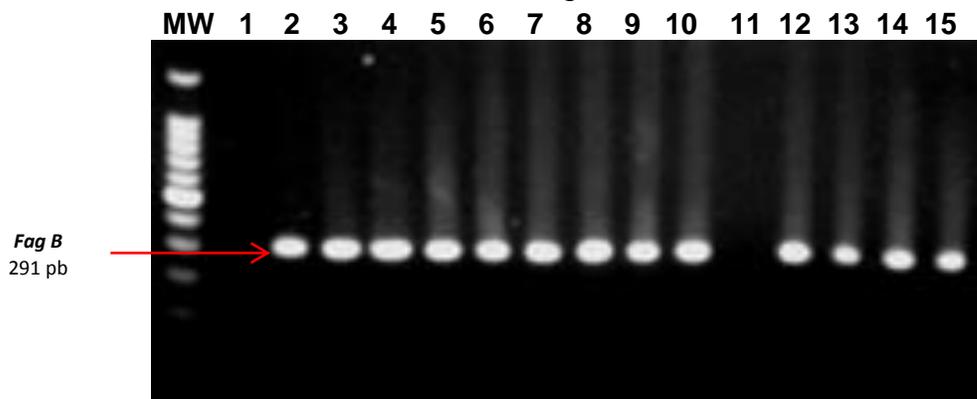


Figura 10 PCR sencillo. Gen de virulencia Fag B. Gel agarosa 2 %.
(MW) Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). **(Línea 1)** muestra blanco, **(Línea 2-15)** Aislados de *C. pseudotuberculosis*. **(Línea 11)** aislado 3540 que no amplifica dicho gen.

Cuadro 10 Aislamientos que no amplificaron genes de virulencia

Aislamiento o identificación	GENES IDENTIFICADOS						
	Gen <i>pld</i>	Gen <i>rpoB</i>	Gen <i>16s</i>	<i>Fag A</i>	<i>Fag B</i>	<i>Fag C</i>	<i>Fag D</i>
028 crecimiento pardo amarilleno Ovino hembra	-	+	-	-	-	-	-
3540 Ovino hembra	+	+	+	+	-	+	+

Análisis de secuencias

Los porcentajes de similitud de las secuencias parciales del gen *rpoB* del presente estudio analizadas en el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) NCBI oscilaron entre 98, 99 y 100 % con secuencias previamente reportadas en el resto del mundo como *C. pseudotuberculosis* (Figura 12), se demostró que 58 (96.66%) de las 60 secuencias del gen *rpoB* de los aislados del presente estudio corresponden a *C. pseudotuberculosis*; ya que un aislamiento tuvo errores de secuenciación y la secuencia restante de crecimiento pardo amarillento con identificación 028 (*rpoB* C53) corresponde a un *Corynebacterium xerosis* con un porcentaje de similitud del 100 % a una secuencia ya reportada (Figura 13) y además reportándose por primera vez en un absceso cutáneo de ovino.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain 29156, complete genome	715	715	100%	0.0	100%	CP010795.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain 226, complete genome	715	715	100%	0.0	100%	CP010889.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis 267, complete genome	715	715	100%	0.0	100%	CP003407.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis P54B96, complete genome	715	715	100%	0.0	100%	CP003385.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis PAT10, complete genome	715	715	100%	0.0	100%	CP002924.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis I19, complete genome	715	715	100%	0.0	100%	CP002251.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis C231, complete genome	715	715	100%	0.0	100%	CP001829.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain CD070 RpoB (rpoB) gene, partial cds	715	715	100%	0.0	100%	GQ409651.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain CIP 102968 RpoB (rpoB) gene, partial cds	715	715	100%	0.0	100%	AY492239.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium pseudotuberculosis strain N1, complete genome	710	710	100%	0.0	99%	CP013146.1

Figura 11 Porcentajes de Similitud del BLAST Gen Bank (NCBI) del gen rpoB de aislados de *C. pseudotuberculosis*.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Corynebacterium xerosis strain CIP 100653 RpoB (rpoB) gene, partial cds	689	689	99%	0.0	100%	AY492233.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium xerosis partial rpoB gene for RNA polymerase beta subunit, strain SI33874	669	669	98%	0.0	99%	FN179294.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium xerosis partial rpoB gene for RNA polymerase beta subunit, strain SI53244	667	667	96%	0.0	100%	FN179301.1
<input type="checkbox"/> Corynebacterium xerosis partial rpoB gene for RNA polymerase beta subunit, strain SI49327	662	662	95%	0.0	100%	FN179307.1

Figura 12 Porcentajes de Similitud del BLAST Gen Bank (NCBI) del gen rpoB del aislado de *Corynebacterium xerosis*.

Del análisis de secuencias en el programa MEGA. 5.2 se construyó el árbol filogenético (Figura 14) donde se muestra claramente la agrupación de los aislados del presente estudio 96 % (58/60) en la especie *C. pseudotuberculosis biovariedad ovis* de acuerdo a las cepas de referencia del Gen Bank; sin embargo dentro de la misma agrupación se observan pequeñas variaciones formando ramificaciones de poca distancia evolutiva entre ellas. Cabe destacar los aislamientos identificados como *rpoB C25* y *rpoB C60* los cuales corresponden aislados de cabra, dichos aislamientos son clones del género y especie *C. pseudotuberculosis biovariedad ovis* sin embargo poseen cierta variación

genética en algunos nucleótidos específicos lo cual las diferencia del resto del grupo. Además el análisis filogenético basado en el gen *rpoB* logro diferenciar a nivel sub especie ya que agrupó a *C. pseudotuberculosis biovariedad equi* en un clado diferente. Otro grupo de relevancia dentro del árbol filogenético es el de *C. xerosis* donde se encuentra uno de nuestros aislados identificado como *rpoB C53* con crecimiento pardo amarillento en gelosa sangre y el cual corresponde al primer reporte de esta especie en un absceso cutáneo en ovinos. Las secuencias parciales del presente estudio se compararon con secuencias de referencia del Gen Bank (NCBI) mostrados en la cuadro 3.

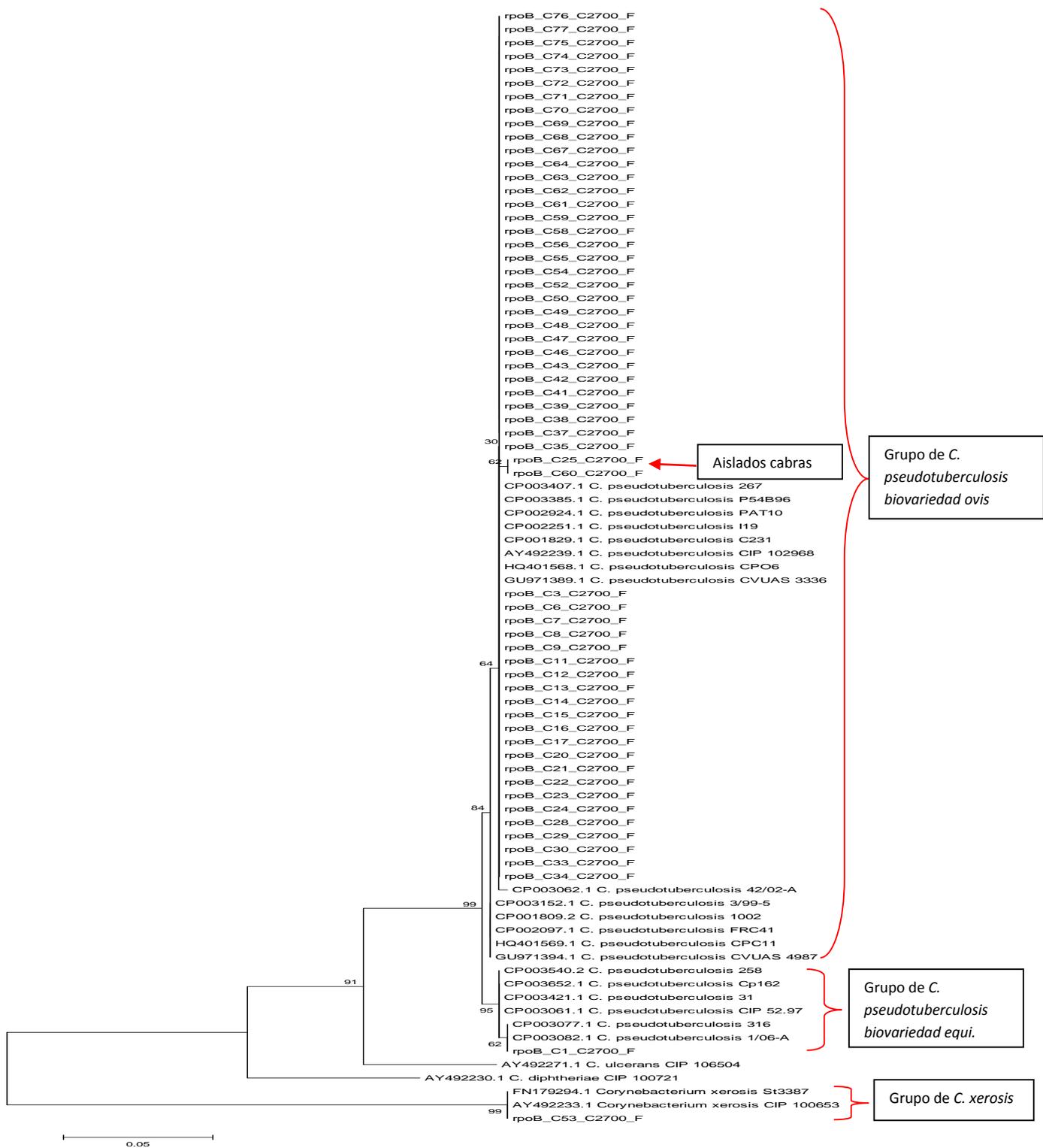


Figura 13 Árbol filogenético mediante el método Neighbor-joining.

El árbol fue derivado del alineamiento y porcentajes de similitud de la secuencia parcial del gen *rpoB*, se utilizó un valor bootstrap de 1000 repeticiones, se incluyeron los aislados *C. pseudotuberculosis* del presente estudio además de muestras de referencia del Gen Bank de las subespecies *ovis* y *equi*, una secuencia de referencia del *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium Diphtheriae* y *Corynebacterium xerosis*.

DISCUSIÓN

La ovinocultura y caprinocultura son actividades de importancia económica en México y en muchos países del mundo. En México predomina el sistema de producción estabulado; sin embargo el principal problema es que muchos productores no cuentan con las instalaciones adecuadas, pues en muchos casos son adaptaciones de otros sistemas productivos. Uno de los principales factores adversos en el mantenimiento de las instalaciones y en el equipo que favorece la de los patógenos que causan abscesos son la presencia de objetos punzocortantes aunado a los espacios reducidos que dan la oportunidad de que se provoquen laceraciones en la piel por donde ingresan los patógenos; dato ampliamente comprobado en el caso de *C. pseudotuberculosis* (Riet-Correa *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2012).

En México se sabe que la enfermedad de Linfadenitis caseosa causada por *C. pseudotuberculosis* está ampliamente difundida en las explotaciones ovinas y caprinas; sin embargo falta precisar estudios encaminados a la correcta identificación y diagnóstico de la enfermedad, como los estudios que ya se han realizado en otras regiones mundo Baird y Fortaine (2007).

En este trabajo se pudo observar una frecuencia de *C. pseudotuberculosis* del 33%, 69 aislamientos de 209 muestras identificados por bacteriología y pruebas bioquímicas a diferencia del estudio realizado por Zavošti *et al.*, 2012 donde obtuvieron una frecuencia del 12.60 % y donde reportan además aislamiento de otros microorganismos como el *Staphylococcus aureus* lo que coincide con este estudio y estudios reportados anteriormente como el de Bair y Fortaine (2007) y Robles *et al.*, (2007). Otros estudios reportan altas prevalencias como en Brasil (30%) (Langenegger *et al.*, (1991), 42.2% en Estados Arsenault *et al.*, (2003) y un estudio en México hallaron el 5,4% Ochoa *et al.*, (1996) lo cual explica la alta frecuencia encontrada en este estudio.

Se logró identificar por pruebas bioquímicas y sistema comercial Api Coryne diferentes perfiles bioquímicos de los aislados del presente estudio, mostrándose resultados similares a lo reportado por Soto *et al.*, (1994) donde se mostraron variaciones en los perfiles bioquímicos y donde concluyen que el sistema es capaz de identificar correctamente a nivel género, pero requiere pruebas adicionales para la subespecie, y a los resultados de Almuzara *et al.*, 2006 que reporta que el sistema API corine es útil para identificar las especies del género *Corynebacterium* pero la identificación para la especie es limitada lo cual explica nuestras variaciones.

El aislamiento e identificación bioquímica por sistemas tradicionales o kits comerciales para el género *Corynebacterium* pueden ser usados como métodos que permite la rápida y confiable identificación a pesar de la variaciones en los perfiles bioquímicos, como se observa en nuestro trabajo y a la sensibilidad reportada por otros autores que oscila en 90% (Soto *et al.*, 1994; Almuzara *et al.*, 2006, Huerta *et al.*, 2013). Sin embargo un porcentaje considerable requiere de pruebas adicionales para su correcto diagnóstico y especiación (Cetinkaya *et al.*, 2002).

La identificación molecular realizada en este estudio se basó principalmente en tres genes *16s*, *rpoB* y *pld* los cuales son de elección para la especie *C. pseudotuberculosis* como lo reportan diferentes autores entre los que destaca Cetinkaya *et al.*, 2002 quien demostró que su PCR basado en el gen *16s* era eficaz para el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis*; sin embargo, no era capaz de diferenciar *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans* y por lo cual recomienda incluir el gen *pld* para hacer la prueba más sensible y específica. De un total de 96 aislamientos solo logro identificar por esta técnica al 96.87 % (93/96), lo que coincide con el presente estudio 83.33% (50/60) lo cual podría explicar la no amplificación del gen *16s* en el 16.66% de nuestras muestras; debido a que

primers no son completamente sensibles y específicos para este género y especie de *Corynebacterium*, con lo cual se requiere incluir genes de mayor polimorfismo como el *rpoB* mencionado por Khamis *et al.*, (2004, 2005) quien realizó un estudio donde comprobó una área polimórfica de este gen y un estudio de identificación de *C. pseudotuberculosis* basado en el gen *rpoB* donde concluye que la secuencia parcial de este gen es una simple y eficiente forma de identificación en la práctica clínica; además por ser de tamaño más pequeño que el *16s* se facilita su secuenciación. En otro estudio importante del gen *rpoB* realizado por Retamal *et al.*, 2011 donde comprobó el alto polimorfismo de este gen al lograr diferenciar por análisis filogenético los genotipos de ovinos y caprinos, lo cual resulta similar a nuestro estudio donde logramos diferenciar dos aislados de caprino dentro del mismo grupo de *C. pseudotuberculosis biovariedad ovis* pero con genotipo diferente.

El PCR establecido por Pacheco *et al.*, 2007 e incluido en este estudio muestra la alta sensibilidad y especificidad de la técnica para el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis biovariedad ovis*, ya que se incluye el uso de primers para el gen *pld* que excluye al *C. ulcerans* quien cuenta con este mismo gen, evitando diagnósticos erróneos y resolviendo el problema presentado en el estudio previo por Cetinkaya, *et al.*, 2002. Resultados similares a los de Pacheco fueron obtenidos en nuestro estudio al identificar al 83.33% (50/60) de nuestros aislamientos como *C. pseudotuberculosis* de acuerdo al patrón de bandas de los tres genes *16s*, *rpoB* y *pld*. Sin embargo la no amplificación del gen *16s* en algunos aislados requiere llevar a cabo análisis filogenéticos basados en el gen *rpoB* para un diagnóstico preciso (Khamis *et al.*, 2004 y 2005; Pacheco *et al.*, 2007; Adderson *et al.*, 2008; Retamal *et al.*, 2011; Pavan *et al.*, 2012).

Los genes de virulencia *Fag A*, *Fag B*, *Fag C* y *Fag D* que codifican respectivamente para proteína integral de membrana, enterobactina transportadora de hierro, proteína de unión de ATP a membrana citoplasmática y

proteína siderófora de unión de hierro son considerados de gran importancia como subunidades fimbriales, genes para la absorción de hierro, elementos de inserción y toxinas secretadas y genes muy relacionados al *pld* contribuyendo a la virulencia de *C. pseudotuberculosis*. (Sá et al., 2013); es decir la presencia de estos genes incrementa la virulencia de *C. pseudotuberculosis*. Sá et al., 2013 logró identificar dichos genes *Fag A* y *Fag B* en el 100% de los aislados, *Fag C* en el 99.40 % y *Fag D* en el 95.23% además del *pld* en el 100 % de sus aislados y menciona que los aislados donde se identificaron todos los genes fueron los más virulentos y correspondían en su mayoría a lesiones en órganos internos. Los resultados del presente estudio son muy similares al estudio previo puesto que el gen *pld* se identificó en el 100% de los aislados, en el 98.33% se logró la identificación de los genes de virulencia *Fag C*, *Fag D* y *Fag A*; sin embargo el gen *Fag B* solo se logró identificar en el 96.66% de los aislamientos. La diferencia más importante de este estudio con el previo es que todos los aislados fueron obtenidos de lesiones superficiales, lo que nos indica la alta virulencia de estos. Esto contribuye a tener un cepario caracterizado fenotípicamente y genotípicamente que pueda ser usado en estudios posteriores para modelos de vacunas y bacterinas contra *C. pseudotuberculosis* (Billington et al., 2002; Sá et al., 2013)

Los análisis filogenéticos basados en el gen *rpoB* son ahora considerados los de elección para *C. pseudotuberculosis*, ya que demuestran un alto grado de polimorfismo que ayuda a diferenciar a nivel sub especie a diferencia del *16 s* (Khamis et al., 2004 y 2005; Retamal et al., 2011; Pavan et al., 2012). En el presente estudio se logró demostrar de la misma manera que el gen *rpoB* es el de elección para análisis filogenéticos ya que nos permitió diferenciar a nivel sub especie nuestros aislados, y permitió además identificar el primer aislamiento de *C. xerosis* en un absceso cutáneo. Cabe mencionar que con el análisis de secuencias del gen parcial *rpoB* se lograron observar pequeñas variaciones genotípicas puntuales a nivel de nucleótidos entre nuestros aislados.

Además el punto de mayor relevancia de acuerdo a la hipótesis planteada en el presente estudio es que el análisis filogenético basado en la secuencia parcial del gen *rpoB* nos permitió aceptar nuestra hipótesis; ya que efectivamente existen diferencias genotípicas puntuales entre nuestros aislados de acuerdo a la especie de donde fueron aislados y variaciones dentro de la misma especie como lo reportado en estudios previos donde muestran resultados similares al encontrar diferentes genotipos (Connor *et al.*, 2000; Estefanska, *et al.*, 2008; Dorneles *et al.*, 2012; Hoelzle *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

La linfadenitis caseosa es una enfermedad que afecta gravemente a las explotaciones ovinas y caprinas en México, el conocer las técnicas diagnósticas adecuadas para la identificación del agente causal, además de la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas circulantes en el país permitirá establecer medidas preventivas y profilácticas encaminadas a la creación de inmunógenos efectivos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Este estudio representa la caracterización de aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en una región específica en México, sin embargo consideramos realizar un estudio más completo por regiones; que permita conocer a profundidad las cepas circulantes y poder identificar más variaciones importantes entre estas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adderson, Elisabeth E., Jan, W Boudreaux., Jessica, R Cummings., Stanley, Pounds., Deborah, A Wilson., Gary, W Procop., Randall, T Hayden., 2008. Identification of Clinical Coryneform Bacterial Isolates: Comparison of Biochemical Methods and Sequence Analysis of 16S rRNA and *rpoB* Genes. *Journal Of Clinical Microbiology*. 921–927.
2. Aguilar, FC., Cardoso, SB., Ciriaco, ALT., 1994. "Occurrence of caseous lymphadenitis in sheep and goat breed in a semi- confinement system in northern region of the state of ceara in Brazil". *Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Acapulco México*. 73.
3. Aleman, M., Spier, SJ., 2001. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In *Large Animal Internal Medicine* 3 ed. 1078-1084.
4. Aleman, M., Spier, SJ., Wilson, WD., Doherr, M., 1996. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982–1993). *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. 209, 804–809.
5. Almuzara, MN., C, De Mier., CR, Rodríguez., AMR, Famiglietti., CA, Vay., 2006. Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la identificación de bacilos gram-positivos difteroides de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología*. 38, 197-201.
6. Anderson, DE., Rings, DM., Kowalski, J., 2004. Infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in five alpacas. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. 225, 1743–1747.
7. Andrade, JSL., Azevedo, SS., Andreey, JAT., Higino, SSS., Azevedo, EO., 2012. Occurrence and risk factors associated with the *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and goats from the semiarid region of the Paraíba state, Northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 32, 116-120.
8. Arsenault, JC., Girard, P., Dubreuil, D., Daignault, JR., Galarneau, J., Boisclair, Simard., Belanger, D., 2003. Prevalence of and carcass condemnation from *Maedivisna*, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Québec Canada. *Prev. Vet. Med.* 30 (59), 67-81.
9. Baird, GJ., Fontaine, MC., 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*. 137, 179–210.

10. Barrientos, P.J.S., García, GDA., Cuellar, OJA., Garcia, VS., 1996. Distribución de lesiones de linfadenitis caseosa en ovinos Libro Resúmenes del XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Brasil. 495, 252
11. Batey, RG., 1986. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at Western Australian abattoir. *American Journal of Veterinary Research*. 47, 482-485.
12. Batey, RG., 1986. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.* 63, 269-272.
13. Biberstein, EL., Knight, HD., Jang, S., 1971. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Rec.* 89, 691-692.
14. Billington, Stephen J., Paula, A Esmay., J, Glenn Songer., B, Helen Jost., 2002. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*. 208, 41-45.
15. Bogdan, JR., Newlands-Monteith, CF., Ellis, JA., 1997. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56, 299-310.
16. Braga, W., Schul, S., Nu, A., Pezo, D., Franco, E., 2007. A primary *Corynebacterium pseudotuberculosis* low dose infection in alpacas (*Lama pacos*) protects against a lethal challenge exposure. *Small. Rumin. Res.* 72, 81-86.
17. Braga, WU., Chavera, A., Gonzalez, A., 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in highland alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Veterinary Record*. 159, 23-24.
18. Brogden, KA., Cutlip, RC., Lehmkuhl, HD., 1984. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. *Am. J. Vet. Res.* 45, 1532-1534.
19. Brown, CC., Olander, HJ., 1987. Caseous Lymphadenitis of Goat and Sheep: A Review. *Veterinary Bulletin*. 57, 1-12.
20. Buck, GA., Cross, RE., Wong, TP., Loera, J., Groman, N., 1985. DNA relationships among some tox-bearing corynebacteriophages. *Infect. Immun.* 49, 679-684.
21. Cerdeño, AM., Efstratiou, A., Dover, LG., Holden, MTG., Pallen, M., Bentley, SD., Besra, GS., Churcher, C., James, KD., De Zoysa, A., Chillingworth, T., Cronin, A., Dowd, L., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Quail, MA., Rabinowitsch, E., Rutherford, KM., Thomson, NR., Unwin,

- L., Whitehead, S., Barrell, BG., Parkhill, J., 2003. The complete sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13929. *Nucleic Acids Res.* 31, 6516-23.
22. Cetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T., Vaneechoutte, M., 2002. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiology.* 88, 75-83.
23. Chaplin, PJ., De Rose, R., Boyle, JS., McWaters, P., Kelly, J., 1999. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 67, 6434-6438.
24. Chirino, C., Scaramelli, A., Rey, C., 2005. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan gota flocks. *Small Rumin Res.* In Press.
25. Cianciotto, N., Groman, N., 1985. A beta-related corynebacteriophage which lacks a tox allele but can acquire it by recombination with phage. *Infect. Immun.* 49, 32–35.
26. Cianciotto, N., Rappuoli, R., Groman, N., 1986. Detection of homology to the beta bacteriophage integration site in a wide variety of *Corynebacterium* ssp. *J. Bacteriol.* 168, 103–108.
27. Connor, KM., Quirie, MM., Baird, G., Donachie, W., 2000. Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology.* 38 (7), 2633-2637.
28. Costa, LRR., Spier, SJ., Hirsh, DC., 1998. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Vet. Microbiol.* 62, 135–143.
29. Costa, MP., John, AM., Síntia, SA., Fernanda, AD, Cristina, TF., Diana, MO, Maria, FST., Ewa, L., Barbara, L., Roberto, M., Ricardo, WP., Sérgio, CO., Anderson, M and Vasco, A. 2011. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. *BMC Research Notes*, 4, 243.
30. Coyel, M., Lipsky, B., 1990. Coryneforme bacteria in infectious diseases: clínica and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 227-246.
31. D'Afonseca, V., Moraes, PM., Dorella, FA., Pacheco, LCG., Meyer, R., Portela, RW., Miyoshi, A., Azevedo, V., 2008. A description of genes of

- Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular Research*. 7(1), 252-260.
32. De Rose, R., Tennent, J., McWaters, P., Chaplin, P.J., Wood, P.R., 2002. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 55-63.
 33. Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*. 37, 201–218.
 34. Dorneles, Elaine M. S., Jordana, A. Santana., Dayana, Ribeiro., Fernanda, Alves Dorella., Alessandro, S. Guimaraes., Mohamed, S. Moawad., Salah, A. Selim., Ana Luiza, M. Garaldi., Anderson, Miyoshi., Márcio G. Ribeiro., Aurora, MG. Gouveia., Vasco Azevedo, Marcos, B. Heinemann., Andrey, P. Lage., 2014. Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates. *PLOS ONE*. 9, 6.
 35. Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., Raoult, D., 2001. Sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3623-30.
 36. Eggleton, D.G., Middleton, H.D., Doidge, C.V., Minty, D.W., 1991. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J.* 68, 317-319.
 37. El-Enbaawy, M.I., Saad, M.M., Selim, S.A., 2005. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Egypt. J. Immunol.* 12, 13-19.
 38. Ellis, J.A., 1988. Immunophenotype of pulmonary cellular infiltrates in sheep with visceral caseous lymphadenitis. *Vet. Pathol.* 23, 362-368.
 39. Ellis, J.A., Campos, M., Snyder, M., Chelak, B., Haines, D.M., 1995. Local production of tumor necrosis factor-alpha in corynebacterial pulmonary lesions in sheep. *Vet. Pathol.* 32, 68-71.
 40. Funke, G., Von, Graevenitz., Clarridge, A., JE and Bernard, K.A., 1997. Clinical Microbiology of Coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 125-159.
 41. González, C., Jorge, M.C., Zeballos, H., West, M., Mateos, E., Yotti, C., 1991. Actualización y estudio de situación de la Linfadenitis caseosa de los lanares en el partido de Tandil. *Veterinaria Argentina*. 3(75), 304-310.

42. Groman, N., Schiller, J., Russell, J., 1984. *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* responses to DNA probes derived from corynephage and *Corynebacterium diphtheria*. *Infect. Immun.* 45, 511–517.
43. Hodgson, ALM., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, LA., McCollMand, CA. 1999. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D. *Vaccine.* 17, 802-808.
44. Hoelzle, Ludwig E., Tanja, Scherrer., Jeanette, Muntwyler., Max, M Wittenbrink., Werner Philipp., Katharina, Hoelzle., 2013. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. *Veterinary Microbiology.* 164, 359–365.
45. Hommeze, J., Devriese, LA., Vaneechoutte, M., Riegel, P., Butaye, P., Haesebrouck. F 1999. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 954-957
46. Hou, XG., Kawamura, Y., Sultana, F., Hirose, K., Miyake, M., Otsuka, Y., Misawa, S., Oguri, T., Yamamoto, H., Ezaki, T., 1997. Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes. *Microbiol. Immuno.* 41, 453–460.
47. Huerta, Belén., Lidia, Gómez-Gascón., Ana, I Vela., José, F Fernández-Garayzábal., Almudena, Casamayor., Carmen, Tarradas., Alfonso, Maldonado., 2013. Comparison of two biochemical methods for identifying *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats. *The Veterinary Journal.* 196, 552–554.
48. Irwin, MR., Knight, HD., 1975. Enhanced resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in levamisole-treated mice. *Infect. Immun.* 12, 1098-1103.
49. Join-Lambert, OF., Ouache, M., Canioni, D., Beretti, JL., Blanche, S., Berche, P., Kyal, S., 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 25, 848- 851.
50. Jones, D., Collins, MD., 1986. Irregular, nonsporng Gram-positive rods, in: Smeath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore. 1261–1282.

51. Judson, R., Songer, J.G., 1991. *Corynebacterium pseudotuberculosis* in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Veterinary Microbiology*. 27, 145-50.
52. Kaba, J., Kutschke, I., Gerlach, G.F. 2001. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Vet. Microbio.* 78 (2), 155-63.
53. Khamis, A., Raoult, D., La Scola, B., 2004. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3925-31.
54. Khamis, A., Raoult, D., La Scola, B., 2005. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1934-6.
55. Laak, E.A., Bosch, J., Bijl, C.G., Schreuder, B.E.C., 1992. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *American Journal of Veterinary Research*. 53(7), 1125-1132.
56. Lan, D.T., Taniguchi, S., Makino, S., Shirahata, T., Nakane, A., 1998. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 42, 863-870.
57. Langenegger, H., Langenegger, J., Scherer, P.O., 1991. Prevalencia e diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos do estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 7 1/2, 1-7.
58. Leardini, N., Prieto, M., Martinez, C., Aguerre, I., Loaysa, R., 2002. Infecciones por Bacilos Gram Positivos Aeróbicos, Corinebacterias, Bacillus y Actinomyces. En Curso A.N.L.I.S. "Dr Carlos Malbrán. Departamento de Bacteriología, Servicio de Bacteriología Especial.
59. León, I., Garrido, F., Gonzalez, Candela., Cubero, M., Pablo, M.J., 2002. Anatomía patológica de la pseudotuberculosis. *Rev. Ovis*.
60. Lipsky, B.A., Goldberger, A.C., Tompkins, I.S., Plorde, J.S., 1982. Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. *Rev. Infect. Dis.* 4, 1220-1235.
61. Literak, I., Horvathova, A., Jahnova, M., Rychlik, I., Skalka, B. 1999. Phenotype and genotype characteristics of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. *Small Ruminant Res.* 32, 107-111.
62. Lopes, Bastos., Wagner, R., Dias, P., Dorella, F.A., Ribeiro, D., Seyffert, N., Castro, TLP., Miyoshi, A., Costa, S., Meyer, R., Azevedo, V., 2012.

Corynebacterium pseudotuberculosis: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J. Clin. Cell. Immunol.* S4.

63. Malone, FE., Fee, SA., Kamp, EM., King, DC., Baird, GJ., O'Reilly, KM., Murdock, FEA., 2006. A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of sheep. *Irish Veterinary Journal.* 59, 19-21.
64. Menzies, PI., Muckle, CA. 1989. The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. *Can. J. Vet. Res.* 53(3), 313-318.
65. Merchant, A., Parcker, RCA., 1980. *Bacteriología y Virología Veterinaria* 3ra. Edición. Acribia. Zaragoza.
66. Middleton, MJ., Epstein, VM., Gregory, GG., 1991. Caseous lymphadenitis on Flinder Island: prevalence and management surveys. *Australian Veterinary Journal.* 68 (9), 311-312.
67. Moller, K., Agerholm, JS., Ahrens, P., Jensen, NE., Nielsen, TK., 2000. Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. *J. Vet. Med. B.* 62, 55-62.
68. Muckle, C.A., Gyles, CL., 1982. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine.* 46, 206-208.
69. Nairn, ME., Robertson, JP., McQuade, NC., 1977. The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination. *Proceedings 54th Annual Conference of the Australian Veterinary Association.* 159-161.
70. Ochoa, UG., IJ, Deuces., LP, Martínez., BMR, Jiménez., RM, Pérez., 1996. "Aislamiento de agentes bacterianos a partir de exudados nasales en rebaños ovinos trashumantes de Xalatlaco México" Abstract de Libro Resúmenes del XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Brasil. PN9. 12909, 230.
71. Pacheco, LGC., Pena, RR., Thiago, LP., Dorella, FA., Bahia, RC., Marcilio, MC., Frota, NL., Oliveira, SC., Meyer, R., Alves, SF., Miyoshi, A., Azevedo, V., 2007. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology.* 56, 480-486.
72. Paton, MW., Rose, IR., Hart, RA., Sutherland, SS., Mercy, AR., Ellis, TM., 1994. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust Vet J.* 71, 47-9.

73. Paule, BJA., Azevedo, V., Regis, LF., Carminati, R., Bahia, R., 2003. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 129-139.
74. Pavan, ME., C, Robles., FM, Cairó., R, Marcellino., MJ, Pettinari., 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.
75. Peel, MM., Palmer, GG., Stacpoole, AM., Kerr, TG., 1997. Human lymphadenitis due *Corynebacterium pseudotuberculosis*: "report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* 24, 185-191.
76. Pekelder, JJ., 2000. Caseous lymphadenitis. In *Diseases of Sheep.* Blackwell Science Oxford. 270–274.
77. Pépin, M., Pardon, P., Marly, J., Lantier, F., 1988. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in external ear. *American Journal of Veterinary Research.* 49 (4), 459-463.
78. Pépin, M., Seow, HF., Corner, L., Rothel, JS., Hodgson, AL., 1997. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.* 28, 149-163.
79. Pinto, AC., Caracciolo, PH., Gomes de Sá, R., Ramos, TJ., Barbosa, S., P Melo Barbosa, H., Ribeiro, AC., Silva, WM., Rocha, FS., Santana, MS., Castro, TLP., Miyoshi, A., Schneider, M., Silva, S., Azevedo, V., 2014. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics.* 15–14.
80. Real, VF., León, VL., 1990. La linfadenitis caseosa ovina por *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Estudio clínico e inmunoprevención mediante BCG (Bacilo de Calmette y Guerin)" *Med. Vet.* 7 (12), 681—688.
81. Renaud, FN., Le, Coustumier A., Wilhem, N., Aubel, D., Riegel, P., Bollet, C., Freney, J., 2007. *Corynebacterium hansenii* sp. nov., an H-glucosidase-negative bacterium related to *Corynebacterium xerosis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1113-6.
82. Retamal, Patricio., Marco, Ríos., Felipe, Cheuquepán., Pedro, Abalos., José, Pizarro-Lucero., Consuelo, Borie., Josefina, Gutierrez., 2011. Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis rpoB* gene sequence. *Veterinary Microbiology.* 151, 400–403.

83. Rezazadeh, Zavoshti Fereydon., Amir, Babak Sioofy Khoojine., Javad, Ashrafi Helan Belal Hassanzadeh., Ali, Akbar Heydari., 2012. Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Comp. Clin. Pathol.* 21, 667–671.
84. Riegel, P., Ruimy, R., De Briel, D., Prévost, G., Jehl, F., Christen, R., Monteil, H., 1995. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. Rev. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 271–276.
85. Riet-Correa F. 2007. Linfadenite caseosa, In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A., Borges J.R. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria. pp.347-352.
86. Robles, CA., 2007. South America Patagonia. In *Diseases of Sheep*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford. 524–534.
87. Ruiz, CJ., Vívian, DA., Artur, S., Amjad, A., Anne, CP., Anderson, RS., Aryanne, AMC., Rocha, DOL., Fernanda, AD., Luis, GC., Pacheco, MP., Costa, MZ., Turk, NS., Pablo MRO., Moraes, SC., Soares, SSA., Thiago, LP., Castro, VAC., Abreu, ET., Jan, B., Andreas, T., Maria, PC., Schneider, John McCulloch., Louise, T Cerdeira., Rommel, TJ Ramos., Adhemar, Zerlotini., Anderson, Doinitini., Daniela, M Resende., Elisângela, M Coser., Luciana, M Oliveira., André, L Pedrosa., Carlos, U Vieira., Cláudia, T Guimaraes., Daniela, C Bartholomeu., Diana, M Oliveira., Fabrício, R Santos., Élide, Mara Rabelo., Francisco, P Lobo., Glória, R Franco., Ana, Flávia Costa., Ieso, M Castro., Sílvia, Regina Costa Dias., Jesus, A Ferro., José, Miguel Ortega., Luciano, V Paiva., Luiz, R Goulart., Juliana, Franco Almeida., Maria, Inés T Ferro., Newton, P Carneiro., Paula, RK Falcao Priscila Grynberg., Santuza, MR Teixeira., Sérgio, Brommonschenkel., Sérgio, C Oliveira., Roberto, Meyer., Robert, J Moore., Anderson, Miyoshi., Guilherme, C Oliveira., Vasco, Azevedo., 2011. Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. *PLoS ONE*. 6, 4.
88. Ruiz, J., Quintana, M., Barrera, M. 1995. Aislamiento y clasificación Bioquímica de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la provincia de La Habana. *Rev. Salud. Vet.* 17, 307-309
89. Ruiz, L., Jerónimo, R., Barrera Valle, M., Frias, MT., 2007. Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. *RECVET*. 2 (8).
90. Sá, de Aquino Maria da Conceição., AMC, Gisele VG., Carina da, CK., Josir, LAV., Ana, LMG and Mateus MC., 2013. Distribution of PLD and Fag

- A, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genetics and Molecular Biology*. 36, 2, 265-268.
91. Selim, SA., 2001. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. *Journal of Veterinary Medicine. B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 241–258.
 92. Selvy, PE., Lavieri, RR., Lindsley, CW., Brown, HA., 2011. Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chemical Reviews*. 111, 6064-6119.
 93. Shigidi, MT., 1974. Antigenic relationship of various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* 22 (3), 263-269.
 94. Silva, M., Wanderson, Núbia Seyffert, Agenor V., Santos, Thiago LP Castro., Luis, GC Pacheco., Anderson, R Santos., Alessandra, Ciprandi., Fernanda, A Dorella., Héliida, M Andrade., Debmalya, Barh., Adriano, MC Pimenta., Artur, Silva., Anderson, Miyoshi., Vasco, Azevedo., 2013. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. *Microbial Pathogenesis*. 61-62, 37-42.
 95. Simmons, CP., Dunstan, SJ., Tachedjian, M., Krywult, J., Hodgson, ALM. 1998. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 66, 474-479.
 96. Simmons, CP., Hodgson, ALM., Strugnell, RA., 1997. Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun.* 65, 3048-3056.
 97. Soares, C., Siomar, C., Eva, Trost., Rommel, TJ Ramos., Adriana, R Carneiro., Anderson, R Santos., Anne, C Pinto., Eudes, Barbosa., Flávia, Aburjaile., Amjad, Ali., Carlos, AA Diniz., Syed, S Hassan., Karina, Fiaux., Luis, C Guimarães., Syeda, M Bakhtiar., Ulisses, Pereira., Sintia, S Almeida., Vinícius, AC Abreu., Flávia, S Rocha., Fernanda, A Dorella., Anderson, Miyoshi., Artur, Silva., Vasco, Azevedo., Andreas, Tauch., 2013. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. *Journal of Biotechnology*. 167, 135–141.
 98. Songer, GJ., Beckenbach, K., Marshall, M., Olson, GB., Kelley, L., 1988. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*. 49, 223-226.

99. Soriano, F., Tauch, A., 2008. Microbiological and clinical features of *Corynebacterium urealyticum*: urinary tract stones and genomics as the Rosetta stone. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 632-43.
100. Soto, A., J, Zapardiel., F, Soriano., 1994. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. *J. Clin. Pathol.* 47, 756-759.
101. Spier, SJ., Whitcomb, MB., 2007. Miscellaneous Gram-positive bacterial infections In *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Equine Infectious Diseases.* 263–269.
102. Stanford, K., Brogden, KA., McClelland, LA., Kozub, GC., Audibert, F., 1998. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.* 1, 38-43.
103. Stefańska, Ilona., Magdalena, Rzewuska., And Marian Binek., 2008. Evaluation of Three Methods for DNA Fingerprinting of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains Isolated from Goats in Poland. *Polish Journal of Microbiology.* 57 (2), 105-112.
104. Stefańska, I., Gieryńska, M., Rzewuska, M., Binek, M., 2010. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Pol. J. Vet. Sci.* 13, 143-149.
105. Sutherland, SS., Hart, RA., Buller, NB., 1996. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. *Vet. Microbiol.* 49, 1–9.
106. Tadich, N., Álvarez, T., Chacon, H., Godoy., 2005. Linfadenitis Caseosa (LAC) en ovinos en la XI Región Chile. *Arch. med. vet.* 37 (2), 161-167.
107. Takahashi, T., Mori, Y., Kobayashi, H., Ochi, M., Kikuchi, N., Hiramune, T., 1997. Phylogenetic positions and assignments of swine and ovine corynebacteria isolated based on the 16S rDNA sequence. *Microbiol. Immunol.* 41, 649–655.
108. Tashjian, JJ., Campbell, SG., 1983. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. *Am. J. Vet. Res.* 44, 690-693.
109. Tauch, A., Trost, E., Tilker, A., Ludewig, U., Schneider, S., Goesmann, A., Bekel, T., Brinkrolf, K., Brune, I., Götter, S., Kalinowski, J., Kamp, PB., Lobo, FP., Viehoveer, P., Weisshaar, B., Soriano, F., Dröge, M., Pühler, A., 2008. The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete

- genome sequence established by pyrosequencing. *J. Biotechnol.* 136, 11-21.
110. Tauch, A., Kaiser, O., Hain, T., Goesmann, A., Weisshaar, B., Albersmeier, A., Beket, T., Bischoff, N., Brune, I., Chakraborty, T., Kalinowski, J., Meyer, F., Rupp, O., Schneider, S., Viehoveer, P., Pühler, A., 2005. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* 187, 4671-82.
111. Ter, EA., Bosch J., bijl GC., Schreuder, BE., 1992. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 53(7), 1125-1132.
112. Valencia, MC., Villalta, MP., García J., Gironés, O., Muzquiz, JL., Alonso, JL. 1987. Técnica de inmunofluorescencia indirecta aplicada a la detección de anticuerpos frente a la célula de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis. *Med. Vet.* 4, 7-8.
113. Vaneechoutte, M., Riegel, P., De Briel, D., Monteil, H., Verschraegen, G., De Rouck, A., Claeys, G., 1995. Evaluation of applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*, *Res. Microbiol.* 146, 633–641.
114. Vaughan, B., Whitcomb MB., Pratt, SM., Spier, SJ. 2004. Ultrasonographic Appearance of Abdominal Organs in 14 Horses with Systemic *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection. In: 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver, CO, USA, (Ed.). Publisher: American Association of Equine Practitioners, Lexington KY. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca. NY.
115. Vay, CM., Almuzara. 2002. Actualización en bacilos Gram positivos, taxonomía, identificación e importancia clínica. En II Simposio de infectología y Microbiología Clínica.
116. Williamson, LH., 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice.* 17, 359-371.
117. Windsor, PA., 2011. Control of caseous lymphadenitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 27, 193–202.
118. Yeruham, I., D, Elad., M, Van-Ham., NY, Shipigel., S, Perl., 1997. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. *Veterinary Record.* 140, 423-427.

119. Yeruham, I., Y, Braverman., Shipigel, NG., Chizov-Ginzburg, A., Saran, A., 1996. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. *I. Vet. Quart.* 18(3), 87-89.
120. Zaki, MM., 1976. Relation between the toxogenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infects mice. *Res. Vet. Sci.* 20, 197-200.
121. Zavoshti, Fereydon Rezazadeh., Amir, Babak Sioofy Khoojine., Javad, Ashrafi Helan., Belal, Hassanzadeh., Ali, Akbar Heydari., 2012. Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Comp. Clin. Pathol.* 21, 667–671.

ANEXOS

Anexo 1. Aislados de *C. pseudotuberculosis*.

Identificación	Municipio	Estado	Localidad	Condicion Corporal	Especie	Sexo	Raza	lugar obtencion	Tamaño de absceso	Características	Color	Tipo de exudado
(2-4)668478	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Santa FE	BUENA	CAPRINO	HEMBRA	ALPINA	CABEZA	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
(9-19)	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Matatlan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROSO
((031)) 682064	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	5.1 A 10 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
((045)) 270	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	5.1 A 10 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
((039)) 978	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	BLACKPELLEY	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
((002)) 671673	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Coyotes	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CAUDAL	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
51AA												
((005)) 848W2009	ZAPOTLANEJO	JALISCO	El Trapiche	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
((005)) 848W2009	ZAPOTLANEJO	JALISCO	El Trapiche	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
(9-15)	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Matatlan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
728917	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
((0238)) 8144	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CAUDAL	5.1 A 10 CM	DURA	AMARILLO	PURULENTO
((044)) 732612	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	AMARILLO	SEROSO
(2-6) 5588122	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Santa FE	BUENA	CAPRINO	HEMBRA	ALPINA	CABEZA	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
(8-3) 474	ACATIC	JALISCO	Acatic	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIGUEY	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
(9-12)	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Matatlan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
3579	TEPATITLAN	JALISCO	Santa FE	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
632935	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Lomas de Sai	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
((0338)) 635816	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
((024)) T116	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	MACHO	PELIFORK	CUELO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
52 (4-4)	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Tauquilla	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SANGUINOLENTO
3582	TEPATITLAN	JALISCO	Pescadero	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
59 (1-6)	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Santa FE	BUENA	CAPRINO	HEMBRA	SAANEN	INGUINAL	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
728402 (5-8) 5923	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Zapotlanejo	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	5.1 A 10 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
(4-3) 1134	ZAPOTLANEJO	JALISCO	La Purisima	BUENA	OVINO	HEMBRA	LA MANCHA	CUELLO	MENOR 5 CM	SUAVE	AMARILLO	PURULENTO
9575R	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Santa Anita	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROSO
((0338)) 635816	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
((027)) 716187	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
3612PK	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	5.1 A 10 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
651793	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	DORPER CRU	CABEZA	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROPURULENTO
(6-4)	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	5.1 A 10 CM	DURA	AMARILLO	CASEOSO
((0016DR)) 8351	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	GLANDULA MAM	MENOR 5 CM	SUAVE	BLANCO	CASEOSO
H14X	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	5.1 A 10 CM	SUAVE	VERDE	PURULENTO
734503	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Lomas de Sai	BUENA	OVINO	MACHO	BOER	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
((026)) 635669	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	MACHO	PELIFORK	CABEZA Y CUELL	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
((030)) 8150	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	5.1 A 10 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
((019)) 585440	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	INGUINAL	5.1 A 10 CM	DURA	AMARILLO	PURULENTO
((006)) 534Y	ZAPOTLANEJO	JALISCO	El Trapiche	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	AMARILLO	SANGUINOLENTO
585790	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
694986PK	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Lomas de Sai	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
(4-2-2L) 345929	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Tauquilla	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	AMARILLO	SEROPURULENTO
5601PK												
(4-5-2L-1) 7-0	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Tauquilla	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
694978	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Lomas de Sai	BUENA	OVINO	MACHO	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
13AA												
701127												
728930	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	BLACK BELLY	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
1322PK	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Lomas de Sai	BUENA	OVINO	MACHO	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	CASEOSO
691331PK	JALISCO		BUENA									
((047)) 104W	ZAPOPAN	JALISCO	La Mojanera	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIGUEY	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	PURULENTO
((028)) T122V2008	ZAPOPAN	JALISCO	Tesistan	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	BLANCO	SEROSO
3552	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
632835												
((6-18)) 728919	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	HEMBRA	PELIFORK	CAUDAL	5.1 A 10 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
694977	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Lomas de Sai	BUENA	OVINO	MACHO	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	CASEOSO
728905	TEPATITLAN	JALISCO	Capilla de M	BUENA	OVINO	MACHO	PELIFORK	CUELLO	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROPURULENTO
3540	TLATEPAQUE	JALISCO	Santa Anita	BUENA	OVINO	HEMBRA	DORPER	CUELLO	MENOR 5 CM	SUAVE	VERDE	SEROSO
58 (1-2-2L)	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Santa FE	BUENA	CAPRINO	HEMBRA	SAANEN	INGUINAL	MENOR 5 CM	SUAVE	AMARILLO	SEROPURULENTO
61 61 26	ZAPOTLANEJO	JALISCO	Lomas de Sai	BUENA	OVINO	MACHO	PELIFORK	CABEZA	MENOR 5 CM	DURA	VERDE	SEROSO
69 4992	JALISCO		BUENA									

Anexo 2. Artículo

BMC Veterinary Research

Identification and molecular characterization of *Corynebacterium xerosis* isolated from a sheep cutaneous abscess: First report in Mexico

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Identification and molecular characterization of <i>Corynebacterium xerosis</i> isolated from a sheep cutaneous abscess: First report in Mexico	
Article Type:	Case Report	
Section/Category:	Bacteriology	
Funding Information:	Universidad Autónoma del Estado de México (3249/2012CHT)	Dr. Roberto Montes de Oca-Jimenez
	Universidad Autónoma del Estado de México (3806/2014/CIA)	Dr. Roberto Montes de Oca-Jimenez
	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología	MVZ Fernando Hernandez-Leon

Corresponding Author:	Roberto Montes de Oca-Jimenez, Doctor in Science Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia TOLUCA, Mexico MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Fernando Hernandez-Leon	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Fernando Hernandez-Leon	
	Jorge Acosta-Dibarrat	
	Juan Carlos Vázquez Chagoyán, Ph.D	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Identification and molecular characterization of *Corynebacterium xerosis* isolated from a sheep cutaneous abscess: First report in Mexico.

Fernando Hernández-León¹, Jorge Acosta-Dibarrat¹, Juan Carlos Vázquez-Chagoyán¹, Roberto Montes de Oca-Jiménez¹.

Authors information

1 Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud, Facultad de medicina veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 15.5 Carretera Toluca-Atlacomulco, Estado de México, México, C.P. 50200

Fernando Hernández-León Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México. E-mail:erlich_511@hotmail.com

Jorge Acosta-Dibarrat Centro de investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma del Estado de México, México. E-mail: jpacosta00@hotmail.com

Juan Carlos Vazquez-Chagoyán Centro de investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma del Estado de México, México. E-mail: jcvch@yahoo.com

Roberto Montes de Oca-Jiménez Centro de investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma del Estado de México, México. E-mail: romojimenez@yahoo.com

Corresponding Author: Roberto Montes de Oca Jiménez Centro de investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma del Estado de México, México. E-mail: romojimenez@yahoo.com

ABSTRACT

Background

Corynebacterium xerosis is a commensal organism found in skin and mucous membranes of humans. It is considered an unusual pathogen, and it is rarely found in human and animal clinical samples.

Case presentation

Here we describe the isolation of *Corynebacterium xerosis* from a 4-months-old Pelifolk lamb kept in an intensive production system located in Tesistán, central western Mexico. The animal exhibited a hard-consistency, 5 cm diameter abscess, without drainage, in the neck. The presumptive clinical diagnosis was caseous lymphadenitis, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Samples were obtained by puncture and cultured in 8% sheep blood agar under microaerophilic conditions. Colonies were non-haemolytic, yellowish and showed microscopic and biochemical features similar to *C. pseudotuberculosis*, except for the urea test. A multiplex-PCR for the amplification of partial sequences of the *pld*, *rpoB* and *16s* genes was carried out. Samples did not show any amplification for *pld* and *16s* genes. Further sequencing and alignment of *rpoB* confirmed that the sample (*rpoB* C53) was *Corynebacterium xerosis*.

Conclusions

This study shows for the first time isolation and molecular characterization of *C. xerosis* from a clinical sample of an ovine cutaneous abscess in Mexico. This finding highlights the need for differential diagnosis of this pathogen in ovine skin abscesses, as well as epidemiological and control studies of this pathogen in sheep farms.

Keywords *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, skin abscess, sheep, *pld* gene, *rpoB* gene.

Background

Corynebacterium xerosis is a commensal organism normally present in skin and mucous membranes of humans and animals (1). It is considered an unusual pathogen but it is able to cause endocarditis, skin infections and other illnesses (1, 2, 3, 4, 5, 6). Furthermore, it has been shown that human clinical isolates originally identified as *C. xerosis* sometimes correspond to other species of *Corynebacterium* (*C. amycolatum*, *C. freneyi* and *C. hansenii*). This misidentification is due to their close phylogenetic relationship and similar phenotypic characteristics (7, 8, 9, 10). *C. xerosis* grows in colonies of 0.2-1.0 mm in diameter, brown-yellowish in colour, slightly dry in appearance and non-haemolytic when cultured in blood agar. Microscopically, *C. xerosis* are irregularly staining pleomorphic Gram positive rods presenting club-like ends. Biochemically, they are catalase-positive, and are able to ferment glucose, sucrose and maltose. (1, 11, 12, 13). Vela *et al.*, (2006) (1)

described for the first time the identification of eight isolates of *C. xerosis* from animal clinical samples, using classical microbiological methods as well as molecular genetics. More recently, Palacios *et al.*, (2010) (14) showed a more thorough analysis of several *C. xerosis* isolates from animal clinical samples, mostly lesions from swine, including subcutaneous abscesses.

Case presentation

This paper describes the isolation of *Corynebacterium xerosis* from a 4-months-old Pelifolk (3/4 Pelibuey, 1/4 Suffolk) lamb in good body condition. The individual came from an intensive production system, located in Tesistán, municipality of Zapopan, state of Jalisco, Mexico. The animal exhibited a hard-consistency abscess, without drainage, on the left side of the neck. (Figure 1A). Initial clinical diagnosis suggested caseous lymphadenitis, possibly caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A sample for bacteriological analysis was obtained by puncturing the abscess with a sterile, 5 ml syringe, with a 20 gauge hypodermic needle after cleansing and disinfection of the area. The type of exudate recovered was serous-like and white in appearance. The biological sample was kept at 4° C until biological characterization at the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA). The time between sampling and processing did not exceed 72 hours. Sample was cultured in duplicate in 8% sheep blood agar (3) and incubated 24-48 hours at 37° C in aerobic and microaerophilic conditions (1, 14). Colonies 1.0 mm in diameter, non-haemolytic, yellowish-brown in colour

and slightly dry in appearance were observed (Figure 2A). These morphological characteristics corresponded to those previously described in the literature for *Corynebacterium xerosis* (1, 13) and not *C. pseudotuberculosis*, as expected. After staining, irregularly staining pleomorphic Gram-positive rods presenting club-like ends were observed (Figure 2B). Biochemical tests showed the following results: TSI (-), LIA (-), CIT (-), SIM (-), MIO (-), OF (-) Methyl red (-), Peptone Water (-), Voger Pascaguer (-), Urea (-), Nitrate Broth (+), Trehalose (+), Sucrose (+), Maltose (+) and Glucose (+). These results correspond to a *Corynebacterium pseudotuberculosis* profile, with the exception of the urea test, which was negative instead of positive, and therefore better coincident with *Corynebacterium xerosis* profile (13). Additionally, the API-Coryne test was performed following the manufacturer's specifications and results were similar to previous biochemical results (14, 15). In addition to the biochemical profiles, molecular characterization of the isolate was performed to increase diagnosis accuracy. DNA extraction was carried out using a commercial kit (KAPA Express Extract) following the manufacturer's protocol. A Multiplex-PCR technique for amplification of partial sequences of the *pld*, *16s* and *rpoB* genes was performed using the protocol published by Pacheco in 2007 (16). Reactions were carried out using a commercial multiplex PCR kit (QIAGEN Multiplex PCR) following the manufacturer's specifications and included the isolated sample and also DNA from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* isolate and a the reference strain *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* ATCC 43924. A 446 bp band

corresponding to the *rpoB* gene from the studied isolated was successfully amplified. Both *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* showed three bands of 203, 446 and 816 bp, corresponding to genes *pld*, *rpoB* and *16s*, respectively (Figure 3). The primers used in the amplification of *16s* genes are specific for *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* (16), and *pld* gene is absent in *Corynebacterium xerosis* (1) this explains the previous obtained multiple PCR results. *RpoB* gene amplicons of all the three samples were purified using the Promega purification kit (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) and were sent for automatic sequencing by the Macrogen (USA). Multiple sequence alignments and percentage of similarity obtained from a BLAST (NCBI) were analysed using the Clustal W software. Phylogenetic analysis was performed using the neighbour-joining method (MEGA software 6.0.6). Bootstrap values were obtained by generating 1000 random trees. Phylogenetic analysis also included the sequences from the *rpoB* gene from *Corynebacterium xerosis* (GenBank AY492233.1), *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* (GenBank CP002924.1) and *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* (GenBank CP003540.2). It was possible to observe different phylogenetic groups that corresponded to a particular species of *Corynebacterium*. These results, together with the percentages of similarity obtained by BLAST, confirm that this study's isolate (*rpoB* C53) is *Corynebacterium xerosis* (Figure 4).

Genotyping techniques such as PCR as well as sequence analysis of the *rpoB* C53 isolate in this study contributed greatly towards a correct species identification, which was originally misleading when using phenotypic microscopic and biochemical features. *Corynebacterium xerosis* has been previously reported in clinical samples of human cases in lesions in endocarditis, pneumonitis, osteomyelitis and skin infections, especially in immunocompromised patients (3,12). It has also been found in animal clinical samples, for instance, in goat liver lesions (suspected paratuberculosis), and cow milk from animals presenting mastitis. In swine, *C. xerosis* has been isolated from lesions in different tissues such as liver, kidney, lung, spleen, joints, as well as from subcutaneous abscess. Additionally, *Corynebacterium xerosis* has been isolated from ovine clinical samples, once from uterus, in a case of abortion, and from lung tissue, from an animal presenting respiratory problems (1, 14). These isolates were identified and characterized by amplification of the *rRNA* 16S-23S gene using PCR-RFLP. However, in those studies it was not possible to obtain a band pattern clear enough to differentiate *Corynebacterium xerosis* from other species of *Corynebacterium*. The authors also conducted an analysis and sequence comparison of genes 16s and *rpoB* which allowed them to differentiate *Corynebacterium xerosis* from other species genetically-similar to *Corynebacterium* (1,14).

As mentioned above, this study was conducted based on the presence of the *rpoB* gene, which has been reported by other authors as the gene of choice for phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* as it presents high polymorphism, even greater than the 16S gene (17, 18). It is known that cutaneous abscesses in sheep (caseous lymphadenitis) is caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its main factor of virulence and pathogenicity is the exotoxin phospholipase D, encoded by the *pld* gene and expressed in the cell membrane of the bacterium (19). This exotoxin is a permeability factor that promotes hydrolysis of the ester bonds in sphingomyelin in mammalian cell membranes, possibly contributing to the spread of bacteria from the initial site of infection to secondary sites through the lymphatic system to regional ganglia, given its affinity of destruction and damage of macrophages. The exotoxin also causes dermonecrotic lesions (20, 21). However, this exotoxin has not been reported in *Corynebacterium xerosis*. This highlights the importance of carrying out further research regarding the mechanisms of infection present in this species.

Major points of discussion of epidemiological nature include the fact that the intensive ovine production system where the sample was obtained from, was previously used for swine. In these animals, it has been reported a high occurrence of *Corynebacterium xerosis*. Moreover, one of the main ingredients of sheep diet included pig by-products (*swine manure silage*). In addition, the main entrance in the facilities was surrounded by sharp objects such as metallic rods, nails and

wires, which increase the chance of injury in the animals. All these factors may have contributed to the presence of *C. xerosis* inside the facility.

Conclusions

Here we report the isolation and molecular characterization of *C. xerosis* from a clinical sample from a sheep cutaneous abscess for the first time. However, it was not possible to amplify the *pld* gene. In *C. pseudotuberculosis*, this gene is responsible for the expression of phospholipase D, a major virulence factor responsible for the abscesses. These results encourage further exploration of the factors responsible for causing abscesses produced by *C. xerosis*.

Competing interests

Authors have no financial or non-financial competing interests to declare

Autors contribution

FH participated in molecular studies and article scripting, JA participated in the phenotypic studies and designing of the molecular structure for the first bacterial isolates and article scripting, JV participated in designing molecular studies and article scripting and revision, RM participated in the first bacterial isolated and phenotypic studies, project coordination and manuscript finalization. All authors agreed on the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank the University of the State of Mexico (projects 3249 / 2012CHT and 3806/2014 / CIA) for the financial support to the study and to CONACYT for the scholarship awarded to Fernando Hernandez Leon.

Author details

1 Centro de investigación y Estudios Avanzados en Salud, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Km 15.5 Carretera Toluca-Atlacomulco, Estado de México, México, C.P. 50200.

References

1. Vela AI, Gracia E, Fernández A, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF: 2006. **Isolation of *Corynebacterium xerosis* from animal clinical specimens.** J Clin Microbiol. 2006;**44**: 2242-43.
2. Coyle MB, Lipsky BA. **Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects.** Clin Microbiol Rev. 1990;**3**:227–46.
- 3 Funke G, Lawson PA, Bernard KA, Collins MD. 1996. **Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*.** J Clin Microbiol. 1996;**34**:1124–8.

4 Riegel P, Ruimy R, Christen R, Monteil H. **Species identities and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;**15**:657–62.

5 Funke G, von Graevenitz A, Clarridge, JE, Bernard KA. **Clinical microbiology of coryneform bacteria.** Clin Microbiol Rev. 1997;**10**: 125–59.

6 Wauters G, Van Bosterhaut B, Janssens M, Verhaegen J. **Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin.** J Clin Microbiol. 1998;**36**:1430–2.

7 Renaud FNR, Aubel D, Riegel P, Meugnier H, Bollet C. ***Corynebacterium freneyi* sp. nov.,-glucosidase-positive strains related to *Corynebacterium xerosis*.** Int J Syst Evol Microbiol. 2001;**51**:1723–8.

8 Auzias A, Bollet C, Ayari R, Drancourt M, Raoult D. ***Corynebacterium freneyi* bacteremia.** J Clin Microbiol. 2003;**41**: 2777–8.

9 Renaud FNR, Le Coustumier A, Wilhem N, Aubel D, Riegel P, Bollet C, Freney J. ***Corynebacterium hansenii* sp. nov., an-glucosidase- negative bacterium related to *Corynebacterium xerosis*.** Int J Syst Evol Microbiol. 2007;**57**:1113–6.

- 10 Funke G, Frodl R. **Comprehensive study of *Corynebacterium freneyi* strains and extended and emended description of *Corynebacterium freneyi*** . J Clin Microbiol. 2008;46:638–43.
- 11 Hollis DG, Weaver RE: **Gram-positive organism: A guide to identification**. Special Bacteriology Laboratory, Atlanta, Centers for Disease Control, 1981 (reprinted 1986). p. 1-10.
- 12 Krish G, Beaver W, Sarubbi F, Verghese A. 1989. ***Corynebacterium xerosis* as a cause of vertebral osteomyelitis**. J Clin Microbiol. 1989;27: 2869-70.
- 13 Coyle MB, Leonard RB, Nowowiejski DJ, Malekniazi A, Finn DJ. **Evidence of multiple taxa within commercially available reference strains of *Corynebacterium xerosis***. J Clin Microbiol. 1993;31:1788-93.
- 14 Palacios L, Vela AI, Molin K, Fernández A, Latre MV, Chacón G, Falsen E, Fernández-Garayzábal JF. 2010. **Characterization of some bacterial strains isolated from animal clinical materials and identified as *Corynebacterium xerosis* by molecular biological techniques**. J Clin Microbiol. 2010;48:3138-45.
- 15 Funke G, Renaud FNR, Freney J, Riegel, P. **Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0**. J Clin Microbiol. 1997;35:3122–26.

16 Pacheco LG, Pena RR, Castro TLP, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MN, Oliveira SC, Meyer R, Alves FS, Miyoshi A, Azevedo V. **Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples.** J Med Microbiol. 2007; **56**: 480–86.

17 Khamis A, Raoult D, La Scola B. **Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*.** J. Clin. Microbiol. 2005;**43**:1934–36.

18 Retamal P, Ríos M, Cheuquepán F, Abalos P, Pizarro-Lucero J, Borie C, Gutiérrez J. **Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis rpoB* gene sequence.** Vet Microbiol. 2011;**151**: 400–3.

19 McKean SC, Davies JK, Moore RJ. 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. 2007;**153**: 2203–11.

20 McNamara PJ, Cuevas WA, Songer JG. **Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology.** Gene. 1995;**156**:113–8.

21 Tachedjian M, Krywult J, Moore RJ, Hodgson AL. **Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene.** *Vaccine*. 1995;**13**:1785–92.

Figure 1. A, hard-consistency abscess in the neck region of a 4-months-old ewe.

Figure 2. Comparison between *Corynebacterium pseudotuberculosis* of growth cultured in 8% sheep blood agar which showed whitish colonies with beta haemolysis (left) and *Corynebacterium xerosis*, which showed small yellowish-brown colonies without haemolysis (right). B, Gram stain of *Corynebacterium xerosis* isolated in the study. Presence of pleomorphic Gram-positive rods presenting club-like ends.

Figure 3. Multiplex PCR. Amplification of partial sequences of *16S rRNA*, *rpoB* and *pId* genes. MW lane: molecular weight marker of 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). Lane 1: negative control (reaction without template DNA). Lane 2: *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi*. Lanes 3-4: *Corynebacterium xerosis* isolate (10 and 0.001ng of DNA, respectively). Lane 5: *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

Figure 4. Phylogenetic tree showing the relationship of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and differentiation of *Corynebacterium xerosis* as a separate group. The tree cbuilt from the alignment of partial sequence of the *rpoB* gene. Bootstrap values were obtained by generating 1000 random trees, and the strength

of each branch is indicated in the respective node (percentage). Sequences included *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis *rpoB* C13, biovar equi *rpoB* C1, *Corynebacterium xerosis* *rpoB* C53 and where compared with those from GenBank: CP002924.1, CP003540.2 and AY492233.1.

FIGURE 1



FIGURE 2

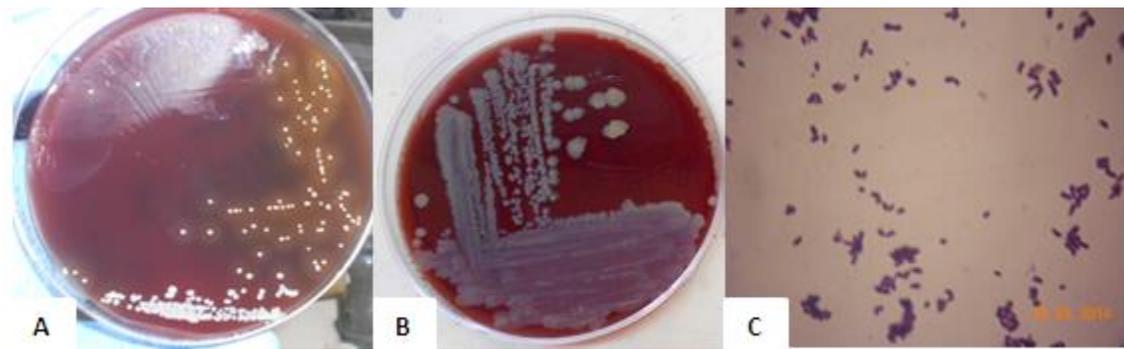


FIGURE 3

MW 1 2 3 4 5

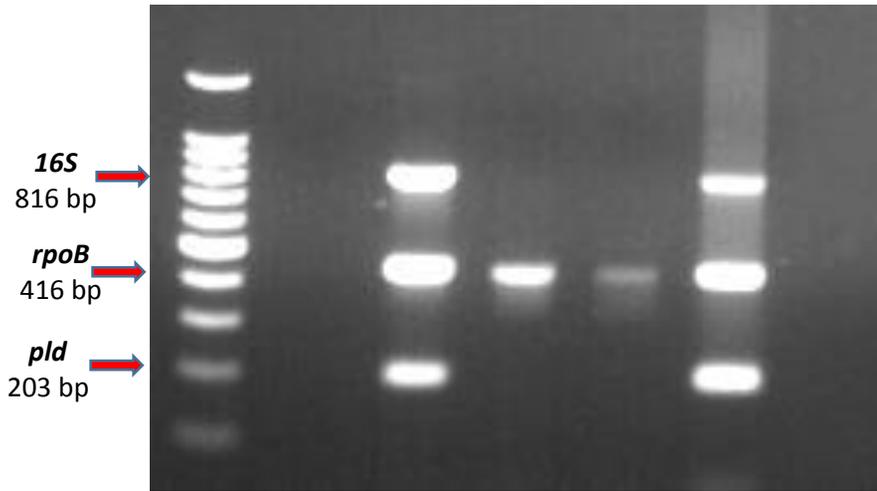


FIGURE 4

