

**Análisis de la metagenómica y
resistencia antimicrobiana de
*Corynebacterium pseudotuberculosis***

Dan Israel Zavala-Vargas.
Roberto Montes-de-Oca-Jiménez.
Martha Elba Ruiz-Riva-Palacio.





Resumen

La linfadenitis caseosa es una enfermedad contagiosa de evolución crónica, causada por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Esta bacteria tiene la capacidad de evadir el sistema inmune del animal que infecta, utilizando diversos mecanismos para mantenerse dentro de las células del hospedero. Una vez que logra establecerse, puede provocar infecciones persistentes que pueden durar años o incluso toda la vida del animal. Uno de los principales desafíos de esta enfermedad es que no hay una respuesta óptima a los tratamientos con antibióticos, lo que dificulta tanto su control y erradicación. Además, las lesiones características que produce, conocidas como piogranulomas, facilitan su propagación entre los animales del rebaño. La enfermedad se agrava por algunas prácticas comunes en la ganadería, como la trasquila y el uso de alambres de púas, que pueden favorecer el contagio. Dada la dificultad para tratar esta enfermedad, su impacto en la producción ganadera y su potencial zoonótico es fundamental desarrollar estrategias integrales para prevenirla y controlarla. Debido a esto, el estudio de la linfadenitis caseosa es de gran relevancia para la medicina veterinaria. En este sentido, el uso de análisis metagenómicos ha resultado ser una herramienta muy útil para entender mejor los mecanismos de patogenicidad de *C. pseudotuberculosis*. La implementación de esta técnica permite caracterizar de forma más precisa los aislamientos bacterianos a nivel molecular, lo cual abre nuevas posibilidades para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad.

Palabras clave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, metagenómica, linfadenitis caseosa, resistencia antibacteriana



Introducción

Corynebacterium pseudotuberculosis (*C. pseudotuberculosis*) es una bacteria grampositiva pleomórfica, de dimensiones variables (0.5–0.6 μm de ancho por 1.0–3.0 μm de largo), intracelular y anaerobia facultativa. No forma esporas, carece de cápsula y no presenta motilidad. Pertenece a la familia *Actinomycetaceae*, junto con otros géneros de importancia veterinaria y biotecnológica como *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, los cuales integran el grupo CMNR, caracterizado por una pared celular compleja compuesta de peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos, una estructura clave en su resistencia antimicrobiana y su interacción con el sistema inmune del hospedero.

C. pseudotuberculosis es de especial interés para el campo de la veterinaria por su impacto en la producción pecuaria. Infecta múltiples especies animales y es el agente etiológico de enfermedades como linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes, linfangitis ulcerativa en equinos y cuadros abscedativos en otros animales domésticos y silvestres. En condiciones óptimas, la bacteria desarrolla colonias secas y pálidas en medios sólidos, visibles inicialmente a las 24 horas y con diámetros de 1 a 2 mm, a las 48 horas de incubación.

Este patógeno ha sido objeto de estudios genómicos y proteómicos con el propósito de identificar antígenos candidatos para el desarrollo de vacunas, de esta forma mejorar las estrategias diagnósticas y terapéuticas. *C. pseudotuberculosis* es un patógeno zoonótico estrechamente vinculado con *Corynebacterium ulcerans* y *Corynebacterium diphtheriae*. Estas tres especies pertenecen al grupo de corinebacterias toxigénicas, ya que pueden ser infectadas por un corinebacteriófago que les transfiere el gen *tox*, responsable de codificar la toxina diftérica. La especie *C. pseudotuberculosis* se clasifica en dos biovars según sus características bioquímicas principalmente la capacidad de metabolizar nitratos, los animales que infecta y las enfermedades que provoca. El biovar *ovis* es responsable de la linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes, como ovejas y cabras, y también puede causar mastitis en ganado lechero. Por otro lado, el biovar *equi* provoca abscesos, linfangitis ulcerosa en caballos y enfermedades cutáneas edematosas en búfalos.

La reducción de nitratos tiene relevancia en la fisiología bacteriana, particularmente en ambientes anaerobios, mediante dos rutas metabólicas clave. La reducción asimilatoria, asociada a la fijación de nitrógeno atmosférico, transforma el nitrato en compuestos gaseosos como óxido nítrico y dióxido de nitrógeno mientras que la reducción disimilatoria convierte el nitrato en amoníaco, que es secretado al medio. Estas vías no solo influyen en la virulencia y adaptación ecológica del patógeno, sino que también representan posibles dianas para el desarrollo de herramientas moleculares aplicadas en biotecnología veterinaria.



La comprensión detallada de la biología de *C. pseudotuberculosis* es fundamental para avanzar en la elaboración de vacunas efectivas, métodos de diagnóstico molecular y estrategias de control sanitario, especialmente en sistemas productivos de alto valor económico como los de ovinos, caprinos, bovinos y equinos. Dado que los hospederos son fundamentales para la producción de leche, carne, cuero y lana. Considerando la presencia global de este patógeno, las infecciones por *C. pseudotuberculosis* generan importantes pérdidas económicas. Además, al ser un agente zoonótico, también puede infectar a seres humanos, causando linfadenitis. Por ello, se han desarrollado diversos proyectos de secuenciación genética y estudios de metagenómica bacteriana, muchos de ellos con el objetivo de identificar posibles candidatos para vacunas y nuevos tratamientos para la infección generada frente a este patógeno. Además, han contribuido para ampliar el conocimiento sobre la adaptación microbiana en diferentes tipos de estrés ambiental, patogénesis, interacción hospedero-patógeno y metaproteómica microbiana.

Genómica de *C. pseudotuberculosis*

Bernardes y colaboradores realizaron un análisis pangénomico comparativo de 53 cepas de *C. pseudotuberculosis* basado en dominios funcionales y observaron que las cepas del biovar *equi* poseen más del doble de secuencias únicas que las cepas del biovar *ovis*, lo que se atribuye a una mayor variabilidad de secuencias en dicho biovar. Este hallazgo fue confirmado por medio de un análisis de ortólogos *in silico* por el que se detectaron 1138 grupos ortólogos en todas las cepas de ambos biovares con 83 grupos ortólogos pertenecientes a las cepas del biovar *ovis* y 266 para cepas del biovar *equi*. Este resultado confirma una menor variabilidad de secuencia en el biovar *ovis* en comparación con el biovar *equi*. La mayor diversidad del biovar *equi* también puede confirmarse observando el número de proteínas de cada cepa. En promedio, las cepas del biovar *equi* contienen 2022 proteínas mientras que las cepas del biovar *ovis* contienen 2012 proteínas. En el biovar *ovis*, la cepa con menor número de proteínas es P54B96, aislada de *C. taurinus* en Sudáfrica con 1950 proteínas y la cepa con mayor número de proteínas es 1002, aislada de *C. aegagrus hircus* en Brasil con 2090 proteínas que representa una diferencia de 140 proteínas entre ellas. En el biovar *equi*, la diferencia es mucho más aparente, la cepa con menos proteínas es 1_06-A, aislada de *E. caballus*, en USA, con 1860 proteínas y la cepa que tiene más proteínas es 258 con 2126 proteínas, también aislada de *E. caballus* pero en Bélgica, hace una diferencia de 266 proteínas entre ellas. Las cepas del biovar *ovis* tienen más o menos el mismo número de proteínas con una desviación estándar de 26, mientras que en el biovar *equi* se ha observado una variación, con una desviación estándar de 61 (casi 3 veces mayor que el biovar *ovis*).

Los dominios más abundantes observados en cepas del biovar *ovis*, presentan una mayor frecuencia en comparación con el biovar *equi*. Por ejemplo, el dominio



Glyco_hydro_15 está presente en todas las cepas del biovar *ovis*, frente a solo seis en el biovar *equi*. Cabe destacar que se encontraron dos copias de Glyco_hydro_15 en ambos biovares. Otro ejemplo es el dominio Cu-oxidasa 2 (multicobre oxidasa), presente en todas las cepas de la biovariedad *ovis* y solo en siete cepas de la biovariedad *equi*. Curiosamente, los macrófagos utilizan el cobre para eliminar bacterias patógenas, y las oxidasas multicobre son importantes en la desintoxicación del cobre en muchas bacterias y juegan un papel crucial en la virulencia de los patógenos. El dominio de la fosfolipasa D (PLD), asociado al principal determinante de virulencia, se identificó en todas las cepas de ambos biovares.

No se ha observado ningún dominio único en cepas de la biovariedad *ovis* aisladas en Argentina, Australia, Escocia y Sudáfrica. En el hospedero *L. glama* (llama) se logró detectar un dominio único, asociado a la función metalo-beta-lactamasa, en la cepa 267, aislada en USA. Las metalo- β -lactamasas son enzimas bacterianas que catalizan la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, estos dominios confieren resistencia antimicrobiana. Además, de las 12 cepas aisladas de *C. aegagrus hircus*, solo tres cepas, aisladas en Brasil, presentaron dominios únicos. Sin embargo, presentan un patrón de dominios muy diferente, con solo dos dominios en común: DUF2326, marcado como de función desconocida y VRR_NUC, asociado con miembros de la superfamilia de nucleasas PD-(D/E)XXK, que constituyen una superfamilia extensa y diversa de enzimas involucradas en numerosos eventos de escisión de ácidos nucleicos esenciales para diversos procesos celulares, estos hallazgos son consistentes con la clonalidad genómica del patógeno.

Resistencia antibacteriana de *C. pseudotuberculosis*

La multirresistencia antimicrobiana es la capacidad de un microorganismo para resistir a múltiples familias de antibióticos (más de tres fármacos) lo que limita gravemente las opciones de tratamiento. Los antimicrobianos se clasifican según su mecanismo de acción en familias como los inhibidores de la síntesis de la pared celular (penicilinas, cefalosporinas), inhibidores de la síntesis de proteínas (tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (quinolonas, rifampicinas) y otros como las sulfonamidas o los glucopéptidos. En el caso de *C. pseudotuberculosis*, se ha observado resistencia a varias de estas familias, lo que refleja su adaptación y la urgencia de buscar alternativas terapéuticas. Además, los estudios sobre la resistencia a los antibióticos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* revelan patrones de susceptibilidad muy variables, estos coinciden en pocos antimicrobianos. En un estudio realizado por El Damaty y colaboradores, se observó una alta resistencia a la bacitracina y al florfenicol en el 92,6 % de estos aislados; también se obtuvo resistencia a la penicilina y la eritromicina. Mientras que otro estudio realizado por Abreu y colaboradores en donde 31 cepas fueron analizadas, reportó que el 87,1% de las muestras



fueron resistentes a novobiocina; 80,6% a neomicina; 41,9% a gentamicina; 19,3% a lincomicina; 16,1% a ampicilina, orbifloxacino y penicilina; 12,9% a sulfa-trimetoprim; 6,4% a cefazolina, norfloxacino y amoxicilina, y 3,2% a ciprofloxacino, cloranfenicol y tetraciclina. Un hallazgo importante fue que, 30 de estas cepas fueron multirresistentes en aproximadamente un 50 % de los antimicrobianos analizados. Otro estudio reciente, de İlhan y colaboradores en donde se analizaron 16 cepas, reportó que 13 (81,2%) cepas fueron sensibles a la neomicina/bacitracina/tetraciclina, 12 (75,0%) a la penicilina/novobiocina, 11 (68,7%) a la oxitetraciclina, 11 (68,7%) a la amoxicilina/ácido clavulánico, 10 (62,5%) a la cloxacilina, 9 (56,2%) a la tetraciclina, 5 (31,2%) a la ampicilina/sulbactam y 3 (18,7%) a la trimetoprima/sulfametoxazol. Ninguno de los aislados fue sensible a la estreptomocina.

Por otro lado, la enrofloxacin, la neomicina/bacitracina/tetraciclina y la penicilina/novobiocina mostraron buena eficacia. Mientras que Gallardo y colaboradores, reportan buena sensibilidad a las cefalosporinas, los glucopéptidos, los macrólidos, las quinolonas y las tetraciclinas. Estos hallazgos resaltan la importancia de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos para el tratamiento eficaz de las infecciones por *C. pseudotuberculosis*. Finalmente, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación se analizaron 227 genomas de cepas de *C. pseudotuberculosis* reportados en NCBI, en donde se realizó un análisis *in silico* para predecir los genes de resistencia antimicrobiana presentes, como resultado de este análisis, destaca la presencia de genes que confieren resistencia a antibióticos como macrólidos, rifampicinas, tetraciclinas, fluoroquinolonas, glucopéptidos y lincosamidas entre otros. Vale la pena destacar que, aunque, bibliográficamente hay reportes de genes de resistencia de beta-lactamasas nuestro análisis no logró predecir ninguna secuencia. La frecuente resistencia antimicrobiana reportada en diferentes zonas geográficas a nivel mundial podría atribuirse a las características estructurales y bioquímicas de *C. pseudotuberculosis*.

Evolución de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

En otro estudio reciente Hiller y colaboradores sugieren que las cepas biovar *ovis* y biovar *equi* tienen un origen evolutivo común, aunque forman grupos genéticos distintos. Además, se ha postulado que el biovar *ovis* evolucionó del biovar *equi* a través de la anagénesis, que se ha definido como un cambio evolutivo progresivo que tiene lugar con el tiempo en un solo linaje. Estos cambios genéticos son impulsados por la pérdida de genes y mutaciones. En general, los aislados de *C. pseudotuberculosis* se han descrito como genéticamente homogéneos e incluso exhiben un alto nivel de homogeneidad clonal, a pesar de su amplio espectro de hospedadores. Sin embargo, las investigaciones de aislados de búfalo revelaron 48 genes únicos ubicados en la isla de patogenicidad PiCp12 que también portan el gen de la toxina de la difteria que podría desempeñar un papel en



la adaptación del hospedero. Se sabe que las bacterias patógenas que dependen de vivir en hospederos restringidos e intracelularmente experimentan una reducción adaptativa y evolutiva del genoma por mutaciones genéticas, pérdida de la función génica y, finalmente, pérdida génica. Esta pérdida gradual es una indicación de la necesidad constante de este patógeno para eliminar genes en el sentido de la selección negativa de genes redundantes o no vitales. *C. pseudotuberculosis* no solo experimenta un desarrollo genético en una dirección, sino también en paralelo en diferentes genotipos. Se han identificado diferentes genotipos caracterizados por diferentes inserciones y deleciones en los genes del locus de nitrato de aislados de *C. pseudotuberculosis* en camélidos. Esto, debido a que se ha observado que aislados de este patógeno tomados de camélidos (alpaca, llama, dromedario, camello) portan genes mutados CP258_RS01950, nar G y nar T del locus nitrato. Otro grupo separado se crea a partir de mutaciones encontradas en una llama alemana en los genes CP258_RS01950 y nar H, este grupo sería distinto a los aislados conocidos de *C. pseudotuberculosis* de biovar *ovis* y biovar *equi*. Teniendo en consideración las variaciones entre hospedadores, la distribución geográfica y las características de virulencia. Parece ser que la fuerza impulsora de estos cambios genéticos es la interacción hospedador-patógeno que resulta en coevolución del patógeno. Como resultado, los estudios han demostrado una asociación entre linajes adaptados a animales y diferentes regiones geográficas y posible adaptación a hospedadores específicos.

Respuestas transcriptómicas al estrés de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Una vez que *C. pseudotuberculosis* infecta a su hospedero se enfrenta a distintos estímulos importantes. Tras su fagocitosis sufre un abrupto descenso del pH dentro del fagosoma. Seguido de otros factores de estrés intracelulares, como el choque térmico oxidativo y el estrés nitrosativo, superficial, osmótico y por inanición. Para sobrevivir en este entorno, el patógeno debe montar una respuesta protectora inmediata y adecuada que se refleja inicialmente por cambios transcripcionales en conjuntos específicos de genes. En este contexto, los factores sigma, que coordinan la expresión de estos genes bajo diferentes tipos de estrés son importantes; uno de estos factores es σ^S en *E. coli*, que está involucrado en la síntesis de trehalosa durante el estrés osmótico, con trehalosa sirviendo como un osmoprotector importante.

La transcriptómica de *C. pseudotuberculosis* es un campo poco estudiado. Pinto y colaboradores analizaron la expresión de genes en diferentes condiciones de estrés. En condiciones de estrés ácido, la inducción de genes implicados en los procesos de adhesión celular y oxidorreducción en respuesta al estrés es de suma importancia. Los procesos de adhesión se componen de proteínas hipotéticas, una de las cuales se caracterizó como una proteína secretada que contiene un dominio LPxTG, que podría considerarse como un



posible candidato para vacunas. El gen Cp1002_2043 exhibe un cambio de 7,8 veces en la expresión. Este gen, que puede codificar la proteína Dps, se relacionó con los procesos de respuesta al estrés y oxidorreducción celular. Esta proteína protege al organismo contra el estrés oxidativo porque almacena hierro en una forma biodisponible, reduciendo la posibilidad de producción de moléculas reactivas de oxígeno. Bajo condiciones ácidas, hay un aumento en la producción de moléculas capaces de producir especies reactivas de oxígeno. Los informes han demostrado que en células en las que el pH disminuye, la relación de HOO⁻ a O₂⁻ aumenta, lo que incrementa la posibilidad de producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Por lo tanto, se justifica el mayor número de genes que constituyen el proceso de oxidorreducción celular. Otro gen importante en el proceso de oxidorreducción fue Cp1002_0173, que exhibió un cambio de 4 veces en su expresión y se presume que codifica una catalasa que juega un papel en la reducción de la concentración de H₂O₂ en la célula. Otro gen sobre expresado fue Cp1002_1192 msrB (metionina sulfoxido péptido reductasa), que fue uno de los genes presentes en el proceso de oxidorreducción, el cual mostró una sobre expresión de 16 veces. Debido a que la proteína MsrA puede ser necesaria para mantener la función de las adhesinas, el alto aumento en la expresión de msrB sugirió que la proteína contribuye a la supervivencia del patógeno en el hospedero, la resistencia al estrés oxidativo *in vitro* y la capacidad de adhesión de las células eucariotas. El gen Cp1002_1785 (betA) también fue sobre expresado este gen puede codificar una colina deshidrogenasa. El gen inducido mostró un aumento de 5 veces en la expresión en comparación con el control. La proteína pertenece a la familia de las oxidoreductasas, que cataliza la oxidación de la colina a glicina betaína a través del intermediario betaína aldehído. Esta proteína promueve una mayor tolerancia a la hipersalinidad y la congelación y contribuye al equilibrio osmótico de la célula bajo estrés. El proceso de adhesión en *C. pseudotuberculosis* está comprendido en el gen Cp1002_1765, que podría codificar una proteína secretada. Este gen mostró una expresión dos veces mayor en comparación con el control, y es un candidato importante para estudios relacionados con el control de la linfadenitis caseosa. El gen Cp1002_1895, que puede codificar una proteína reguladora de choque térmico (HspR), también mostró un incremento en su expresión. Esta proteína actúa como un regulador negativo de la expresión de genes que codifican chaperonas y proteasas en diferentes bacterias bajo condiciones fisiológicas. Las proteínas de choque térmico juegan un papel clave en el metabolismo celular bajo todas las condiciones de crecimiento, monitoreando el plegamiento, ensamblaje y translocación de proteínas celulares.

Entre los genes reprimidos compartidos estaban aquellos que codifican proteínas relacionadas principalmente con el metabolismo energético, transporte de azúcar, aminoácidos que contribuyen en gran medida al mantenimiento y replicación del organismo en el entorno, como argJ, nanK, opp y proteínas hipotéticas. Estos datos son



consistentes con los experimentos de unidades formadoras de colonias, que demostraron una disminución en la replicación en los entornos estresantes. Una reducción en el crecimiento es una estrategia de supervivencia y ocurre esencialmente en todas las situaciones estresantes porque la capacidad del organismo para percibir el entorno y modular los mecanismos de control de respuesta de resistencia, metabolismo y otros procesos que aumentan, son específicos y adecuados para las nuevas condiciones.

En condiciones de estrés osmótico, por medio de análisis *in silico* se ha observado que los genes que codifican los factores sigma A y M se inducen. En condiciones ácidas, los genes que codifican los factores sigma B, E y H se expresaron diferencialmente, y en condiciones de estrés térmico, los genes que codifican los factores sigma A, D y H se consideraron diferencialmente expresados; sin embargo, la expresión de estos genes estuvo por debajo del límite establecido para el análisis.

Factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Se consideran factores de virulencia a las estructuras y moléculas que confieren a la bacteria la capacidad de causar enfermedad. La transferencia horizontal de genes ha sido crucial en la evolución de la capacidad patógena de las bacterias, permitiéndoles adaptarse a diversos entornos, incluyendo la supervivencia en diferentes nichos durante la infección a los hospedadores. En *C. pseudotuberculosis*, la mayoría de los genes de virulencia se agrupan en regiones del genoma llamadas islas de patogenicidad (PAIs), identificándose 16 PAIs, a las que se ha nombrado PiCp. La presencia de un gen de transposasa en PiCp1 sugiere la incorporación de las PAIs al genoma. Estas regiones contienen genes relacionados con la adhesión, invasión, colonización, propagación dentro del hospedador, supervivencia en las células infectadas y evasión del sistema inmune. Las secuencias PiCp muestran una alta similitud intrabiovar en las cepas ovis, con una similitud del 78 % al 91 % con el biovar *equi*. Sin embargo, las cepas del biovar *equi* presentan grandes deleciones y menor similitud intrabiovar (77-88 %), en comparación con el PiCp del biovar *ovis* (62-74 %).

Factores de virulencia de la pared celular

La pared celular de *C. pseudotuberculosis* se compone de una capa de peptidoglicano que contiene ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP), junto con arabinosa y galactosa. En la ruta de biosíntesis del peptidoglicano II, el ácido meso-DAP resulta de la reacción que cataliza la UDP-N-acetilmuramil-tripéptido sintetasa, enzima identificada en cepas de *Corynebacterium sp.* El peptidoglicano se une de forma covalente a arabinogalactanos, formando una red que, a su vez, se asocia a una capa externa de ácidos corynomicólicos (de 22 a 36 átomos de carbono), ligados a la trehalosa, siendo esta la parte más superficial. Esta estructura lipídica funciona como barrera, con una permeabilidad selectiva mediada por proteínas integrales de membrana, conocidas como porinas. Por otro lado, la



exotoxina Fosfolipasa D (PLD) se considera el principal o uno de los principales factores de virulencia y puede detectarse por medio de un ensayo de hemólisis sinérgica contra *Rhodococcus equi* o inhibiendo la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, y otras técnicas de biología molecular como la PCR del gen *rpoB*.

Los principales factores de virulencia de la pared celular presentes en las bacterias del grupo *Corynebacterineae* son los lipoglicanos lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM) y los anclajes de fosfatidilmiinositol asociados a manosa (PIM). La distribución de estas moléculas parece ser específica de la especie: las moléculas similares a LM dominan en *Corynebacterium glutamicum*, en *Corynebacterium xerosis* y *Corynebacterium amycolatum* se encontraron preferentemente sustancias similares a LAM, mientras que se mostró una distribución casi igual de LM y LAM en una cepa de *Corynebacterium diphtheriae*.

Los ácidos corynomicólicos forman parte de la capa externa de la pared celular de la bacteria, que constituye una barrera protectora y permeable. La unión de estos a las moléculas de trehalosa conduce a la formación de estructuras curvas, lo que bloquea el acceso de moléculas (antibióticos o lisozimas) al peptidoglicano, confiriendo protección mecánica. A diferencia de los ácidos grasos lineales de los fosfolípidos, los ácidos corynomicólicos son ácidos grasos α -hidroxi-ramificados, que requieren la carboxilación y condensación de dos ácidos grasos para su síntesis. Las enzimas AccD2 y AccD3 son carboxilasas ampliamente conservadas en la familia *Corynebacteriaceae*, implicadas en la generación de intermediarios para la síntesis de ácidos corynomicólicos. Otras enzimas implicadas en la síntesis son AccD1, para la elongación de la cadena de ácido micólico, y FadD, una AMP ligasa. La inoculación de ácidos corynomicólicos en ovejas mostró que la haptoglobina triplicó su concentración, así como duplicó los niveles de amiloide sérico A, proteínas que indican inflamación e infecciones agudas. Estos resultados indican su potencial virulento, ya que, por sí solos, son capaces de inducir reacciones inflamatorias en el hospedero, lo que contribuye a la formación de granulomas.

Fosfolipasa D, PLD

Se ha observado que PLD tiene la capacidad de incrementar la permeabilidad vascular *in vivo*, tiene propiedades dermonecroticas, exhibe hemólisis sinérgica de células sanguíneas de oveja en presencia de productos de *Rhodococcus equi* y reduce la viabilidad de los polimorfonucleares neutrófilos ovinos *in vivo*. Además, estudios con cepas de *C. pseudotuberculosis* con PLD inactivado han demostrado convincentemente la necesidad de PLD para el establecimiento de CLA. Las cepas con mutaciones ausentes de PLD no pueden causar abscesos en los nódulos linfáticos.

Durante el curso de la infección, *C. pseudotuberculosis* se expone a diversos entornos, desde el punto de entrada, a través del sistema linfático, hasta el establecimiento



de lesiones purulento-caseosas en los órganos. Los nichos en los que la bacteria debe sobrevivir abarcan desde el entorno aeróbico del punto de infección inicial hasta la replicación intracelular en los macrófagos. Presumiblemente, los cambios en la expresión génica influyen en las adaptaciones y modificaciones necesarias para una infección exitosa. Este estudio demuestra que la regulación de la expresión del principal factor de virulencia PLD, es compleja y responde a diversas señales ambientales. Además de la regulación por choque térmico, previamente identificada, el gen también está regulado por la densidad de cultivo y presenta una alta expresión en macrófagos infectados, donde tiene un efecto pequeño pero significativo en su viabilidad. La acción enzimática de PLD hidroliza la esfingomielina, el principal componente de las membranas celulares, lo que conduce a una alteración de la morfología de la membrana diana. La PLD contribuye a la propagación y persistencia de la bacteria dentro de los macrófagos. El gen PLD presenta una secuencia ampliamente conservada en las cepas de *C. pseudotuberculosis*, y cuando ésta se modifica se dificulta la capacidad de producir la enfermedad.

Genes Fag

En PiCp1 se encuentra el operón (Fag ABCD) en *Corynebacterium pseudotuberculosis* estos genes desempeñan un papel crucial en la adquisición y transporte de hierro, un proceso esencial para la supervivencia y patogenicidad de esta bacteria. Estudios como los de Billington y colaboradores y Galvão y colaboradores, han demostrado que estos genes codifican proteínas homólogas a sistemas de captación de hierro férrico, cuya expresión se regula positivamente en condiciones de limitación de hierro. Funcionalmente, se ha identificado que FagA actúa como una proteína de membrana integral, FagB como transportador de enterobactina, FagC como proteína de unión a ATP y FagD como proteína de unión a sideróforos, integrando un sistema especializado en la adquisición de este metal. La relevancia de estos genes en la virulencia se ha demostrado en modelos animales, donde mutantes en FagB muestran una patogenicidad reducida, a pesar de no presentar defectos en condiciones de laboratorio. Esto sugiere que el entorno *in vivo* impone restricciones nutricionales, como el secuestro de hierro por proteínas del hospedero como la lipocalina 2, que hacen indispensable el sistema Fag para la infección. Además, su alta prevalencia en aislamientos clínicos de sitios invasivos, como observó Aquino de Sá y colaboradores, refuerza su asociación con la virulencia. La expresión de estos genes también está modulada por factores ambientales, como el estrés térmico, lo que refleja su adaptabilidad durante la infección. En conjunto, los genes Fag representan un mecanismo clave para la adquisición de hierro en entornos hostiles, lo que los convierte en determinantes fundamentales para la patogénesis de *C. pseudotuberculosis*.



Endoglicosidasa, CP40

Las glicosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos en las cadenas de glicano. Hay dos tipos de glicosidasas: las exoglicosidasas, que escinden los carbohidratos terminales de las estructuras de glicano, y las endoglicosidasas, que hidrolizan los enlaces dentro de las cadenas de glicano. Se han identificado y caracterizado numerosas glicosidasas de patógenos bacterianos con actividad en las glicoproteínas de mamíferos. Se ha demostrado que la proteína de 40 kDa, denominada CP40, es uno de los antígenos predominantes identificados durante el séptimo día de la infección por *C. pseudotuberculosis* en oveja. Análisis bioquímicos posteriores de la CP40 expresada de forma recombinante, incluyendo zimografía en gelatina e inhibición de la actividad enzimática mediante inhibidores de proteasa, han sugerido que posee actividad de serina proteasa. Está codificada por un gen con un marco de lectura abierto de 1.137 pb, que se localiza corriente abajo del gen *pld* en PiCp1. La función como factor de virulencia se ha asociado con la capacidad demostrada *in vitro* para degradar la región Fc de los anticuerpos IgG. La endoglicosidasa CP40 no hidroliza glicanos en IgG bovina y caprina, mientras que la IgG ovina se hidroliza parcialmente y la IgG equina completamente. El análisis también se realizó con subclases de IgG humana, presentando actividad en todas y parcialmente en IgG4. No hubo actividad enzimática detectable en otras glicoproteínas, incluyendo algunos de los otros isotipos de inmunoglobulina (IgA, IgD e IgE).

PAI PiCp2

En la isla de patogenicidad PiCp2 se encuentran los genes *potG*, *sigK* y *dipZ*, que responden a los mecanismos responsables del estilo de vida intramacrofágico de *C. pseudotuberculosis*. El gen *potG* codifica una proteína de membrana de unión a ATP que proporciona energía para la absorción de putrescina (poliamina) desde el espacio periplásmico, funciona como un sistema transportador de putrescina. Las putrescinas son poliamidas producidas por macrófagos que inducen una producción disminuida de especies reactivas de nitrógeno y síntesis de citoquinas proinflamatorias. El gen *dipZ* ha sido identificado en el filo *Actinobacteria*, está regulado por *sigK* y se activa durante la infección de macrófagos por *Mycobacterium tuberculosis*. En PiCp4, la presencia del gen que codifica el factor Sigma confiere la capacidad de proteger contra el estrés oxidativo, específicamente contra la acción de los productos intermedios de nitrógeno, producidos por los macrófagos.

Dianas moleculares vacunas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Entre las vacunas comerciales contra linfadenitis caseosa se encuentran; Glanvac 3 y 6 (Zoetis): combinan toxinas de diversos *Clostridium* y *C. pseudotuberculosis*. Reducen las lesiones, pero no previenen la infección y pueden causar reacciones adversas, incluyendo



granulomas y shock anafiláctico en cabras. Su eficacia varía, y el uso adecuado por parte de los productores es bajo. Caseous DT y Case-Bac (Colorado Serum, USA): incluyen PLD y cultivos inactivados. Reducen abscesos, pero provocan efectos secundarios, más graves en cabras, como edema y convulsiones. Biodectin™ (Zoetis, España): vacuna combinada con seis antígenos bacterianos y un antiparasitario. LinfoVac (Brasil): contiene una cepa viva atenuada de *C. pseudotuberculosis*, con un 80% de eficacia en modelos experimentales. Estas vacunas utilizan como inmunógeno a PLD y ofrecen una protección parcial contra esta enfermedad. Por otro lado, las vacunas de toxoides inactivos están compuestas por bacterias y toxinas inactivas, inducen una respuesta inmunitaria principalmente humoral y requieren altas concentraciones y varias dosis. Se ha observado que, aunque no causan la enfermedad, pueden generar efectos adversos por contener todos los componentes bacterianos. Se han realizado estudios en ratones, alpacas, ovejas y cabras han mostrado que estas vacunas reducen la formación de abscesos y la severidad de la enfermedad, especialmente cuando incluyen toxina PLD en altas concentraciones. Aunque, su efectividad depende de la formulación y del adyuvante utilizado. Las vacunas que utilizan subunidades proteínicas recombinantes, péptidos o lipopolisacáridos como antígenos parecen ser mucho más seguras que las anteriormente mencionadas, aunque, requieren adyuvantes para aumentar su inmunogenicidad, y en su mayoría están enfocadas en la proteína recombinante PLD.

Otra proteína recombinante que ha sido utilizada como diana es la proteína recombinante CP40, esta se ha utilizado en diferentes estudios y se ha observado que al combinarse con la cepa atenuada (CP09) protegió entre el 60 % y el 90 % de los animales probados. Mientras que cuando se utilizan adyuvantes como saponina o el adyuvante completo de Freund (ACF) mejoró la respuesta Th1 (inmunidad celular), sin diferencias significativas entre ellos. Dado que el ACF es tóxico en ovejas, se propone la saponina como alternativa segura y eficaz.

Conclusiones

C. pseudotuberculosis es un patógeno altamente complejo, y el uso de herramientas de genómica comparativa ha sido fundamental para identificar características específicas entre cepas y biovars, esto podría llevarnos al descubrimiento e implementación de nuevos fármacos y dianas moleculares. Uno de los hallazgos más característicos de *C. pseudotuberculosis* es que las cepas *ovis* altamente clonales, mientras que las cepas *equi* exhiben una mayor plasticidad genómica. Mientras que los mecanismos de patogenicidad e interacción hospedero-patógeno más estudiados han sido; la capacidad de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células hospederas; además, de la resistencia a la fagocitosis y la modulación de las respuestas inmunes. Algunos otros mecanismos que han sido estudiados son la capacidad de formar cápsulas, la secreción de toxinas y la expresión de genes de respuesta al estrés, además de resistencia



a los fagocitos y supervivencia intracelular. Por otro lado, PLD es el factor de virulencia más estudiado, y el más utilizado para la implementación de todo tipo de vacunas; sin embargo, hasta el momento no ha conferido una protección óptima contra este patógeno a pesar de los múltiples intentos de agregar adyuvantes y otros factores de virulencia. Finalmente, en relación con la adaptación y selección del genoma se han observado dos vertientes, los estudios que correlacionan la adaptación genómica a la influencia del medio ambiente y los estudios que relacionan la adaptación del genoma a la influencia del hospedero. En la última vertiente es necesario tener en consideración la influencia del hierro en el ciclo celular del patógeno ya que juega un papel vital en la biología y patogenicidad de la bacteria. Actuando como un cofactor esencial para el crecimiento, el metabolismo, la regulación genética y la virulencia, según evidencias descritas en múltiples estudios. Debido a esto es necesario reconsiderar el enfoque de los blancos vacunales. Teniendo en cuenta que *C. pseudotuberculosis* es un patógeno altamente especializado en la captación de hierro y aunque se han diseñado vacunas dirigidas contra PLD existen otros sistemas especializados en la captación de este, estos sistemas deben ser tomados en cuenta durante el diseño de blancos vacunales dirigidos contra la captación de hierro.

Bibliografía

- Bernardes, J. S., Eberle, R. J., Vieira, F. R. J., and Coronado, M. A. (2020). A comparative pan-genomic analysis of 53 *C. pseudotuberculosis* strains based on functional domains. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(18), 6974–6986. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1805017>.
- De Sá, M. C. A., Da Silva, W. M., Rodrigues, C. C. S., Rezende, C. P., Marchioro, S. B., Filho, J. T. R. R., De Jesus Sousa, T., De Oliveira, H. P., Da Costa, M. M., Figueiredo, H. C. P., Portela, R. D., De Paula Castro, T. L., Azevedo, V., Seyffert, N., and Meyer, R. (2021). Comparative Proteomic Analyses Between Biofilm-Forming and Non-biofilm-Forming Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated From Goats. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.614011>
- El Damaty, H. M., El-Demerdash, A.S., Abd El-Aziz, N.K., Yousef, S.G., Hefny, A.A., Abo Remela, E.M., Shaker, A. and Elsohaby, I., 2023. Molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from caseous lymphadenitis of smallholder sheep and goats. *Animals*, 13(14), 2337. <https://doi.org/10.3390/ani13142337>.
- Gallardo, A.A., Toledo, R.A., González Pasayo, R.A., Azevedo, V., Robles, C., Paolicchi, F.A. and Esteveo Belchior, S.G., 2019. *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*: Evaluación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*. *Revista Argentina de Microbiología*,



- 51(2), pp. 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.12.001>.
- Galvão, C. E., Fragoso, S. P., de Oliveira, C. E., Forner, O., Pereira, R. R. B., Soares, C. O., and Rosinha, G. M. S. (2017). Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. *BMC microbiology*, 17(1), 202. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1110-7>.
- Hiller, E., Hörz, V., and Sting, R. (2024). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Whole genome sequencing reveals unforeseen and relevant genetic diversity in this pathogen. *PLoS ONE*, 19(8). e0309282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309282>
- Ibraim, I. C., Parise, M. T. D., Parise, D., Sfeir, M. Z. T., de Paula Castro, T. L., Wattam, A. R., Ghosh, P., Barh, D., Souza, E. M., Góes-Neto, A., Gomide, A. C. P., and Azevedo, V. (2019). Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation. *BMC genomics*, 20(1), 663. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6018-1>
- İlhan, Z. (2020). In Vitro Antimicrobial Susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated from Sheep with Caseous Lymphadenitis. *Kocatepe Veterinary Journal*, 1. <https://doi.org/10.30607/kvj.738662>.
- McKean, S. C., Davies, J. K., and Moore, R. J. (2007). Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology*, 153(7), 2203–2211. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/005926-0>.
- Möller, J., Bodenschatz, M., Sangal, V., Hofmann, J., & Burkovski, A. (2022). Multi-Omics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* 12CS0282 and an in silico reverse vaccinology approach reveal novel vaccine and drug targets. *Proteomes*, 10(4), 39. <https://doi.org/10.3390/proteomes10040039>
- Pinto, A. C., De Sá, P. H. C. G., Ramos, R. T. J., Barbosa, S., Barbosa, H. P. M., Ribeiro, A. C., Silva, W. M., Rocha, F. S., Santana, M. P., De Paula Castro, T. L., Miyoshi, A., Schneider, M. P. C., Silva, A., and Azevedo, V. (2014). Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-14>.
- Raynal, J. T., Da Rocha, M. S. N., Da Silva Cavalcanti, N. A., Bastos, B. L., De Farias, A. P. F., Da Costa Silva, M., Da Conceição Aquino De Sá, M., De Moura-Costa, L. F., Portela, R. W. D., Trindade, S. C., and Nascimento, R. J. M. (2022). Influence of Iron Chelating Agents on the *in Vitro* Growth Curve of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. *Ensaios E Ciência C Biológicas Agrárias E Da Saúde*, 26(2), 270–280. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2022v26n2p270-280>.



- Rhodes, D., Magdesian, K., Byrne, B., Kass, P., Edman, J., and Spier, S. (2015). Minimum Inhibitory Concentrations of Equine *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates (1996–2012). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(1), 327–332. <https://doi.org/10.1111/jvim.12534>
- Ribeiro, D., Rocha, F.deS., Leite, K. M., Soares, S. de C., Silva, A., Portela, R. W., Meyer, R., Miyoshi, A., Oliveira, S. C., Azevedo, V., and Dorella, F. A. (2014). An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Veterinary research*, 45(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-28>.
- Rebouças, M. F., Loureiro, D., Barral, T. D., Seyffert, N., Raynal, J. T., Sousa, T. J., Figueiredo, H. C. P., Azevedo, V., Meyer, R., & Portela, R. W. (2020). Cell wall glycolipids from *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains with different virulences differ in terms of composition and immune recognition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 2101–2110. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00343-9>
- Rodríguez Domínguez, M. C., Montes de Oca Jiménez, R., and Varela-Guerreo, J. A. (2021). Caseous lymphadenitis: Virulence factors, pathogenesis and vaccines. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12(4), 1221–1249. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5699>.
- Shadnezhad, A., Naegeli, A., & Collin, M. (2016). CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. *BMC Microbiology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0884-3>
- Zavala-Vargas, D. I., Montes-De-Oca-Jiménez, R., Ruiz-Riva-Palacio, M. E., Del Carmen Gutiérrez-Castillo, A., Rivadeneira-Barreiro, P. E., Arteaga-Troncoso, G., Zambrano-Rodríguez, P. C., Sánchez-Aparicio, P., Ibancovich-Camarillo, J. A., De-Castro-Soares, S., & De Carvalho Acevedo, V. A. (2025). Análisis de genotipo y fenotipo de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 28(2). <https://doi.org/10.56369/tsaes.6192>