



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA “SAN JUAN BOSCO”
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD**

***Estudio de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*,
agente etiológico de *Linfoadenitis Caseosa*,
en pequeños rumiantes.***

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctora en Bioquímica

Tesista: Adriana Alicia Gallardo

Directora: Dra. Silvia Estevao Belchior

Co-Director: Mg. Fernando Paolicchi

2020



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA “SAN JUAN BOSCO”
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**Estudio de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*,
agente etiológico de Linfadenitis Caseosa,
en pequeños rumiantes**

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctora en Bioquímica

Tesista: Adriana Alicia Gallardo

Directora: Dra. Silvia Estevao Belchior

Co-Director: Mg. Fernando Paolicchi

2020

“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento.”

LOUIS PASTEUR

A mis padres, mis grandes pilares, en especial a mi amada madre

A mi hijo Nicolás, mi luz y mi motivación

A mi esposo Daniel, mi gran compañero y sostén

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a la **Educación Pública** que me permitió formarme desde el nivel inicial (Escuela provincial N° 1), donde comencé en mi salita de 5 años. Continué con la primaria, luego el colegio secundario en la ex ENET N°1 y finalmente llegue a la casa de altos estudios, la Universidad Nacional de la Patagonia “San Juan Bosco”; donde comencé y continuo realizando una Carrera Académica y especializándome en el área de la Microbiología Clínica.

Es así, que agradezco:

A mi directora Dra. Silvia Estevao Belchior por la posibilidad de realizar este trabajo de tesis doctoral, en el área de Microbiología Clínica que me apasiona y en la cual me desempeño hace 19 años.

A la Secretaria de Posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de la Patagonia “San Juan Bosco”, por brindarme las ayudas económicas para compra de insumos (reactivos, test y otros materiales) que fueron requeridos para realizar este trabajo de tesis.

A la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia “San Juan Bosco”, por el aporte económico para compra de insumos y para movilidad, que permitió la transferencia de resultados, generados a partir de este trabajo de tesis doctoral, en Congresos de índole Nacional e Internacional.

De todo corazón a los profesionales y técnicos del INTA Balcarce: Claudia, Roxana, Andrea, Ramón, Karina, Maria Rosa..., principalmente a mi Co-Director Mg. Fernando Paolicchi por su aliento y ayuda incondicional en todo momento.

También a la Ing. Agr. - Esp. en Producción Animal Mónica de la Torre, a la Ing. Qca. Carolina Sullivan y al Dr. Gustavo Eyherabide que además de interpretar y analizar cromatogramas, compartimos momentos hermosos durante mi estadía en Balcarce.

Al Med. Vet. Oscar Jensen, que nos visitó con la inquietud en el tema de Linfadenitis Caseosa que nos motivó a comenzar a investigar y luego profundizar más con la realización de este trabajo.

A la Dra. Laura Chiapparrone de la Facultad de Ciencias Veterinarias - U.N.C.P.B.A. de la ciudad de Tandil, por todos sus aportes y conocimiento sobre microscopia electrónica en bacterias.

A la t c. Mónica Opedisano de la Universidad Nacional de Mar del Plata, que me permitió realizar la microscopía electrónica del cultivo celular.

A la t c. Celina Tiedemann del Laboratorio Biología por su intermedio pude enviar muestras a la ciudad de Bahía Blanca para realizar la Microscopía Electrónica de la bacteria en estudio.

A la Cátedra de Biología (de la cual formo parte) para la carrera de Medicina de esta universidad a cargo de Mg. Susana Perales, en especial a Susana por su calidez y acompañamiento en todo momento durante esta etapa de mi tesis doctoral.

A la Lic. Cristina Massera por su colaboración en la aplicación de los Sistemas Informáticos Geográficos.

Al Dr. Martin Varisco y Lic. Julia Colombo por estar siempre dispuestos a ayudarme a resolver ciertos aspectos estadísticos y de forma.

Al Dr. Héctor Saixzo (QEPD), Damián Gil y Mauro Marcinkevicius (Instituto de Desarrollo Costero) que me brindaron una gran ayuda en todo lo relacionado a la estadística.

Al Dr. Osvaldo Córdoba y a la Dra. Roxana Silva por sus aportes en distintas actividades de este trabajo doctoral.

Al Gremio de Docentes Universitarios por la ayuda económica que me permitió solventar traslados durante mi concurrencia en el INTA-Balcarce y gastos de impresión.

A mis auxiliares alumnas, Carlita y Bren por sus aportes tecnológicos (generación millennial), pero sobre todo por su energía y la alegría que siempre me transmiten.

A los técnicos de laboratorio Luis y Pablo que siempre estuvieron dispuestos a colaborar en lo que necesitaba.

A mis colegas amigas que siempre me alentaron a finalizar la tesis,...Susana, Mónica, Vanesa, Cecilia, Laura,... Y a otros profesionales como la Mg. Rosalia Broitman que siendo de otra disciplina y sin conocerme, gentilmente me recibí y aconsej  en la búsqueda de la estructura del manuscrito y animo a concluir este trabajo.

A mis amigas de la vida, Rosana, Susana, Claudia, María, Vivi, Marisa...

A mis padres, Alicia y Manuel y a mi hijo, Nicolás, que siempre me alentaron a seguir aún en los momentos más difíciles, ellos siempre están ahí!!!.

A mi amado esposo Daniel, gracias de todo corazón por todo y tanto.

Y a DIOS que permite que esto sea posible, siempre est  a mi lado, me ilumina y guía mis pasos en la vida.

Realmente deseo que el esmero, esfuerzo y trabajo dedicado a realizar y escribir esta Tesis Doctoral se vea reflejado en cada una de las páginas de este manuscrito. Parece un sueño haber llegado hasta este momento después de tantos avatares, pero como dice Paulo Coelho... *"Nunca desista de un sueño, solo trata de ver las señales que te llevan a él"*...

Los invito a disfrutar y conocer un poco más en profundidad de este tema relacionado con la bacteriología, disciplina que me apasiona y motiva día a día a seguir en el emocionante mundo de la investigación científica.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	6
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	11
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. El agente etiológico.....	14
1.2. Patogenia y factores de virulencia.	16
1.3. La enfermedad	27
1.3.1. Ovejas	27
1.3.2. Cabras	28
1.3.3. Caballos	30
1.3.4. Vacas.....	30
1.3.5. Camélidos	31
1.3.6. Búfalos.....	31
1.3.7. Cerdos.....	31
1.3.8. Casos humanos (potencial zoonótico).....	31
1.4. Diagnóstico	35
1.5. Tratamiento.....	37
1.6. Control y prevención	38
1.7. Epidemiología.....	38
1.8. Transmisión.....	40
1.9. Sistemas de Información Geográfica (SIG)	41
1.10. Clasificación de Köppen	43
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	46
2.1. Justificación.....	46
2.2. Objetivos	48
2.2.1. Objetivos Generales	48
2.2.2. Objetivos particulares.....	48
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1. Aislamiento e identificación de <i>C. pseudotuberculosis</i> de diferentes orígenes.....	51
3.1.1-Selección de aislamientos.....	51
3.1.2-Cultivo, caracterización de colonias y conservación de los aislamientos	54
3.2. Identificación.....	54
3.2.1-Morfología bacteriana	54
3.2.2. Bioquímica.....	54
3.2.3. Caracterización genotípica.	56
3.3. Estudio de sensibilidad a antibióticos.....	56
3.3.1. Determinación de la sensibilidad antibiótica por métodos de difusión en agar.	56
3.3.2. Determinación de la sensibilidad antibiótica por métodos de dilución.	57
3.4. Estudio de mecanismo de resistencia	58
3.4.1. Determinación de la presencia de integrones que vehiculizan genes de resistencia.	58

3.5.-Estudio de los factores de virulencia.....	59
3.5.1. Ácidos micólicos	59
3.5.1.1. Técnica según Minnikin <i>et al.</i> (1975).....	59
3.5.1.2 Técnica según Chiani <i>et al.</i> (1996) y Zerbini <i>et al.</i> (1996) con modificaciones.....	60
3.5.2. Exotoxina: Fosfolipasa D.....	63
3.5.2.1. Método de screening.....	63
3.5.2.2. Obtención y caracterización preliminar de la exotoxina	64
3.5.3. Enzimas.	65
3.5.3.1. Actividad hemolítica	65
3.5.3.2. Actividad proteolítica.....	66
3.5.3.3. Actividad lipolítica.....	66
3.5.3.4. Otras.....	67
3.5.4. Capacidad de adherencia celular de <i>C. pseudotuberculosis</i> y visualización de efectos citopáticos (ECP).....	68
3.5.5. Desarrollo de biopelículas por <i>C. pseudotuberculosis</i>	71
3.6. Análisis multivariante.....	72
3.6.1. Métodos de interdependencia – datos métricos.	72
3.6.1.1. Análisis cluster.	72
3.6.1.2. Análisis de componentes principales.....	73
3.7. Sistemas de información geográfica (SIG).....	73
3.7.1. Distribución espacial de aislamientos.....	73
3.7.2. Distribución por descripción	73
3.7.3. Distribución espacial de grupos.....	73
3.7.4. Distribución de aislamientos relacionados con la clasificación de climas según Köppen.....	74
3.8. Aspectos bioéticos y normas de bioseguridad.	74
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	76
4.1. 1. Características de los aislamientos analizados.....	76
4.1.2. Cultivo, caracterización de colonias y conservación de los aislamientos.	77
4.2. Identificación.....	77
4.2.1. Morfología bacteriana.....	77
4.2.2. Bioquímica.....	78
4.2.3. Caracterización genotípica	80
4.3. Estudio de sensibilidad a antibióticos	83
4.3.1. Determinación de la sensibilidad antibiótica por métodos de difusión en agar.....	83
4.3.2. Determinación de la sensibilidad antibiótica por métodos de dilución.	88
4.4. Estudio de mecanismos de resistencia.	89
4.4.1. Detección de integrones.....	89
4.5. Estudio de los factores de virulencia.....	89
4.5.1. Ácidos micólicos.	89
4.5.1.1. Técnica según Minnikin <i>et al.</i> (1975).....	89
4.5.1.2. Técnica según Chiani <i>et al.</i> (1996) y Zerbini <i>et al.</i> (1996) con modificaciones.....	91
4.5.2. Exotoxina: Fosfolipasa D (FLD).....	100

4.5.2.1. Método de screening.....	100
4.5.2.2. Obtención y caracterización preliminar de la exotoxina	101
4.5.4. Capacidad de adherencia de <i>C. pseudotuberculosis</i> y visualización de ECP.....	104
4.5.5. Capacidad de <i>C. pseudotuberculosis</i> para el desarrollo de biopelículas.....	121
4.6. Análisis geográfico	124
4.6.1. Distribución espacial de aislamientos.....	124
4.6.2. Distribución por descripción.....	126
4.6.3. Distribución espacial de los grupos.....	129
4.6.4. Distribución de aislamientos relacionada con la clasificación de climas según Köppen....	131
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....	135
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	155
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	158

RESUMEN

Corynebacterium pseudotuberculosis, agente etiológico de linfadenitis caseosa (LC), es un bacilo Gram positivo, pleomórfico con forma de cocobacilo y agrupación en empalizada. Es inmóvil, no esporulado, no capsulado, anaerobio facultativo y desarrolla en medios de cultivos enriquecidos a 37 °C y pH óptimo 7 a 7,2. La LC es una enfermedad infecto-contagiosa de evolución crónica, que afecta principalmente ovejas, cabras y otros animales domésticos. En equinos y vacunos se manifiesta como linfangitis ulcerativa y en vacas lecheras puede causar mastitis. La LC en ovejas adultas se presenta en forma cutánea y/o visceral. Es considerada una zoonosis ocupacional a nivel mundial. Existen investigaciones y publicaciones sobre la enfermedad tanto en nuestro país como en Canadá, Australia, Francia, Holanda, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Brasil, Suiza, Uruguay, Venezuela, Turquía y Cuba entre otros. Los objetivos de esta tesis fueron estudiar las características morfológicas, fisiológicas, metabólicas y de virulencia en aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, de distintas localizaciones geográficas, aislados de lesiones de LC en pequeños rumiantes y determinar si existe relación entre estos aislamientos locales y de otras regiones con alta prevalencia de LC. Se estudiaron 35 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de distintos orígenes: 7 de caprinos y 28 de ovinos, aislados de distintas lesiones y de diferentes lugares geográficos; 21 aislamientos de Rio Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego (Argentina) y 14 aislamientos de los estados de San Pablo: Aracatuba y de Salvador de Bahía (Brasil). Los mismos fueron identificados y confirmados por métodos bioquímicos y moleculares. Por otro lado se determinó la sensibilidad a antibióticos por los métodos de difusión en agar y dilución. Además, se investigó la presencia de integrones que contienen genes de resistencia. Asimismo se estudiaron factores de virulencia, entre ellos: ácidos micólicos, que se determinó mediante cromatografía en capa delgada (TLC) de los ésteres metílicos de ácidos micólicos extraídos de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*; exotoxina (foslipasa D) que es el principal factor de virulencia de este microorganismo y se determinó su acción mediante las pruebas de CAMP y CAMP reversa y mediante la técnica de SDS-PAGE se obtuvo su masa molecular aparente; producción de otras enzimas extracelulares y capacidad de formación de biopelículas, para la cual se utilizó un método colorimétrico con cristal violeta al 0,1 % que permitió categorizar dicha capacidad. Mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido, se determinó la interacción de una selección de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* en líneas celulares MDBK (Madin Darb Bovine Kidney) y posteriormente efectos citopáticos sobre las células, utilizando técnicas de coloración de Giemsa y microscopia óptica. Finalmente se aplicaron

sistemas de información geográfica (SIG), como herramienta de análisis espacial de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis provenientes de distintos sitios geográficos con el fin de encontrar una relación entre los mismos. Los resultados obtenidos mostraron que los aislamientos fueron positivos para la producción de catalasa y ureasa; mostraron reacción variable para α -glucosidasa y fosfatasa alcalina y el 100 % fueron negativos para nitrato reductasa, pirazinamidas, pirrolidonil arilamidasa, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, hidrólisis de esculina y gelatina a 22 °C y a 37 °C. Se determinó que el 100 % de los aislamientos provenientes de la Patagonia Argentina y la región noreste de Brasil, correspondían a la **biovariedad ovis**. Se registraron biotipos en los aislamientos en relación a la fermentación de los azúcares glucosa, galactosa y maltosa, determinándose que el 33 % de los aislamientos correspondieron al biotipo Glu⁺Gal⁻Mal⁻ y el 67 % a Glu⁺Gal⁻Mal⁺. El 33 % de los aislamientos de origen ovino y provenientes de Argentina presentó el biotipo Glu⁺Gal⁻Mal⁻. Los restantes aislamientos de Argentina al igual que los procedentes de Brasil fermentaron la maltosa, haciendo referencia al biotipo Glu⁺Gal⁻Mal⁺. Este biotipo se observó en un 70 % en la presentación cutánea, mientras que el biotipo Glu⁺Gal⁻Mal⁻ se manifestó en un 60 % en la presentación visceral. Por el método de difusión, amoxicilina-clavulánico, ampicilina, cefotaxima, cefoxitina, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomina, gentamicina, imipenem, kanamicina, norfloxacina, penicilina, rifampicina, tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol y vancomicina fueron activos frente al 100 % de los aislamientos, mientras que amicacina y oxacilina presentaron resultados variables. En los aislamientos que desarrollaron frente a amicacina y oxacilina, se investigó la presencia de integrones de clase 1. El resultado fue negativo, sugiriendo la ausencia del integrón asociado a la resistencia antibiótica. Utilizando el método de dilución, los antibióticos más activos correspondieron a los grupos de cefalosporinas, gluco péptidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas. Se demostró menor actividad de β -lactámicos y aminoglucósidos. No se registró variabilidad en los perfiles antibióticos en los aislamientos procedentes de diferentes fuentes.

De acuerdo a los frentes de corrida (Rf) obtenidos, *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis presentó los ácidos micólicos AM tipo IV, V y VI. Los aislamientos de Argentina y de Brasil mostraron el mismo perfil de ácidos micólicos. Las pruebas de CAMP y CAMP reversa resultaron positivas poniendo en evidencia la acción de la exotoxina. La masa molecular aparente de la misma se estimó en 29,55 kDa. Se registró un 100 % de actividad hemolítica en sangre de oveja, confirmando la producción de fosfolipasa D. El 3 % de los aislamientos no

presentaron hemólisis sobre eritrocitos humanos y ninguno tuvo acción sobre eritrocitos de equino, este resultado podría deberse a la composición fosfolípida específica de la membrana eritrocitaria de cada especie de mamífero.

Los aislamientos exhibieron el siguiente perfil enzimático: el 100 % mostró positiva la producción de catalasa, ureasa, carboxilesterasa, amilasa, hemolisina en sangre de carnero y actividad proteolítica. El 48 % y el 97 % de los aislamientos exhibieron positiva la producción de caseinasa y hemolisina en sangre humana, respectivamente. El 100 % de los aislamientos mostró negativa la producción de lecitinasa, lipasa verdadera, fenilalanina deaminasa, hemolisina en sangre de caballo y gelatinasa a 4 °C y 37 °C.

Los resultados de los diferentes ensayos confirmaron la producción de la fosfolipasa y otras enzimas y sugieren el papel de estos factores de virulencia sobre los efectos citopáticos que se observaron en los cultivos celulares durante un período de 72 h. Se demostró la capacidad de adherencia a las 6, 24 y 72 h post infección; y se observó que las bacterias provocaron los siguientes efectos citopáticos sobre las células MDBK: lisis celular, vacuolas citoplasmáticas y alteración de la relación núcleo/citoplasma. Los resultados de lisis celular fueron analizados estadísticamente. No se encontraron diferencias significativas para las 6 h post infección del cultivo, mientras que si existieron diferencias significativas a partir de las 24 h, observándose 100 % de lisis celular en el 50 % de los aislamientos estudiados. Respecto de la vacuolización citoplasmática el análisis estadístico en este caso reveló diferencias significativas desde las 6 h de iniciada la infección. El 50 % de los aislamientos provocó la vacuolización citoplasmática en más del 60 % de la monocapa celular a las 72 h postinfección. Para el análisis de la alteración en la relación núcleo/citoplasma se observaron diferencias significativas entre los distintos aislamientos a diferentes tiempos de infección. El 50 % provocaron la alteración en la relación núcleo/citoplasma en más del 40 % de la monocapa celular a las 24 h postinfección.

Todos los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* mostraron la capacidad de producir biopelículas y el mayor porcentaje correspondió a productores moderados (47 %). Entre los aislamientos de Argentina predominaron tanto los productores débiles (36 %) como los moderados (36 %) mientras que en Brasil el 75 % de los aislamientos mostraron capacidad de producción de biopelículas moderada y no se detectaron productores fuertes. La aplicación de SIG permitió el abordaje de los resultados desde una visión interdisciplinaria. La distribución dispersa de los aislamientos condujo a realizar el análisis de los mismos considerando la variable clima. Este estudio, permitió encontrar una relación entre los aislamientos provenientes de provincias de la Patagonia Argentina y estados de Brasil. Surgieron dos

grupos bien diferenciados, el 74 % tuvo una relación directa con el clima seco por otra parte el 26 % de los aislamientos se ubicó en zonas asociadas a la clasificación de clima lluvioso y templado

A partir de estos resultados se concluye que:

-Existe una amplia variabilidad fenotípica entre los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* y presentan capacidades diferenciales en su metabolismo, sensibilidad antibiótica, grados de intensidad del daño celular y de formación de biopelículas. Conocer estas características permitió establecer aspectos diferenciales y hallar una vinculación climática-estacional con respecto a su presentación endémica en las regiones de procedencia de los aislamientos investigados.

-Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de ambos países corresponden a la **biovariedad ovis**. Entre los aislamientos de Argentina y Brasil existen variantes bioquímicas para la producción de enzimas α -glucosidasa y fofafatasa alcalina y en la fermentación de la maltosa. Se destacan 2 biotipos, **Glu⁺ Gal⁻ Malt⁻** y **Glu⁺ Gal⁻ Malt⁺**. Siendo este último más frecuente en la presentación cutánea y el primero en ambas formas, cutánea y visceral.

-El 100 % de los aislamientos corresponden a *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis confirmados mediante la secuenciación del gen que codifica para el 16S ARNr, con un muy alto grado de similitud frente a cepas de referencia depositadas en bancos genéticos.

-Una amplia gama de antibióticos utilizados en salud pública y/o veterinaria, ensayados por el método de difusión en agar, *in vitro*, resultan eficaces frente a *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis. Existen entre los aislamientos resultados variables frente a amicacina y oxacilina. Los aislamientos con y sin desarrollo frente a amicacina provienen tanto de la región patagónica Argentina como de los estados de Brasil.

-En este estudio, no se detectaron integrones clase 1 en los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis que desarrollaron frente a aminoglucósidos; por lo tanto es posible que el mecanismo de resistencia este dado por otros elementos genéticos.

-En el método de dilución (CIM) *in vitro*, se demuestra una alta sensibilidad de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis frente a diferentes grupos de antibióticos, pero también menor actividad de β -lactámicos y aminoglucósidos.

-Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis procedentes de diferentes fuentes no registran variabilidad en los perfiles antibióticos.

-A pesar de las diferencias de localización geográfica, sitio de lesión y especie animal, los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis de Argentina y de Brasil muestran el mismo perfil de ácidos micólicos: tipo IV, V y VI, que corresponden a cetomicolatos, epoximicolatos y micolatos dicarboxílicos, respectivamente.

-El 100 % de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis presentan la fosfolipasa D, confirmada por técnica de PCR (gen *pld*) y revelada en el laboratorio a través de las pruebas bioquímicas de CAMP y CAMP reversa. Ambas pruebas fueron claves para la identificación de *C. pseudotuberculosis*, dado que permitieron la expresión del principal factor de virulencia de este microorganismo.

-*C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis es capaz de adherirse e invadir líneas celulares no fagocíticas, permaneciendo viable hasta 72 h, induciendo diferentes grados de intensidad en los efectos citopáticos estudiados.

-Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis, estudiados en este trabajo, demuestran virulencia debido a la producción de algunas enzimas (catalasa, caseínasa, carboxilesterasa, amilasa, ureasa, hemolisina), capacidad de adherencia e internalización en líneas celulares no fagocíticas con producción de ECP y formación de biopelículas.

-El análisis a través de SIG resulta útil para identificar como variable al clima permitiendo establecer un vínculo climático-estacional entre aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis provenientes de zonas endémicas de LC de Argentina y de Brasil.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis, an etiological agent of caseous lymphadenitis (CL), is a gram-positive bacillus, pleomorphic in a coccobacillus shaped and in a palisade grouping. It is immobile, non-sporulating, non-encapsulated, facultatively anaerobic and it develops in environment enriched cultures at 37 °C and the optimum pH at 7 to 7.2. CL is an infectious-contagious disease of chronic evolution, which mainly affects sheep, goats and other domestic animals. In horses and cows, it manifests itself as ulcerative lymphangitis and in dairy cows it can result in mastitis. CL in adult sheep can appear in cutaneous and/or visceral form. It is considered a zoonotic occupational disease worldwide. There are research studies and publications about the disease in our country as well as in Canada, Australia, France, Holland, New Zealand, United States, Brazil, Switzerland, Uruguay, Venezuela, Turkey and Cuba, among others. The objectives of this thesis were to study the morphological, physiological, metabolic and virulence factors in isolates of *C. pseudotuberculosis*, from various geographical areas, isolates of CL lesions in small ruminants and to determine if there is a relationship between these local isolates and other regions with high prevalence of CL. On the one hand, there were studied 35 of isolates *C. pseudotuberculosis* from different origins: 7 goats and 28 from sheep with different lesions and from different geographical locations. 21 separate cases from Rio Negro, Chubut, Santa Cruz and Tierra del Fuego (Argentina) and 14 isolates from the states of Sao Paulo: Aracatuba and Salvador de Bahia (Brazil). These were identified and confirmed by biochemical and molecular methods. On the other hand, the sensitivity to antibiotics was determined by agar diffusion and dilution methods. In addition, it was studied the presence of integrons containing resistance genes. Virulence factors were also studied, among them: mycolic acids, which were determined by thin-layer chromatography (TLC) of the methyl esters from mycolic acids extracted from *C. pseudotuberculosis* isolates. Another factor studied was exotoxin (Phospholipase D), which is the main virulence factor of this microorganism and it was determined its action through CAMP and reverse CAMP tests and through SDS-PAGE technique its apparent molecular mass was obtained. Third, the production of other extracellular enzymes and biofilm formation capacity, for which it was used a colorimetric method with violet crystal at 0.1% that allowed to classify its capacity.

Through scanning electron microscopy, it was determined the interaction of a selection of *C. pseudotuberculosis* isolates in MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) cell lines and later, cytopathic effects on the cells, using Giemsa staining and optical microscopy techniques. Finally, geographic information systems (GIS) were applied as a tool for spatial analysis of *C.*

pseudotuberculosis biovari ovis isolates from different geographical sites in order to find a relationship between them. The results obtained showed that the isolates were positive for the production of catalase and urease, they also showed variable reaction for α -glucosidase and alkaline phosphatase and 100 % were negative for nitrate reductase, pyrazinamidase, pyrrolidonyl arylamidase, β -glucuronidase, β -galactosidase, N-acetyl β -glucosaminidase, esculin hydrolysis and gelatin at 22 °C and 37 °C. It was determined that 100 % of the isolates from the Argentinian Patagonia and the northeast region of Brazil corresponded to the **biovari ovis**. There were registered biotypes in the isolates in relation to the fermentation of glucose, galactose and maltose sugars, the results determined that 33 % of the isolates corresponded to Glu⁺Gal⁻Mal⁻ biotype and 67 % to Glu⁺Gal⁻Mal⁺. The 33 % of the isolates of ovine origin coming from Argentina presented the biotype Glu⁺Gal⁻Mal⁻. The rest of the Argentinean isolates as well as those from Brazil fermented the maltose, referring to the Glu⁺Gal⁻Mal⁺ biotype. This biotype was observed in 70 % of the cutaneous sample, while the biotype Glu⁺Gal⁻Mal⁻ manifested itself in 60 % in the visceral sample. By the diffusion method, amoxicillin-clavulanic, ampicillin, cefotaxime, cefoxitin, ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, gentamicin, imipenem, kanamycin, norfloxacin, penicillin, rifampicin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and vancomycin were active in respect to 100 % of the isolates, while amikacin and oxacillin showed variable results. In the isolations that developed with amikacin and oxacillin, it was found the presence of class 1 integrons. The result was negative, suggesting that the integron linked to the antibiotic resistance wasn't present. Using the dilution method, the most active antibiotics corresponded to the groups of cephalosporins, glycopeptides, macrolides, quinolones and tetracyclines. There was less activity of β -lactams and aminoglycosides. No variability in antibiotic profiles was recorded in isolates from different sources.

According to the corrida fronts (Rf) obtained, *C. pseudotuberculosis* biovari ovis presented the MA types IV, V and VI. Isolates from Argentina and Brazil showed the same mycolic acid profile. CAMP and CAMP reversal tests were positive, exposing the action of exotoxin. Its apparent molecular mass was estimated at 29.55 kDa. A 100 % hemolytic activity was recorded in sheep blood, confirming the production of phospholipase D. The 3 % of the isolates did not show hemolysis on human erythrocytes and none had action on equine erythrocytes, this result could be due to the specific phospholipidic composition of the erythrocyte membrane of each mammal species.

The isolates showed the following enzymatic profile: 100 % showed positive production of catalase, urease, carboxyl esterase, amylase, hemolysin in ram blood and proteolytic activity. The 48 % and 97 % of the isolates showed positive the production of caseinase and hemolysin in human blood, respectively. 100 % of the isolates resulted negative in the production of lecithinase, true lipase, phenylalanine deaminase, hemolysin in horse blood and gelatinase at 4 °C and 37 °C.

The results of the different trials confirmed the production of phospholipases and other enzymes and suggest the role of these virulence factors on the cytopathic effects that were observed in the cell cultures during a period of 72 h. Adherence capacity was demonstrated at 6, 24 and 72 h post-infection; and it was observed that the bacteria caused the following cytopathic effects on MDBK cells: cell lysis, cytoplasmic vacuoles, and alteration of the nucleus/cytoplasm ratio. The results of cell lysis were analyzed statistically. No significant differences were found for 6 h post-infection of the culture, while significant differences existed from 24 h onwards, with 100 % cell lysis being observed in 50 % of the isolates studied. In relation to cytoplasmic vacuolization, the statistical analysis in this case revealed significant differences from 6 hours after the beginning of the infection. The 50 % of the isolations caused the cytoplasmic vacuolization in more than 60 % of the cellular monolayer at 72 h post-infection. For the analysis of the alteration in the nucleus/cytoplasm relation, significant differences were observed among the different isolations at different times of infection. The 50 % caused the alteration in the nucleus/cytoplasm ratio in more than 40 % of the cellular monolayer at 24 h post-infection.

All isolates of *C. pseudotuberculosis* showed the capacity to produce biofilms and the highest percentage corresponded to moderate producers (47 %). Among the isolations from Argentina, both weak (36 %) and moderate (36 %) producers predominated, while in Brazil 75 % of the isolations showed moderate biofilm production capacity and no strong producers were detected. The application of GIS allowed the results to be approached from an interdisciplinary vision. The dispersed distribution of the isolates led to their analysis considering the climate variable. This study allowed finding a relationship between the isolates coming from provinces of the Argentinean Patagonia and states of Brazil. Two well differentiated groups arose, 74 % had a direct relation with the dry climate and 26 % of the isolations were located in areas associated to the classification of rainy and temperate climate.

From these results we conclude that:

-There is a wide phenotypic variability among the isolations of *C. pseudotuberculosis* and they present differential capacities in their metabolism, antibiotic sensitivity, degrees of intensity of

cellular damage and of biofilm formation. Knowing these characteristics allowed establishing differential aspects and finding a climatic-seasonal link with regard to its endemic presentation in the regions of origin of the researched isolations.

-*C. pseudotuberculosis* isolates coming from different countries correspond to the biovariety ovis. Among the Argentinian and Brazilian isolates there are biochemical variants for the production of enzymes a glucosidase and alkaline phosphatase and in the fermentation of maltose. Two biotypes are highlighted: **Glu⁺ Gal⁻ Malt⁻** and **Glu⁺ Gal⁻ Malt⁺**. The latter being the most frequently found at a cutaneous level and the former, in both ways: at the cutaneous level and at the visceral one.

-100 % of the *C. pseudotuberculosis* isolates correspond to the biovariety ovis that were confirmed by using the gen sequencing that codifies the 16S rRNA sharing high probability in the level of similarity to reference strains stored in genetic banks.

-A wide variety of antibiotics for public health care or veterinary usage, done by the agar diffusion method, in vitro, are quite efficient against *C. pseudotuberculosis* biovariety ovis. There are variable results among the isolates that develop resistance against amikacin and oxacillin. The isolates that did develop resistance against and that didn't develop resistance against amikacin come from the Patagonia Argentinian region as well as of the Brazilian estates.

-In this study, class 1 integrons were not detected in the *C. pseudotuberculosis* biovariety ovis isolates that developed resistance against aminoglycosides; therefore, it is possible that the resistance mechanism is given by other genetic elements.

-In the in vitro dilution method (IMC), it shows a high sensitivity of *C. pseudotuberculosis* biovar ovis to different groups of antibiotics, but also less activity of β -lactams and aminoglycosides.

-Isolates of *C. pseudotuberculosis* biovar ovis from different sources do not show variability in antibiotic profiles.

-Despite differences in geographical location, site of lesion and animal species, *C. pseudotuberculosis* biovar ovis isolates from Argentina and Brazil show the same profile of mycolic acids: type IV, V and VI, corresponding to cetomycolates, epoxycolates and dicarboxylic mycolates, respectively.

-100 % of *C. pseudotuberculosis* biovar ovis isolates present phospholipase D, confirmed by PCR technique (*pld* gene) and revealed in the laboratory through CAMP and CAMP reverse biochemical tests. Both tests were key for the identification of *C. pseudotuberculosis* since they showed the main virulence factor of this microorganism.

-*C. pseudotuberculosis* biovariety ovis is able to adhere and invade non-phagocytic cell lines, remaining viable up to 72 h, inducing different degrees of intensity in the studied cytopathic effects.

-Isolates of *C. pseudotuberculosis* biovar ovis, studied in this work, demonstrate virulence due to the production of some enzymes (catalase, caseinase, carboxyl esterase, amylase, urease, hemolysin), adherence capacity and internalization in non-phagocytic cell lines with production of CPE and biofilm formation.

-The analysis through GIS is useful to identify the weather conditions as a variable allowing to establish a climate-seasonal link between *C. pseudotuberculosis* biovar ovis isolates from CL endemic areas of Argentina and Brazil.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ACP:** Análisis de componentes principales
- ADNr:** Ácido desoxirribonucleico ribosómico
- AG:** Ácido graso
- AM:** Ácido micólico
- ANOVA:** Análisis de la varianza
- ARNr:** Ácido ribonucleico ribosómico
- ATCC:** American Type Culture Collection
- CAMP:** Prueba de Christie Atkins Munch Peterson
- CAT:** Catalasa
- CIM:** Concentración inhibitoria mínima
- CIM₅₀:** Concentración inhibitoria mínima frente al 50 % de los aislamientos
- CIM₉₀:** Concentración inhibitoria mínima frente al 90 % de los aislamientos
- CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute
- CTA:** Agar cistina triptéina
- C1P:** Ceramida 1-fosfato
- DCA:** Análisis de correspondencias (sin tendencias)
- DE:** Desviación estándar
- ADNsa:** Desoxirribonucleasa
- DO:** Densidades ópticas
- ECP:** Efectos citopáticos
- ESC:** Esculina
- EUCAST:** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- FLD:** Fosfolipasa D
- GEL:** Gelatina
- GLU:** Glucosa
- GLYG:** Glicógeno
- LAC:** Lactosa
- LC:** Linfadenitis caseosa
- MAL:** Maltosa
- MAN:** Manitol
- MDBK:** Madin Darb Bovine Kidney

MEB: Microscopio electrónico de barrido
MEM: Medio Esencial Mínimo
MMT: Monomicolatos de trehalosa
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NIT: Nitritos
OMS: Organización Mundial de la Salud
O/129: 2,4-Diamino-6,7 –di-iso-propilpteridina fosfato
PAL: Fostasa alcalina
PCA: Análisis de componentes principales
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PIZ: Pirazinamidasas
pld: Fosfolipasa D
PyrA: Pirrolidonilarilamidasas
RIB: Ribosa
rpoB: Subunidad β de la ARN polimerasa
SAC: Sacarosa
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SIG: Sistemas informáticos geográficos
SRD: Sin raza definida.
SPE: Sustancias poliméricas extracelulares
TD: Toxina diftérica
TDM: Trehalosa
TSA: Agar tripteína soya
UFC: Unidades formadoras de colonias
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
URE: Ureasa
XYL: Xilosa
 α GLU: α -glucosidasa
 β GAL: β -galactosidasa
 β GUR: β -glucuronidasa
 β NAG: N-acetil- β -glucosaminidasa

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La explotación ovina es un recurso económico genuino de la Patagonia Austral Argentina. Su rendimiento radica en la venta de lana, carne y cueros en el mercado interno y externo. Por ello, es importante contar con un acabado conocimiento de las patologías prevalentes en la región, máxime si afectan la economía de las fuentes de producción y constituyen una amenaza para la salud humana (Mueller *et al.*, 2015).

En nuestro país, las existencias de ganado ovino han disminuido en forma notable en las últimas décadas; se estima que actualmente hay alrededor de 15,3 millones de cabezas. Sin embargo, con el advenimiento de la Ley Ovina Nacional N° 25 422 se ha incrementado el interés productivo orientado hacia los ovinos de lana fina y de carne. Para que ese sector se expanda, es necesario que las majadas presenten una salud productiva óptima y que sean erradicadas las enfermedades que limitan el comercio nacional e internacional (Solano *et al.*, 2011).

La linfadenitis caseosa (LC) es una patología infecto-contagiosa, que afecta a ovinos y caprinos de la región patagónica Argentina (Estevao Belchior *et al.*, 2006). Provoca alteraciones en ganglios linfáticos (forma cutánea); en órganos importantes, como pulmones, riñones e hígado (forma visceral) y presentaciones clínicas atípicas como toxemia neonatal, artrosinovitis, endometritis, epididimitis, mastitis y orquitis. En otros países que crían ovinos se ha reconocido a la LC como causal de pérdidas económicas significativas, debido al deterioro progresivo del estado general del ovino, que se traducen en la disminución de la producción de lana, carne, leche, desórdenes reproductivos y decomiso de carcasas y vísceras. En ovejas y cabras, el agente etiológico es el *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis, un cocobacilo Gram positivo no esporulado, anaerobio facultativo. (Estevao Belchior *et al.*, 2009).

1.1. El agente etiológico

Corynebacterium pseudotuberculosis, es un bacilo pleomórfico con forma de cocobacilo y agrupación en empalizada. Es inmóvil aunque presenta fimbrias, no esporulado, no capsulado, anaerobio facultativo y desarrolla en medios de cultivos enriquecidos a 37 °C y pH óptimo 7 a 7,2. El cultivo crece inicialmente en forma dispersa en la superficie del agar y luego se torna organizada en forma de masa o empalizada, tomando una coloración crema. Las colonias son secas, opacas y en forma de anillos concéntricos (Aleman & Spier,

2001; Corache García Pulido, 2017, Dorella *et al.*, 2006; Estevao Belchior *et al.*, 2007, Fernández Natal, 2010, Graevenitz & Krech 1992, Solanet *et al.*. 2011, Szwako *et al.*, 2014).

Posee una pared celular, con ácidos micólicos, que lo protege de las enzimas destructoras dentro del fagocito. Produce una fosfolipasa D, que aumenta la permeabilidad vascular facilitando la salida de líquidos y células. Es muy resistente, en el ambiente, a la desecación (Gómez *et al.*, 2015).

La etimología de la palabra “corynebacterium” es de origen griego y hace referencia a la morfología y agrupación de la bacteria. Por otra parte “pseudotuberculosis” es derivado de “pseudo”, que literalmente significa falso y de “tubérculo”, por la semejanza de la lesión con el nódulo que se forma en la tuberculosis (Brown & Olander, 1987; Voigt & Kleine 1975).

C. pseudotuberculosis fue descrito por primera vez en el año 1888 por un veterinario francés llamado Edmond Isidore Nocard, quien lo aisló de un caso de linfangitis bovina. Tres años más tarde, en Budapest, Hugo von Preisz aisló un bacilo de características similares a partir de un absceso renal en oveja y lo denominó Bacilo de Preisz-Nocard. En 1894, Preisz lo describió en detalle, clasificándolo *Bacillus pseudotuberculosis ovis*. En 1911, Buchanan sugirió eliminar el término ovis que indicaba la subespecie. Ya en 1918 Ebersson clasifica nuevamente al bacilo como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Las ediciones del manual Bergey’s de 1923 y 1948 respectivamente reconocen a este microorganismo como *C. ovis* y *C. pseudotuberculosis*. La última denominación es la referida en la literatura actualmente (Baird & Fontaine, 2007).

Se diferencian dos biovar: *C. pseudotuberculosis* biovar ovis y *C. pseudotuberculosis* biovar equi. El método comercial API® Coryne lo identifica bien. Al igual que *C. ulcerans*, produce exotoxina diftérica, tiene actividad ureásica, reacción CAMP inversa (inhibida) y reducción de nitratos variable. Se diferencian por el comportamiento frente al factor vibriostático O/129, resistente en *C. pseudotuberculosis* y sensible en *C. ulcerans* y por la fermentación del glucógeno, negativa en *C. pseudotuberculosis* y positiva en *C. ulcerans*.

La clasificación taxonómica de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis, es la siguiente, (Ortiz Arana, 2016).

Dominio *Bacteria*
 Philum *Actinibacteria*
 Clase *Actinobacteria*
 Orden *Actinomycetales*
 Suborden *Corynebacterineae*

Familia	<i>Corynebacteriaceae</i>
Género	<i>Corynebacterium</i>
Especie	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
biovar	“ <i>Ovis</i> ”

Estudios filogenéticos indican que el género se halla íntimamente relacionado con otros Actinomycetes como los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, conformando el “grupo CNMR (Araújo *et al.*, 2018; Burkovski, 2018; Estevao Belchior *et al.*, 2006). Este grupo comparte las siguientes características:

*paredes celulares quimiotipo IV con ácido *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP), arabinosa y galactosa; AM de aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono de longitud (ácidos corynomicólicos);

* ácidos grasos celulares de cadena recta saturados y no saturados;

* menaquinonas dihidrohidrogenadas, con 8 o 9 unidades de isopropeno y un contenido G+C de aproximadamente 51 a 68 mol %.

C. pseudotuberculosis presenta 98,5 % de semejanza en sus secuencias ARNr 16S con *C. ulcerans* y *C. diphtheriae* (Fernández Natal, 2009)

La aplicación de técnicas de análisis de secuencias de ARNr 16S y estudios de hibridación, han demostrado que dentro del género *Corynebacterium*, las especies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis* conforman el grupo *C. diphtheriae*. Estas tres especies comparten, entre otras características, la posibilidad de poder hospedar al bacteriófago que induce la producción de la exotoxina diftérica. *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis* producen una fosfolipasa D con idénticas características (Estevao Belchior *et al.*, 2006; Leardini *et al.*, 2002).

1.2. Patogenia y factores de virulencia.

Las bacterias están sujetas a varios tipos de estrés ambiental, como cambios en la temperatura, disponibilidad de nutrientes, variación del pH y presencia de moléculas tóxicas. En consecuencia, los mecanismos utilizados por la bacteria para responder y protegerse de diferentes tipos de estrés son esenciales para su supervivencia y proliferación. En la mayoría de los casos, las respuestas bacterianas conducen a la activación de genes, cuyos productos actúan como una respuesta a un estrés físico-químico. Factores que regulan estos genes

responden a señales específicas, ambientales o celulares, estimulando o inhibiendo la transcripción, la traducción o cualquier otro evento de expresión genética para modificar adecuadamente la velocidad de síntesis de los productos genéticos, obteniendo una adaptación fisiológica y bioquímica. De esta manera, pueden adherirse, invadir, replicar y escapar del sistema inmunológico, causando la enfermedad del huésped (Pinto Gomide *et al.*, 2018).

Se ha comunicado que *C. pseudotuberculosis* produce varios factores de virulencia (Estevaso Belchior *et al.*, 2006), sin embargo la virulencia está relacionada con tres factores principales: la estructura de la pared celular (ácidos micólicos), su capacidad intracelular para la persistencia de macrófagos y la producción de fosfolipasa D (FLD) como exotoxina, que se considera el principal factor de virulencia de la especie. A pesar de que su principal factor de virulencia ya está bien establecido, las cepas toxigénicas de esta especie también pueden producir toxina diftérica (TD) (Araújo *et al.*, 2018).

Los ácidos micólicos (AM) y la FLD; ambos contribuyen a la inflamación, edema y diseminación durante el desarrollo de abscesos (Estevaso Belchior *et al.*, 2006).

C. pseudotuberculosis presenta una capa ácida micólica cerosa en su pared celular. Esta capa micólica presenta una serie de propiedades citotóxicas que desempeñan un papel muy importante en la virulencia de esta bacteria. La inoculación experimental por vía subcutánea de ácido micólico extraído a partir de *C. pseudotuberculosis* en ratones, produce inflamación localizada con congestión y un área central de necrosis hemorrágica. Además, el ácido micólico induce cambios degenerativos y muerte de leucocitos. Sin embargo y a diferencia del efecto letal de la inoculación de moléculas similares extraídas de las micobacterias, el efecto citotóxico del ácido micólico de *C. pseudotuberculosis* se limita al lugar de la inoculación. Algunos autores han sugerido que la capa del ácido micólico permite a *C. pseudotuberculosis* sobrevivir durante largos períodos en el entorno, una característica común a otros miembros de la Familia *Actinomycetaceae*, y de hecho, *C. pseudotuberculosis* es relativamente resistente a las condiciones ambientales adversas (Valdivia Zevallos, 2015).

Alvarez *et al.* (2017) describen que *C. pseudotuberculosis* es capaz de sobrevivir a lo largo del tiempo en suelos de la Patagonia extraandina con diferentes aportes de materia orgánica y humedad, independientemente de otras variables, como el pH y la salinidad.

Estos lípidos superficiales han sido descritos durante mucho tiempo, como factores importantes para la patogenia de la enfermedad. Las cepas virulentas tienen más lípidos que las cepas atenuadas y hay una directa relación entre el porcentaje de

lípidos superficiales y abscesos crónicos. Esta capa lipídica protege contra las enzimas proteolíticas presente en los fagolisosomas, permitiendo que el microorganismo se adhiera, promoviendo así la citotoxicidad local (Lopes Bastos *et al.*, 2012).

Los AM, son componentes de la pared celular del género *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella* y *Mycobacterium*, exclusivamente. Por lo tanto la presencia de estos compuestos en un cultivo aislado identifica a un microorganismo de estos géneros. Varios trabajos han reportado que la composición de AM es una característica taxonómica estable, de manera que el análisis de los mismos permitiría la identificación clínica de las cepas que son dificultosas de caracterizar. Actualmente todos los géneros que contienen AM pueden ser distinguidos por la longitud de sus cadenas carbonadas. Ellos son *Corynebacterium* (C20 a C38); *Dietzia* (C34 a C38); *Rhodococcus* (C34 a C52); *Nocardia* (C40 a C60); *Gordonia* (C48 a C66); *Williamsia* (C50 a C56); *Skermania* (C50 a C64); *Tsukamurella* (C64 a C78); *Mycobacterium* (C60 a C90) (de la Torre, 2011).

Como otro factor de patogenicidad se ha consignado un lípido de pared celular análogo al factor cordón de *Mycobacterium tuberculosis*, que causa degeneración de fagocitos y necrosis hemorrágicas cuando es inyectado intradérmicamente en animales de laboratorio. Es responsable de la acción citotóxica de las células fagocíticas y la resistencia a la actividad bactericida de estas células. Por este motivo se le da el status de intracelular facultativa (Gutheim, 2011).

La FLD no se ha detectado en células mamíferas. Sin embargo, aunque esta enzima es desconocida en otras partes del reino animal, su presencia en la naturaleza no se limita a los arácnidos, ya que también es un componente importante de las toxinas de algunas bacterias, incluidas *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, *Arcanobacterium haemolyticum* y *Vibrio damsela*.

La FLD es una glicoproteína con una composición de aminoácidos similar a la del colágeno (peso molecular de 31 kDa). Esta exotoxina (esfingomielinasa) cataliza la escisión de la esfingomielina, un fosfolípido que está presente en la membrana plasmática de las células, donde cumple funciones estructurales y funcionales. Los dos productos principales de la actividad de FLD son ceramida 1-fosfato (C1P) y colina. Mientras que este último es un metabolito biológicamente inerte, C1P es biológicamente activo (Gutheim, 2011; Rivera *et al.*, 2015).

Es el único esfingolípido que contiene fósforo y puede considerarse un fosfolípido, pero se clasifica como esfingolípido por sus componentes estructurales. Los esfingolípidos se dividen en dos clases de grupos, los fosfoesfingolípidos (esfingomielinas) y los glucoesfingolípidos (gangliósidos, cerebrósidos). La importancia biológica de las moléculas de los esfingolípidos presentan propiedades anfipáticas, es decir, tanto hidrófobas como hidrófilas, lo que les permite desempeñar un papel importante en la formación de membranas biológicas. Además se desempeñan en la señalización celular. Así, por ejemplo, la ceramida es ampliamente conocida por inducir apoptosis en las células. Si la ceramida es degradada por ceramidasa, se obtiene esfingosina, que si a su vez es fosforilada da lugar a esfingosina-1-fosfato, que tiene un efecto totalmente antagónico a la ceramida al inducir la proliferación y la mitosis celular. Por eso, el equilibrio entre ceramida y esfingosina-1-fosfato es importante para el control de la muerte y la supervivencia de la célula (Devlin, 2004).

La FLD actúa sobre la esfingomielina y la lisofosfatidilcolina; afecta la permeabilidad vascular lo que facilitaría la diseminación de la bacteria de los vasos sanguíneos a la vía linfática, activa la vía complementaria del sistema inmune, agotando el complemento de la zona que rodea las bacterias protegiéndolas de la opsonización. A su vez inhibe la quimiotaxis de neutrófilos y provoca la degranulación de células fagocíticas ocasionando necrosis y trombosis en vasos linfáticos favoreciendo la supervivencia del microorganismo (Corache García Pulido, 2017).

Cabe destacar que todos los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* producen la FLD y que ésta no posee diferencias antigénicas. En animales de laboratorio, la FLD causa necrosis después de la inyección intradérmica y aumento de la permeabilidad capilar a través de lesiones del endotelio vascular. Este aumento, favorece la propagación de bacterias a partir del sitio de infección primaria y consecuente formación de edemas; facilitando la colonización y diseminación regional y sistémica en el huésped (Gutheim, 2011).

Además, la FLD es considerada una exotoxina citotóxica para los glóbulos blancos, ya que promueve la destrucción de macrófagos de cabra durante la infección experimental (Lopes Basto *et al.*, 2012)

La FLD inhibe la quimiotaxis de neutrófilos y la degranulación de células fagocíticas, y activa complemento por la vía alternativa, ocasionando necrosis y trombosis de linfáticos y favoreciendo la supervivencia y multiplicación del microorganismo (Estevao Belchior *et al.*, 2006). La toxina es inactivada por calentamiento a temperaturas mayores de 60°C, por

conservación por largos períodos a temperatura ambiente, a pH ácido o por formalina (Gutheim, 2011).

Los anticuerpos frente a la toxina comienzan a detectarse a partir de la cuarta semana postinfección alcanzando un pico máximo en la decimoséptima semana y perdurando por lo menos veintisiete semanas (Estevao Belchior *et al.*, 2006).

En la actualidad, han sido descritos otros factores que podrían contribuir a la patogenicidad de este microorganismo como: factores de adherencia, formación de biopelículas y producción de enzimas extracelulares (Ceri *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 1982; Cloete, 2003; Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2002).

Factores de adherencia.

La adherencia es el primer paso en el proceso de colonización bacteriana y se define como la unión estable e irreversible de una bacteria a una superficie. Para las bacterias patógenas, la adherencia es el primer paso en la patogénesis de una enfermedad (Rocha Gracia *et al.*, 2004).

Es un proceso complejo que resulta de interacciones moleculares altamente específicas entre la bacteria y la célula blanco y que desencadena una serie de eventos bioquímicos-moleculares en cascada dentro de ambas células. La finalidad de la adherencia bacteriana es conducir a la bacteria a sobrevivir y reproducirse dentro de su hospedero, pero la superficie sobre la cual se adhiere debe proporcionar las condiciones adecuadas para ello. Las moléculas sobre la superficie bacteriana responsables del proceso de adherencia se conocen con el nombre de adhesinas. Por su estructura se clasifican en fimbriales y afimbriales. Las moléculas sobre la superficie de la célula blanco o superficie inanimada (material protético) que son reconocidas por las adhesinas se conocen como receptores. La naturaleza de los receptores reportados sobre células del hospedero incluye proteínas, polisacáridos, glicoproteínas, glucolípidos, componentes de la matriz extracelular. La presencia de receptores específicos para ciertas adhesinas depende de la especie de hospedero, lo que condiciona que una bacteria ocasione infección y/o enfermedad en un hospedero específico pero no en otro, característica conocida como especificidad de especie. Dentro de las posibles funciones de las adhesinas bacterianas se encuentran el promover la adherencia e iniciar la colonización de la superficie celular, la organización y ensamblaje de comunidades microbianas y en el caso de bacterias patógenas, participar como mediadores en la liberación eficiente de otros factores de virulencia, por ejemplo las toxinas (Rocha Gracia *et al.*, 2004).

La adherencia de bacterias a células epiteliales en algunos casos es de fundamental importancia para la producción de la enfermedad, sin necesidad de que posteriormente se produzca penetración de las mismas en el epitelio. Ejemplos típicos de estos microorganismos son *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enteropatógena (Basualdo *et al.*, 2006).

Hasta la fecha, no hay información detallada sobre los mecanismos de adherencia e invasión de *C. pseudotuberculosis* a las células huésped (Ott, 2018).

Los aislamientos de *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* exhiben una amplia diversidad genética con respecto a la presencia y/o expresión de varios grupos de genes pili. La razón de esto todavía no está clara. El hecho de que diferentes tipos de pili se unan a diferentes tipos de células de una manera específica indica que esto puede estar conectado a diferentes receptores en la superficie del huésped o diferentes reservorios de animales. Sin embargo los pili parecen ser factores de adhesión específicos, pero no están codificados solo por bacterias patógenas. Los pilis también se encuentran en especies de *Corynebacterium* no patógenas como *C. casei*, *C. efficiens*, *C. glutamicum* y otras, y en consecuencia no parecen ser factores de virulencia en sentido estricto (Ott, 2018).

Aun cuando se ha establecido el papel de algunos factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* en el desarrollo de la linfadenitis caseosa, poco se conoce acerca de las interacciones de la bacteria con los componentes de la matriz extra e intercelular. Por otra parte, tampoco se ha analizado la interacción de *C. pseudotuberculosis* con células estables en cultivo considerando para esto, la especificidad del hospedador y la vía natural del inicio de la infección (Valdivia Zeballos, 2015).

La adherencia es un proceso multifactorial y las proteínas involucradas en este proceso pueden ser designadas como determinantes de virulencia. Estas proteínas podrían tener una función en la patogenicidad pero trabajan en combinación con otras proteínas o toxinas que están bajo ciertas condiciones del medio ambiente (Ott, 2018).

Formación biopelículas: introducción e importancia de su estudio.

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo. También se definen como una comunidad estructurada de microorganismos inmovilizados, adheridos a una superficie inerte o viva, encapsulados en una matriz polimérica orgánica de origen bacteriano, que representa una forma de crecimiento protegida en un medio hostil (Díaz Caballero *et al.*, 2011).

El crecimiento en biopelículas representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Aunque la composición de biopelículas es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario de las biopelículas es el agua, que puede representar hasta un 97 % del contenido total. Además del agua y de las células bacterianas, la matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Lasa *et al.*, 2005).

Las comunidades microbianas mantienen una forma de comunicación a través de la detección del quórum, emplean diferentes señales químicas para supervisar su entorno, alterar la expresión genética y obtener ventaja sobre sus competidores (Díaz Caballero *et al.*, 2011).

Esta capacidad denominada detección de quórum o “quórum sensing” (QS), la desarrollan a través de la secreción y detección de las moléculas autoinducidas que se acumulan en un espacio dependiente de la densidad poblacional y del espacio de convivencia. Cuando las concentraciones de la molécula autoinducida o molécula señal, llegan a una determinada concentración, se activa un mecanismo de detección de quórum al cual responden las células, lo que permite a las bacterias, modular sus comportamientos, incrementar la eficacia y adecuación para el medio ambiente logrando una serie de beneficios que dependen de la presencia o ausencia de otras células o de ellas mismas. Las características de esa comunidad en condiciones de QS, desarrollan el control de detección de comunidad en la superficie, lo que incluye la posibilidad de lograr la fijación a los sustratos, la producción de polímeros extracelulares, la síntesis de biosurfactante, la esporulación, la competencia, la bioluminiscencia, la secreción de nutrientes, la síntesis de compuestos y la producción de factores de virulencia (Díaz Caballero *et al.*, 2011).

Una de las principales propiedades del desarrollo de biopelículas es promover la resistencia a los antibióticos en comparación con las células planctónicas (Soto, 2013). Además, las biopelículas protegen a los microbios contra el estrés ambiental y aumentan la resistencia a tratamientos antimicrobianos y desinfectantes. La sensibilidad reducida de las biopelículas a los antibióticos es un problema crítico en los tratamientos de infecciones crónicas (Aquino de Sá *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018, Fontecha Umaña, 2014; Römling & Balsalobre, 2012)

De acuerdo con la estimación dada por el centro para el control de enfermedades (Atlanta, GA, EEUU), aproximadamente el 65 % de las infecciones bacterianas están

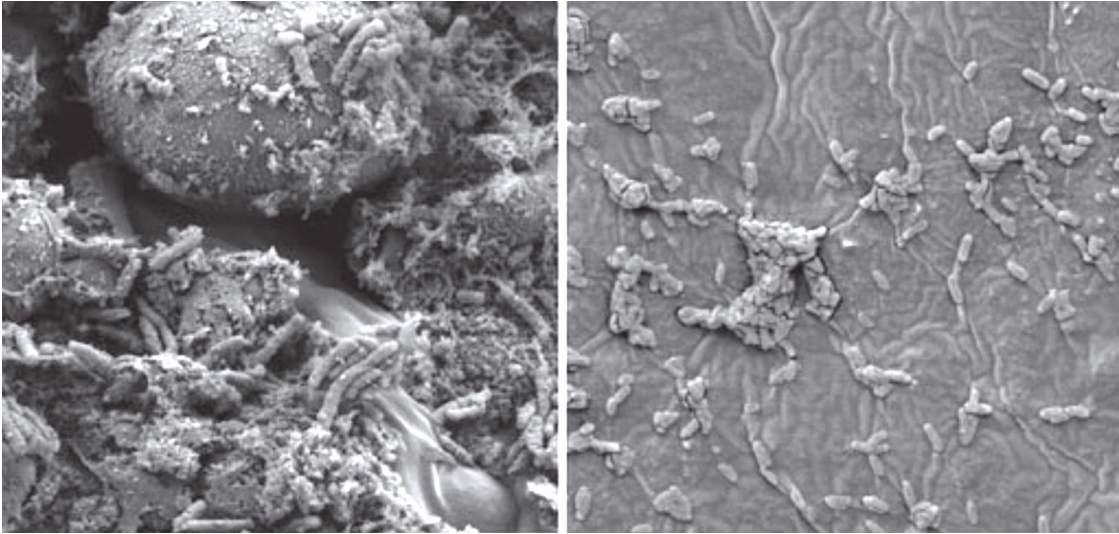
relacionadas con biopelículas (Bayona-Rojas & Gutierrez-Escobar, 2013; Chen *et al.*, 2018; Ramadan *et al.*, 2005, Ramadan, 2006; Sanclement *et al.*, 2005; Sanderson *et al.*, 2006).

Las biopelículas fueron descritas en *C. pseudotuberculosis*, *C. renale* y *C. diphtheriae* (Aquino de Sá *et al.*, 2013).

Las biopelículas que se encuentran en la naturaleza consisten en comunidades de microorganismos primarios viables y no viables protegidos por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) polianiónicas fijadas a la superficie. Las SPE pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas hidratadas con un porcentaje de agua entre 85 y 95 %. Las SPE protegen a los microorganismos que hacen parte de la biopelícula contra agentes antimicrobianos, previenen al acceso de biocidas, secuestrantes metálicos, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes. Dependiendo del tipo de células involucradas en la biopelícula, las microcolonias pueden estar compuestas por 10 - 25 % de células y 75 - 90 % de matriz SPE. Los requisitos para el crecimiento de la biopelícula son la presencia de microorganismos y el sustrato; si alguno de estos no se encuentra disponible, la biopelícula no se formará. La sinergia existente dentro de la comunidad de la biopelícula, es el factor que permite que ésta soporte condiciones adversas y pueda sobrevivir (Navia *et al.*, 2010, Sanchez-Vizuet *et al.*, 2015).

Las bacterias formadoras de biopelículas también se asocian con enfermedades inflamatorias crónicas tales como enfermedad de Crohn. Además, evidencias recientes experimentales indican un papel de la formación de biopelículas en infecciones agudas.

Como la adherencia de los microorganismos al tejido forma parte del proceso de infección aguda, el impacto de la formación de biopelícula en la infección podría ser subestimado. También hay una alta incidencia de formación de biopelículas en dispositivos artificiales como catéteres, endoprótesis, implantes ortopédicos, lentes de contacto e implantes de dispositivos electrónicos. En la figura 1, se muestran ejemplos de formación de biopelículas *in vitro* e *in vivo* (Römling & Balsalobre, 2012).

Figura 1: Formación de biopelículas en un catéter urinario.

Referencias: A la izquierda, biopelícula de catéter de un paciente con infección del tracto urinario causada por *E. coli*; a la derecha, biopelícula de catéter *in vitro* por el mismo aislado de *E. coli*.

Fuente: Römling & Balsalobre, 2012.

Cada vez es más obvio que el comportamiento social dentro de una comunidad mixta confiere tolerancia bacteriana a tensiones ambientales, incluida la acción de los desinfectantes que hasta ahora se ha subestimado en gran medida. La mayoría de las bacterias formadoras de biopelículas sobreviven en ambientes hostiles. La tolerancia de las células que viven en biopelículas a los desinfectantes se atribuye a múltiples factores. La presencia de polímeros extracelulares que dificultan su difusión y reacción. También aumenta la evidencia de que las interacciones interespecies dentro de la matriz aumenta aún más la tolerancia contra los desinfectantes, en biopelículas de una sola cepa. Hoy en día, la utilización no específica y desproporcionada de los biocidas está causando grandes problemas de contaminación ambiental. Ahora que empieza la sociedad a ser conscientes, un número creciente de estudios han reportado eventos de resistencia cruzada entre diferentes tipos de antimicrobianos, tales como desinfectantes y antibióticos (Sanchez-Vizueté *et al.*, 2015).

Desarrollo de biopelículas: etapas

Las 5 fases en el desarrollo de una biopelícula y los procesos involucrados en ellas se describen en detalle a continuación:

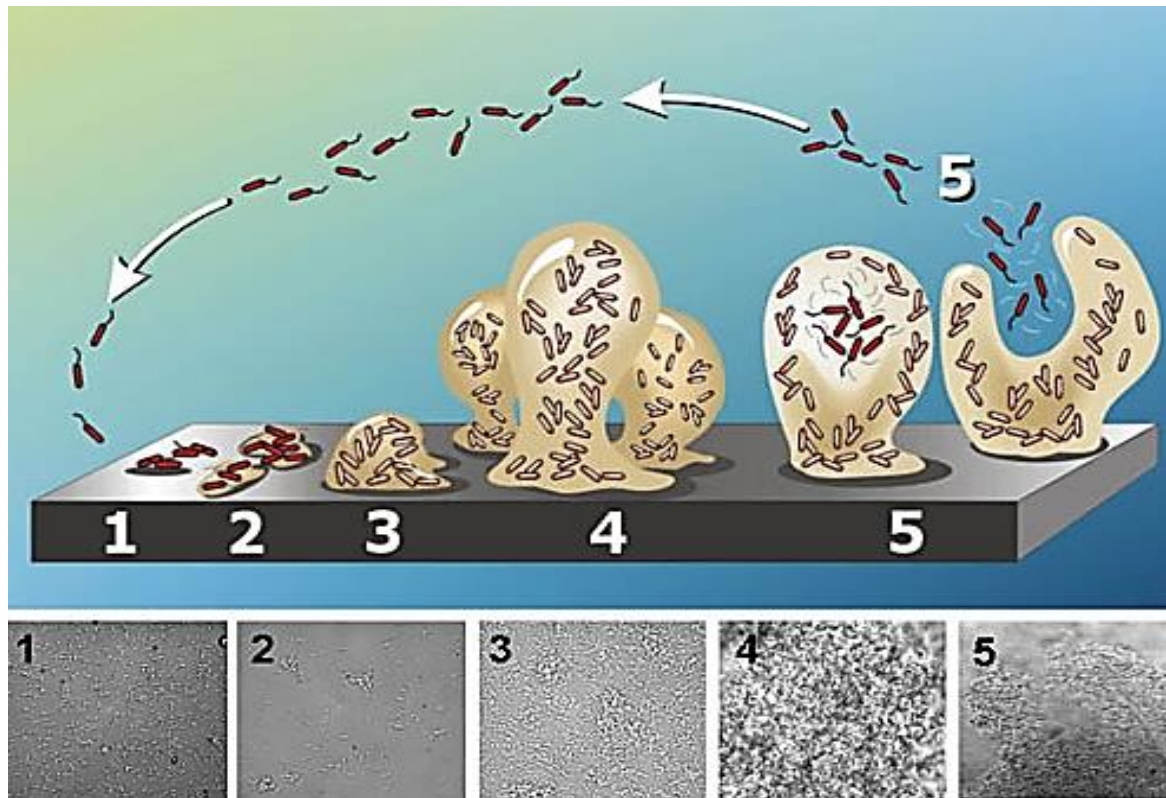
Tras el acondicionamiento de la superficie ocurre la deposición y adhesión reversible de las células bacterianas. Este proceso ocurre pasivamente por movimiento browniano y simple sedimentación o por movimiento activo de bacterias flageladas lo que permite el establecimiento de interacciones físicas y electrostáticas entre la superficie bacteriana y el

sustrato. La etapa siguiente consiste en la adhesión irreversible de las bacterias por producción de SPE y debido a la estimulación de proteínas receptoras de la pared bacteriana se lleva a cabo el desarrollo de puentes célula-a-célula que las unen unas a las otras, lo que estabiliza la estructura formada en un proceso denominado maduración.

El siguiente período es conocido como colonización de la superficie, en él las bacterias adheridas crecen formando microcolonias que son consideradas las unidades fundamentales de una biopelícula. La maduración de la biopelícula corresponde al crecimiento tridimensional y definición de una arquitectura por las interacciones entre las bacterias adheridas. Ese proceso conlleva la creación de ambientes heterogéneos desde el punto de vista fisicoquímico en el cual las bacterias asociadas a la biopelícula presentan características fisiológicas distintas de las planctónicas. Varios estudios recientes indican que la formación de biopelícula es regulada por la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional y controlada por señalización célula-a-célula en un mecanismo denominado “quorum sensing”. En un creciente número de cepas bacterianas se evidencia ese tipo de comunicación en el cual las bacterias pueden sentir cambios en el medio y coordinar la expresión genética a favor de la supervivencia de toda la comunidad.

El “quorum sensing” regula varias funciones tan diversas como la movilidad, expresión de factores de virulencia, esporulación, producción de antibióticos, intercambio de material genético además del desarrollo de la biopelícula. Una vez que la biopelícula ha madurado, tiene lugar la dispersión de células a otras regiones. Inicialmente se pensó que ese proceso era pasivo y dependiente de las fuerzas de arrastre del medio, pero estudios recientes sugieren que la dispersión es un proceso activo y estrictamente regulado por las células adheridas (Faleiro Naves, 2010).

En la figura 2 están representados los principales eventos en el desarrollo de las biopelículas

Figura 2: Etapas de formación de una biopelícula.

(1) Adhesión reversible (2) Adhesión irreversible y producción de SPE (3) Formación de microcolonias (4) Desarrollo de estructuras tridimensionales y maduración de la biopelícula (5) Dispersión de células.

Fuente: Faleiro Naves, 2010.

Mientras que la matriz de biopelículas en su mayoría contiene polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN, la composición puede diferir notablemente dependiendo de las condiciones del ambiente, las especies, e incluso entre diferentes cepas de la misma especie. Aunque los biocidas pueden ganar directamente acceso a sus objetivos microbianos en cultivos planctónicos, pueden encontrar limitaciones de difusión-reacción a través de la matriz de polímeros para que apenas alcancen las capas más profundas de la biopelículas en su forma activa (Sanchez-Vizuete *et al.*, 2015).

Producción de enzimas extracelulares

Para sobrevivir y multiplicarse dentro de un huésped, las bacterias producen una variedad de sustancias que permiten evadir los mecanismos de defensa del huésped. Estas sustancias, denominada agresinas, incluyen cápsulas y sustancias extracelulares, proteínas y carbohidratos de superficie, enzimas, toxinas y otras moléculas pequeñas.

La virulencia de algunas bacterias esta incrementada por la producción de enzimas extracelulares (exoenzimas) y otras sustancias relacionadas. Estos productos tienen, propiedades como la capacidad de lisar células, disolver materiales intercelulares y provocar la formación o disolución de coágulos sanguíneos (Koneman *et al.*, 2007).

1.3. La enfermedad

C. pseudotuberculosis presenta una gran capacidad de adaptación a distintos huéspedes. Es así que puede infectar animales y humanos.

Entre los animales se reconocen una amplia diversidad de especies: pequeños rumiantes (ovejas y cabras), caballos, vacas, camélidos (llamas, camellos, dromedarios), búfalos, cerdos.

1.3.1. Ovejas

La linfadenitis caseosa (LC) también conocida como pseudotuberculosis ovina, apostema de los ovinos, síndrome de la oveja flaca y enfermedad de Preisz-Nocard, se trata de una enfermedad infecto-contagiosa de evolución crónica, caracterizada por enflaquecimiento y emaciación progresiva, inapetencia y muerte ocasional por intoxicación y desgaste del animal. Genera pérdidas en la ganadería de pequeños rumiantes por la depreciación de la lana en ovejas (*Ovis aries*), disminución de la producción de leche, reducción del aumento de peso, trastornos reproductivos, nacimientos prematuros, decomisos de canales y, rara vez, por muerte del animal. (Delgado Duno *et al.*, 2015; Steerforth and Marutsov, 2017).

Estos hechos impactan en las exportaciones, pues disminuyen las posibilidades de comercialización y el valor de las reses ovinas (Solanet *et al.*, 2011).

El hallazgo de abscesos en linfonódulos linfáticos y órganos en ovejas de la región patagónica de Argentina es común durante la faena (Estevao Belchior *et al.*, 2007).

La LC en ovejas adultas se presenta en forma cutánea y/o visceral. La primera se caracteriza por la formación de abscesos en el sistema linfático subcutáneo, donde generalmente se observa una afección de los linfonódulos linfáticos superficiales de la región preescapular y precrural. Los mismos se pueden palpar a través de la piel y pueden fistulizarse o cortarse, drenando contenido purulento.

En la forma visceral los abscesos se manifiestan en órganos como pulmones, hígado y riñón, causando deterioro en la condición orgánica del animal, pudiendo evolucionar hacia estados caquéticos de curso crónico (Euzéby, 1999; León-Viscaíno *et al.*, 2002; Ponce de León Filho & Gomes Pereira, 1983; Yeruham *et al.*, 2000).

La incidencia aumenta paulatinamente con la edad y es la forma clínica más prevalente en adultos, ya que alcanza hasta el 40 % de los animales del rebaño infectado (Delgado Duno *et al.*, 2015).

1.3.2. Cabras

La LC también es frecuente en cabras para la producción de carne correspondiente a establecimientos de la zona Centro-Este de la Provincia de Santa Fe, Argentina, con sistemas de producción de tipo intensivo y semi-intensivo. Se ha observado su presentación en aquellas majadas con introducción de la raza Boer y sus cruzas, sea procedente de otras majadas comerciales o de reconocidas cabañas. Su presentación es mayor en animales adultos, de 5 años o más, sin embargo cuando la prevalencia es alta pueden manifestarse las lesiones (abscesos) en animales jóvenes de aproximadamente 2 años de edad. Muchas veces son los animales jóvenes sin abscesos, que se encuentran incubando la enfermedad, importantes transportadores de la enfermedad hacia otras majadas como así también los animales adultos con lesiones viejas, no visibles, o incipientes. Los abscesos suelen presentarse en los linfonódulos de la región cefálica principalmente y también en pre-escapulares y mamarios (pudiendo estar afectado cualquier ganglio corporal e incluso darse la forma diseminada). El absceso “inmaduro” es duro al tacto y doloroso, a la punción se obtiene un líquido acuoso, amarillento; el absceso “maduro” presenta el centro blando, generalmente a punto de fistulizar, del cual se obtiene un pus de consistencia pastoso blanco. (Juárez *et al.*, 2014).

Una de las diferencias que se observa en la enfermedad entre ovejas y cabras es la variación en la distribución de las lesiones. En cabras los linfonódulos mandibulares o parotídeos están frecuentemente afectados seguidos por el preescapular y generalmente los linfonódulos superficiales de la zona perianal no son infectados. Otros trabajos concluyen que los abscesos se presentan en linfonódulos cervicales superficiales y subilíacos. En oveja, las lesiones en cabeza y cuello son relativamente raras, siendo los linfonódulos preescapulares y precurales los más afectados seguidos de otros de la superficie corporal. Esta diferencia podría ser un reflejo de las diferentes vías de transmisión del microorganismo. Durante la esquila se producen cortes que son una puerta de entrada para el microorganismo y por ello se encuentran

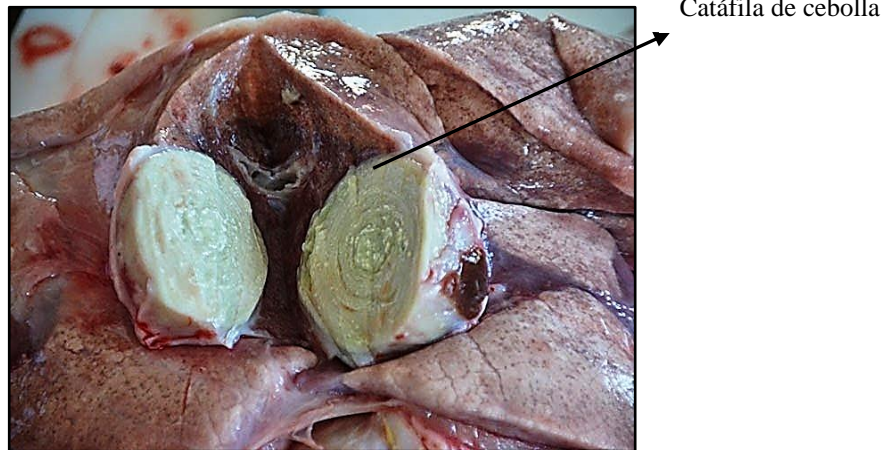
afectados los nódulos superficiales, no siendo así en cabras, en donde es más factible la transmisión directa por contacto entre heridas en la piel o por ingestión del microorganismo a través de la mucosa bucal. Las formas viscerales son menos comunes en cabras que en ovejas, debido a que en los ovinos se afectan en gran medida múltiples nódulos internos (Esteveao Belchior *et al.*, 2006).

En ovejas, la apariencia morfológica de los nódulos abscedados, se puede presentar con la característica de catáfila de cebolla, siendo esta una distribución en láminas concéntricas fibrosas separadas por material caseoso (figura 3). En cabras los nódulos no presentan esta configuración; el exudado es usualmente una pasta uniforme bien seca. Esta característica podría deberse a la naturaleza de las enzimas fagocíticas, siendo en las cabras más licuefactivas (Aleman & Spier, 2001; Brown & Olander, 1987).

Como se mencionó anteriormente, la LC afecta a pequeños rumiantes y tiene dos formas de presentación, una cutánea o externa y otra visceral. En la externa se ven afectados los ganglios linfáticos superficiales y el tejido subcutáneo; actualmente a los ganglios linfáticos se les da el nombre de linfonodos o linfonódulos para evitar la confusión con los ganglios nerviosos. Entre ellos están: linfonódulo cervical superficial (pre-escapular), linfonódulo subilíaco (pre-crural) y linfonódulo inguinal superficial. En estos linfonódulos se forman abscesos caseosos.

En la forma visceral se producen los abscesos principalmente en los pulmones y linfonódulos linfáticos profundos, como los mediastínicos y los inguinales profundos, aunque también puede afectar otros órganos y tejidos, como los riñones, hígado, glándula mamaria y órganos de reproducción. Los linfonódulos mediastínicos, se ubican en el mediastino dentro de la cavidad torácica. Como el mediastino, teniendo en cuenta que el corazón se divide topográficamente en craneal, medio y caudal; de la misma manera se denomina a los linfonódulos mediastínicos. Los caudales suelen ser de mayor tamaño. En cuanto a los linfonódulos inguinales mencionados, hay dos grupos: los inguinales superficiales que se ubican en el dorsal del escroto en el macho y en el dorsal de la glándula mamaria en la hembra y los profundos que están en un intersticio muscular en la región medial del muslo (A. Castro, comunicación personal, 19 de agosto, 2019).

Figura 3: Absceso en oveja con apariencia característica de LC ovina (catáfila de cebolla).



Fuente: comunicación personal, Paolicchi, F. 2018

1.3.3. Caballos

En equinos, se distinguen tres formas típicas: linfangitis ulcerativa (1 %), abscesos superficiales en áreas pectorales y ventrales (91 %) y abscesos internos (8 %). Estos casos fueron observados en caballos en regiones áridas del oeste de Estados Unidos y en Brasil.

Las formas atípicas se asocian a abortos y mastitis. La linfangitis ulcerativa consiste en vasculitis linfáticas en la parte distal de las extremidades y se asemeja a una celulitis severa. En ocasiones los nódulos linfáticos regionales (cervical superficial y axilar) desarrollan linfadenitis purulenta (Estevao Belchior *et al.*, 2006).

1.3.4. Vacas

En ganado vacuno, la infección se presenta con una incidencia esporádica, manifestándose con abscesos cutáneos y linfangitis ulcerativa, mastitis y bronconeumonía necrótico-purulenta. El examen histológico de las biopsias muestra una reacción granulomatosa crónica. La enfermedad en esta especie fue notificada en ganado perteneciente a la raza Israeli-Holstein, con mayor incidencia de la enfermedad en los meses de primavera y verano en diferentes regiones de Israel. En estados Unidos y España la LC, ha sido diagnosticada en ciervo, carnero salvaje, muflón y gamo presentando las mismas localizaciones que en ovinos (Estevao Belchior *et al.*, 2006).

En equinos y vacunos se manifiesta como linfangitis ulcerativa y en vacas lecheras puede causar mastitis (Aleman *et al.*, 1996; Brown & Olander, 1987; Coyle & Lipsky, 1990, León Vizcaíno *et al.*, 2002; Mohan *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2007; Steerforth & Marutsov, 2017; Yeruham *et al.*, 1996; Yeruham *et al.*, 2000).

1.3.5. Camélidos

Auad *et al.* (2017), reportaron el primer aislamiento en Argentina de *C. pseudotuberculosis* biotipo ovis en llama (*Lama glama*). La transmisión de LC ocurre a través de ingestión, inhalación o heridas. El patógeno es fagocitado por leucocitos y transportado por linfa o sangre hacia los linfonódulos, formando abscesos externos e internos. En ovinos y caprinos el período de incubación es de 25 a 40 días. En los camélidos éste es mucho más largo y los abscesos pueden formarse incluso después de más de 6 meses. La infección induce al desarrollo de abscesos superficiales localizados principalmente en los linfonódulos cefálicos, cervicales superficiales (pre-escapulares) y prefemorales. Patognomómicamente en camélidos los abscesos son fríos, cerrados, indoloros, alcanzando el tamaño de un limón o naranja, pudiendo fistulizar, exudando contenido purulento. Distintos órganos y tejidos pueden verse afectados por la formación de abscesos internos (pulmón, hígado, glándula mamaria y riñón), siendo en camélidos mayor la prevalencia de casos de abscedación de linfonódulos renales y mastitis, lo que contribuye a la diseminación del patógeno a través de la leche a sus crías.

1.3.6. Búfalos

Silva *et al.* (2012), reportaron el genoma de *C. pseudotuberculosis* Cp31, aislado de un búfalo en Egipto. Esta bacteria causa en búfalos la enfermedad edematosa de la piel (OSD), que es endémica en Egipto.

1.3.7. Cerdos

La LC también se ha descrito en cerdos. Oliveira *et al.* (2014), caracterizaron fenotípica y genéticamente aislamientos clínicos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis, de lesiones de linfadenitis caseosa en el cerdo Alentejano Negro (*Sus scrofa domesticus*), región de Alentejo, sur de Portugal.

1.3.8. Casos humanos (potencial zoonótico)

La LC ha sido clasificada como una zoonosis ocupacional por muchos autores y la prevalencia real probablemente este subestimada dado que no se diagnostica y no es una enfermedad comunicable. Se puede presentar de manera inaparente o con características subclínicas. El grupo de mayor riesgo está constituido por trabajadores rurales principalmente de sexo masculino (Estevao Belchior *et al.*, 2009).

Se han comunicado casos de infecciones en humanos que mantienen contacto con animales enfermos (Coyle & Lipsky, 1990; Peel *et al.*, 1997). En general, las infecciones en humanos son raras y usualmente se presentan como LC adquirida por exposición ocupacional. La mayoría de los casos que se han comunicado, en trabajos de divulgación científica, se refieren a habitantes de países con gran actividad en ganadería ovina como Australia y Nueva Zelanda; y pocos casos se manifestaron en otros países como Estados Unidos, Francia, Panamá, España, Bélgica y China (Estevao Belchior *et al.*, 2009; Join-Lambert *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Peel *et al.*, 1997).

Los casos de linfadenitis humana ocurrieron en forma esporádica, en zonas rurales. La transmisión fue mayormente a través de lesiones cutáneas o piel intacta, ya sea por contacto directo con: ovejas, cabras, carcasas y/o carne contaminadas (adenopatías axilar y cervical) o por contacto con ambientes contaminados (adenopatía inguinal). Las manifestaciones clínicas consistieron en adenopatías de localización axilar, inguinal o cervical. En ningún cuadro hubo compromiso de vísceras o manifestaciones que indicaran un proceso infeccioso en los sitios de ingreso. En todos los casos los pacientes eran saludables al momento de manifestarse la enfermedad, no se reportaron pacientes inmunodeprimidos, ni tampoco con tratamientos inmunosupresores o enfermedades de base. En muchos de los reportes la enfermedad tuvo un curso crónico con recidivas en el 17 % de los casos y en alguno de ellos con consecuencias importantes (Estevao Belchior *et al.*, 2009)

La prevalencia de la enfermedad en el humano causado por *C. pseudotuberculosis* es probablemente subestimada, ya que sólo 33 casos han sido reportados durante un período de 42 años desde 1966 a 2008 (Lopes Bastos *et al.*, 2012). Durante los últimos años, fueron más frecuentes los casos clínicos comunicados en humanos relacionados a infecciones por corinebacterias, siendo consideradas como patógenos oportunistas. Esto podría deberse posiblemente a:

- el aumento de personas inmunocomprometidas,
- a que durante años anteriores se subestimó el potencial patógeno de este género y

-por el interés que ha surgido en la taxonomía de este grupo bacteriano (Lopes Bastos *et al.*, 2012; Ortiz Arana, 2016).

En Argentina aún no se han notificado casos en humanos, pero actualmente esta infección ha sido reconocida como una enfermedad zoonótica emergente (Auad *et al.*, 2017; Auad *et al.*, 2018; Palmero *et al.*, 2013).

C. pseudotuberculosis puede producir toxina diftérica como una consecuencia de la lisogenización con un fago diftérico. Esto ha sido claramente demostrado *in vitro* y ha conducido a autoridades de muchos países para instar a sus servicios de salud a ser conscientes de las enfermedades causadas por todas las especies productoras de toxina diftérica de *Corynebacterium*, incluyendo *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, en el diagnóstico diferencial de difteria. Durante muchos años, la identificación de cualquier *C. pseudotuberculosis* toxigénico requirió notificación a las agencias de control de enfermedades transmisibles. Recientemente, se reportó un caso de *C. pseudotuberculosis* toxigénico. Este es el único informe en la literatura sobre el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* toxigénico de un ser humano, y este aislamiento ocurrió en el Reino Unido. El organismo se aisló de un usuario de drogas intravenosas con endocarditis; este paciente no tenía antecedentes de contacto con animales, y no se identificó una posible fuente de infección. Además de la producción de toxina diftérica por *C. pseudotuberculosis* lisogénica, las cepas comunes pueden infectar a los humanos y causar linfadenopatía supurativa; estos eventos se asocian tradicionalmente al contacto con animales de granja y productos lácteos contaminados. Patológicamente, el tejido de los ganglios linfáticos infectados se reemplaza por granulomas necrotizantes, mientras que el aspecto histológico general se asemeja a una linfadenitis tuberculosa y linfogranuloma venéreo, que deben considerarse en el diagnóstico diferencial (Lopes Bastos *et al.*, 2012).

El primer caso humano fue descrito en 1966; un hombre de 37 años de Panamá que trabajaba como cortador de césped desarrolló una linfadenopatía inguinal. Inicialmente, se pensó que la presentación clínica era un linfogranuloma venéreo y el paciente fue tratado con tetraciclina durante un período de 3 semanas. Desde entonces, se han reportado 32 nuevos casos clínicos, y los 19 casos humanos reportados en Australia son más altos que en todos los demás países, con informes que varían entre 1 y 3 casos por país (Estevao Belchior *et al.*, 2009; Lopes Bastos *et al.*, 2012).

En la mayoría de los casos, la linfadenopatía tiene un curso prolongado y la formación de abscesos recurrentes es frecuente. El tratamiento con antibióticos es prolongado,

normalmente dura más de dos semanas y típicamente comprende la administración de antibióticos intracelularmente activos, como la tetraciclina y los macrólidos. Aunque la terapia con antibióticos solo ha tenido éxito en algunos casos, *C. pseudotuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo, y es muy difícil que los antibióticos alcancen las bacterias dentro de los macrófagos del granuloma. Por lo tanto, a menudo se requerían intervenciones quirúrgicas que incluían drenaje o escisión para eliminar el contenido purulento de la cápsula de colágeno espesa. La combinación de terapia antimicrobiana con escisión y drenaje es el curso de tratamiento más exitoso (Lopes Bastos *et al.*, 2012).

Cabe señalar que dos casos específicos de infección humana debidos a *C. pseudotuberculosis* han involucrado presentaciones clínicas distintas de la linfadenopatía característica. En el primer caso, un estudiante veterinario de 28 años, que trabajaba con equinos se infectó con *C. pseudotuberculosis* y se le presentó una neumonía eosinofílica.

El microorganismo, fue aislado del aspirado transtraqueal y de lavado bronqueoalveolar. El paciente mostró síntomas como fiebre y tos. Las pruebas analíticas de laboratorio evidenciaron eosinofilia en sangre periférica y el cuadro fue acompañado de infiltrado eosinofílico pulmonar. Se diagnosticó neumonía eosinofílica y se administró tratamiento con eritromicina con resultados exitosos (Estevao Belchior *et al.*, 2009; Lopes Bastos *et al.*, 2012).

La otra ocurrencia inusual se manifestó en un residente urbano desempleado masculino de 30 años, que habría consumido leche de vaca y cabra no pasteurizada. Las lesiones en el paciente se presentaron en el ganglio cervical izquierdo, los síntomas fueron constitucionales con dolor muscular y articular. La observación histopatológica mostró reacción inflamatoria crónica, granulomas con supuración central y necrosis. Para el tratamiento se administró penicilina y se realizó la escisión del ganglio afectado. Como el primer tratamiento no fue eficaz, posteriormente se practicó drenaje quirúrgico acompañado de la administración de penicilina. El paciente presentó una recaída con compromiso de cuello del lado izquierdo, para resolverla se realizó drenaje quirúrgico, escisión y tratamiento antibiótico con eritromicina. Es importante considerar que si bien, la linfadenitis no se considera una zoonosis transmitida por alimentos, el *C. pseudotuberculosis* ha sido aislado, de nódulos linfáticos mamarios afectados en cabras productoras de leche (Estevao Belchior *et al.*, 2009).

Más recientemente; en Hong Kong se reportó una rara infección oftalmológica por *C. pseudotuberculosis*. La presentación del caso fue realizada por Liu *et al.* (2005) y es el primer caso con este agente causal en la literatura oftalmológica. El paciente masculino de 63 años de ocupación desconocida, solamente manifestó contacto con mascotas domésticas. Este caso se

refiere a una infección en implante ocular de ojo izquierdo con 8 semanas de evolución. Los síntomas constitucionales fueron dolor en el ojo izquierdo, con descarga mucopurulenta, rodeado de edema conjuntival e hiperemia. En el cultivo, se aisló *C. pseudotuberculosis*, sensible a penicilina y vancomicina y resistente a eritromicina. Se prescribió un tratamiento sistémico con ampicilina y cloxacina por una semana junto con penicilina y vancomicina en soluciones tópicas por 4 semanas. En Paris, Francia, se notificó el primer caso en niño. Afectó a una niña saludable de 12 años de edad, procedente de áreas rurales con un cuadro clínico que evolucionó a una linfadenitis necrosante. Los primeros signos y síntomas se iniciaron 2 semanas después de sus vacaciones de verano en la zona rural de Alpes franceses, donde había estado en contacto con ovejas. Estos fueron adenopatía inguinal asociada a un exantema con prurito y fiebre. En los estudios histopatológicos se observó necrosis eosinofílica con neutrófilos limitados por un granuloma pseudotuberculoso con reacción con histiocitos y numerosas células gigantes redondeadas por bandas fibrosas delgadas. En el laboratorio se aisló *C. pseudotuberculosis* sensible a un amplio rango de antibióticos β lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas y rifampicina y resistente a ácido nalidíxico (Estevao Belchior *et al.*, 2009).

1.4. Diagnóstico

1.4.1. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial con otras patologías, que se manifiestan con abscesos de características similares, es sumamente importante. Entre ellas están las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Actinomyces*, *Mycobacterium tuberculosis* y *paratuberculosis*, traumatismo, serosa, cuerpos extraños, reacciones de sensibilidad a inyectables y menos comunes, tumores. En este aspecto los análisis histopatológicos y cultivos bacteriológicos confirman la etiología de la enfermedad (Estevao Belchior *et al.*, 2006).

También se debe hacer el diagnóstico diferencial con lesiones que macroscópicamente pueden llegar a confundirse con LC como es el caso de los quistes hidatídicos (Marcellino *et al.*, 2018).

1.4.2. Diagnóstico molecular

-Secuenciación del Gen ARN ribosomal 16S (ARNr 16S).

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

a) 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 Procaryotes. Disponibles en <http://www.springer.com/bergeysoutline/main.htm> y <http://www.prokaryotes.com>, respectivamente. (Drancourt *et al.*, 2000).

b) La identificación rápida y precisa de las bacterias. En Microbiología Clínica, la identificación molecular basada en la secuenciación del gen ARNr 16S 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 corinebacterias en particular (Ortiz Arana *et al.*, 2016).

El uso en los métodos de biología molecular, tal como es el caso de la secuenciación del gen ARNr 16S ha facilitado delimitar de manera más estricta los diferentes géneros bacterianos. Por lo tanto la secuencia del gen ARNr 16S es el marcador molecular más ampliamente utilizado para determinar las relaciones filogenéticas de las bacterias. Sin embargo, el polimorfismo endógeno limita su utilidad para el análisis taxonómico o la identificación a nivel de especie (Ortiz Arana *et al.*, 2016).

Un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basado en los genes ARNr 16S ha sido desarrollado para identificar *C. pseudotuberculosis*, aunque este ensayo fue útil para estimar la prevalencia de LC en los animales estudiados, presentaba algunas limitantes: (i) como que era dependiente de cultivo bacteriano; y (ii) que no era lo suficientemente específica para distinguir *C. pseudotuberculosis* de *Corynebacterium ulcerans* y por lo tanto se requiere la identificación de otros genes como *pld* y *rpoB* que son más específicos para distinguir entre especies y subespecies del género *Corynebacterium* (Ortiz Arana *et al.*, 2016).

-Secuenciación del Gen *rpoB*

Es el que codifica para la subunidad β 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 ARNr 16S (1.500 pb) (programa SVARAP) (Renaud *et al.*, 2007).

-Secuenciación o identificación del Gen *pld*.

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. Es un blanco de amplificación en ensayos de PCR para discriminar entre aislados de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* una especie genotípicamente muy relacionada (Ortiz Arana *et al.*, 2016).

Estos tres genes *pld*, *rpoB*, *16sARN*, son los más importantes para el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* y los tres fueron amplificados en un estudio de PCR múltiple con excelentes resultados; obteniendo un método de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficacia en el diagnóstico de la bacteria (Ilhan 2013; Pacheco *et al.*, 2007).

Recientemente, con la adición del gen *narG*, es posible distinguir entre las biovariedades según la capacidad para reducir el nitrato (Araújo *et al.*, 2018)

1.5. Tratamiento

Una posible alternativa para disminuir los efectos adversos de la enfermedad, en animales de alto valor genético y reproductivo, es la administración de antibióticos cuando se diagnostica la infección en la fase temprana. En la selección de antibióticos hay que considerar diversos factores que afectan la terapia, como la localización intracelular del microorganismo, la encapsulación de los abscesos, la presencia de pus, la necesidad de largos períodos de tratamiento, el riesgo de complicaciones y el costo. Conjuntamente con el tratamiento antibiótico se sugiere en muchos casos la remoción quirúrgica del ganglio o la punción con aspiración del contenido y limpieza diaria con antisépticos, como por ejemplo una solución de yodo povidona. Se ha observado que en pequeños rumiantes, el drenaje y la apertura de los abscesos no es usualmente utilizado para la resolución de la enfermedad, el tratamiento de elección sería la remoción de los nódulos linfáticos afectados (Estevao Belchior *et al.*, 2006).

1.6. Control y prevención

Los animales afectados por LC suelen tratarse a través de ganglios linfáticos, drenaje y aislamiento de animales infectados. Sin embargo, esta práctica no elimina completamente las bacterias, debido a la posibilidad de diseminación a vísceras y otros órganos internos, así como al gran potencial de contaminación del medio ambiente. Además, los tratamientos con antibióticos no producen resultados satisfactorios debido a la difícil penetración en la cápsula del absceso, hace que el tratamiento sea inviable, enfatizando que la profilaxis es el mejor método para combatir la enfermedad (Araújo *et al.*, 2018)

Entre las acciones tendientes a disminuir los perjuicios en la producción ganadera por pseudotuberculosis se podrían enumerar: esquilar y bañar los animales infectados en forma separada, evitar los baños de inmersión luego de la esquila, el control de moscas, mantener buenas prácticas durante la esquila y otras actividades a campo. La limpieza y desinfección de instrumentos y ambientes, donde se han producido ruptura de los abscesos, es una herramienta esencial de las estrategias de control de la enfermedad; la aplicación de barreras durante el proceso de la esquila (como el uso de altas temperaturas y de desinfectantes) sería una medida complementaria al manejo adecuado de los animales enfermos, que permitiría disminuir la dispersión de las bacterias en el ambiente y la transmisión de la enfermedad dentro de las majadas (Alvarez *et al.*, 2017; Estevao Belchior *et al.*, 2006) mientras que la exposición de utensilios a 65 ° C con contaminante disminuye las bacterias 90 % en 56 segundos.

1.7. Epidemiología

La LC es una enfermedad cosmopolita. Está presente en los cinco continentes, prevaleciendo en los países que se ocupan de la ganadería de pequeños rumiantes y en casi todas las zonas geográficas definidas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE). (Aleman & Spier, 2001; Paton *et al.*, 1994; Solanet *et al.*, 2011).

Es una enfermedad no notificable en muchos países, incluyendo India, su prevalencia real, grado de infección y las pérdidas asociadas se han subestimado en gran medida. Hay pocos informes de su incidencia entre ovejas y cabras en la India (Kumar *et al.*, 2013; Mohan *et al.*, 2008).

En Australia se reporta una prevalencia del 54 %; en Tasmania encontraron lesiones de la enfermedad en el 26 % de los animales que investigaron. En Europa, se refiere que la enfermedad se reporta en Holanda desde 1984, mientras que en Francia la enfermedad la reportan con una prevalencia de un 54 %. En América, se reportan aislamientos de varias zonas dentro de los

Estados Unidos (42,4 %) como Arizona, Texas, Washington, Wyoming, Iowa y en Canadá se reportan en regiones como Ontario y Alberta (Ortiz Arana, 2016).

En Egipto Al-Gaabary *et al.* (2009) indican que la prevalencia de LC es significativamente mayor en ovejas que en cabras y mayor en animales adultos que en jóvenes. Además observan mayor prevalencia de LC en las hembras; puede ser atribuida a que las hembras se mantienen generalmente muchos años en comparación a los machos que son sacrificados a temprana edad.

En México el 5,4 % de los exudados nasales pertenecientes a ovejas trashumantes en Xalatlaco presentaron *Corynebacterium* spp., en otro estudio también se aisló *C. pseudotuberculosis* en lesiones de nódulos linfáticos, se identificó en el 65 % de los casos. En Brasil, 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 % presentaciones de las lesiones en los animales (Ortiz Arana, 2016).

Figuroa *et al.* (2007) determinaron que en Chile el 62 % de las cabras con abscesos tenían más de dos años de edad y Riet-Correa (2007) afirmó que en Brasil la frecuencia de la enfermedad se incrementa a medida que aumenta la edad de los animales (Szwako *et al.*, 2014).

En Venezuela, en la Península de Paraguaná, distribuida en tres Municipios, siendo Falcón el más extenso de ellos y con clima árido-semiárido, relieve bajo y plano, suelos sometidos a intensa meteorización física, recursos hídricos escasos y pluviometría baja, con sequía de noviembre a abril; las temperaturas medias máxima y mínima reportadas, se reafirma a *C. pseudotuberculosis* como el principal agente etiológico de las linfadenomegalias superficiales y se corrobora la presencia de LC en los rebaños de pequeños rumiantes del país, siendo los ovinos los más afectados (Primera *et al.*, 2016).

En Perú, en los últimos años se ha observado un incremento de casos con presencia de abscesos en alpacas de la zona de la Raya-Cuzco. Esta enfermedad ha venido ocasionando considerables pérdidas económicas en el país, principalmente debido a la condenación de las carcasas por la formación de abscesos, disminución en la producción de la fibra, disminución en el peso y trastornos reproductivos, dificultando además la exportación de las alpacas; motivos por los cuales se hace necesario controlar y prevenir esta enfermedad (Medrano *et al.*, 2003).

El rebaño de ovejas brasileño se concentra en la Región Sur, donde predomina la producción de lana y más recientemente carne, seguida de la región Noreste, donde la producción de carne y piel es más relevante. Tanto en el noreste, que posee el mayor rebaño de cabras en Brasil, como en el sudeste, es frecuente la cría concomitante de ovejas y cabras. Las ovejas se crían en el sureste principalmente para la producción de carne y el sistema el enfoque de gestión

suele ser extenso o semiintensivo. La cría de ovejas en el Distrito Federal (DF) se dirige a la producción para consumo de carne. En Brasil, se estima que la mayoría de los rebaños de ovejas y cabras están infectados por *C. pseudotuberculosis* y que la prevalencia clínica supera el 30 % de los animales (do Carmo *et al.*, 2012). En Paraíba, Souza *et al.* (2011) trabajando con ovejas sacrificadas determinó que el 15,9 % (236/1466) tenía lesiones macroscópicas similares a LC.

La alta prevalencia de animales positivos para LC sugiere una propagación generalizada de la enfermedad en el Distrito Federal y se deben adoptar medidas para controlar y mejorar el manejo de la salud de los rebaños para revertir esta situación. Es así que, desde el año 1983, varios autores han reportado que en los estados del noreste de Brasil, los estudios epidemiológicos demostraron una alta positividad, en relación con *C. pseudotuberculosis*, de los animales en esta región (do Carmo *et al.*, 2012).

En nuestro país, en la ciudad de Comodoro Rivadavia, provincia de Chubut de la Patagonia Austral, estudios realizados por Estevao Belchior *et al.* (2011) revelaron una frecuencia de LC del 10 % en ovejas adultas (raza Merino y Corriedale), con la cavidad torácica involucrada en la mayoría de los casos. Los linfonódulos linfáticos afectados con mayor frecuencia fueron los linfonódulos cervicales superficiales (pre-escapulares), prefemorales, supramamarios y mediastínicos. Se observó LC visceral en el 89 % de los casos con abscesos en el pulmón y el hígado.

La ocurrencia de los diferentes eventos en salud, como las enfermedades infecciosas o las crónicas no transmisibles, no se distribuye de forma aleatoria en las poblaciones. Históricamente se ha observado una relación de dichas enfermedades con el medio y con la genética, entre otros determinantes, lo que ha definido la importancia de estudiar y determinar sus patrones de ocurrencia en el tiempo y el espacio. Dicha determinación, que se considera un aspecto fundamental de la epidemiología y por ende de la salud pública, permite entender la dinámica del proceso salud-enfermedad con el medio ambiente e identificar las posibles intervenciones sociales y sanitarias que impacten el problema para disminuir o eliminar los riesgos en salud.

La geografía médica o de la salud y la cartografía son fundamentales para la descripción y análisis espacial de las condiciones de salud-enfermedad de la población; es así que los sistemas de información geográfica (SIG) pueden ser utilizados en apoyo a la vigilancia y la monitorización en salud pública (Ascuntar-Tello y Jaimes, 2015).

1.8. Transmisión

La infección se inicia con el ingreso de la bacteria a través de lesiones generadas en el manejo de los ovinos, como la esquila y en menor medida cortes de cola, marcaje y castraciones. El potencial de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir durante varias semanas en el medio ambiente contribuye a su capacidad de propagarse dentro de un rebaño. La transmisión entre las ovejas o cabras se produce principalmente a través de la contaminación de heridas superficiales o abrasiones. La tos de las ovejas y cabras infectadas por esta bacteria puede estar en contacto con cortes en la piel de otras ovejas, lo que constituye otro medio de transmisión. La presencia de la enfermedad está íntimamente ligada a las prácticas de manejo realizadas sin prevención higiénica. No hay factores de raza ni sexo que aumenten o limiten su presentación. La edad está ligada a la frecuencia mayor de situaciones de riesgo a que son sometidos los adultos (mayor número de esquila, marcas, etc.). Es raro encontrar corderos afectados incluso en áreas altamente infectadas (Corache García Pulido, 2017).

El material purulento eliminado de los abscesos contiene concentraciones muy elevadas de microorganismos viables que contaminan no solo las herramientas de esquila, sino también el suelo. Las corinebacterias presentes en el pus se organizan formando agregados bacterianos que facilitan su resistencia a condiciones ambientales adversas y mantienen su capacidad de infección. El estudio de la capacidad de supervivencia del microorganismo fuera del huésped reviste importancia para el desarrollo de programas de control y prevención de la LC (Alvarez *et al.*, 2017).

1.9. Sistemas de Información Geográfica (SIG)

Los SIG son una herramienta de gran alcance dentro de la informática, que proporciona un marco alrededor del cual podemos analizar el espacio geográfico. Los SIG han introducido nuevos conceptos relacionados al análisis y modelaje de datos complejos, mapas interactivos y la suma de gran variedad de datos con información geoespacial. Además permiten integrar formatos de visualización y de procesamiento de datos georreferenciados.

Dentro de los SIG y sus aplicaciones, esta plataforma también ha sido utilizada para estudiar y resolver problemas relacionados con el espacio geográfico (Bosque Sendra, 1992; Moldes Teo, 1995).

Además los SIG han contribuido a la eficacia de las intervenciones a través del análisis de los datos espaciales sobre la salud, identificando patrones de distribución espacial de la incidencia o la mortalidad en regiones geográficas de interés. El uso de los SIG, favorece la

formulación de planes de prevención y la toma de decisiones, mediante la construcción y prueba de modelos predictivos basados en inferencia estadística (Leonhard *et al.*, 2014).

Los SIG representan una herramienta que apoya el análisis de información en diferentes áreas; así mismo, estos sistemas proveen el apoyo analítico para la planeación, programación y evaluación de actividades e intervenciones en diferentes sectores, de acuerdo con el tema que se esté tratando de investigar. Por ello, los SIG pueden considerarse parte de los sistemas de apoyo a la toma de decisiones. Diferentes disciplinas utilizan los SIG para resolver diversas preguntas o situaciones, pero todas ejecutan tareas comunes como las siguientes:

-Organización de datos: almacenar datos con el fin de sustituir mapas físicos en papel por mapas digitales, permitiendo la reducción del espacio físico, evitando el deterioro, facilitando su rápida recuperación y posibilitando producir copias sin pérdida de calidad, entre otras.

-Visualización de datos: la posibilidad de seleccionar los niveles de información deseados, de acuerdo con el contexto, permite acoplar los mapas temáticos elegidos y de este modo superar cualquier producto en papel. A pesar de que la capacidad de análisis del ojo humano ha sido subestimada, se considera un elemento esencial para cualquier tipo de estudio que requiera información espacial.

-Producción de mapas: en general, los SIG poseen herramientas más completas para la producción de mapas, simplificando bastante la inclusión de rejillas de coordenadas, las escalas gráfica y numérica y la inclusión de leyendas y textos diversos, entre otros, lo que los hace mucho más indicados para la cartografía que los populares sistemas de diseño CAD (Computer-Aided Design).

-Consulta espacial: posiblemente la función más importante de los SIG es la posibilidad de preguntar cuáles son las propiedades de un determinado objeto, o en qué sitios geográficos tienen tales propiedades. De este modo, la interacción entre el usuario y los datos se convierte en una dinámica poderosa de conocimiento.

-Análisis espacial: consiste en el uso de un conjunto de técnicas de combinación entre los niveles de información (capas), con el fin de evidenciar patrones o establecer relaciones dentro de los datos que permanecían anteriormente ocultos al analista.

Así se convierte en una manera de inferir significado a partir del cruce de los datos.

-Previsión: uno de los propósitos de los SIG es el de verificación de escenarios modificando los parámetros para evaluar cómo los eventos, naturales o no, ocurrirían si las condiciones fuesen diferentes; de este modo se obtiene un conocimiento más general de los objetos o del área en estudio.

-Creación de modelos: la capacidad de almacenamiento, recuperación y análisis de datos espaciales convierte a los SIG en plataformas ideales para el desarrollo y aplicación de modelos distribuidos espacialmente y para la validación de escenarios hipotéticos (Ascuntar-Tello & Jaimés, 2015).

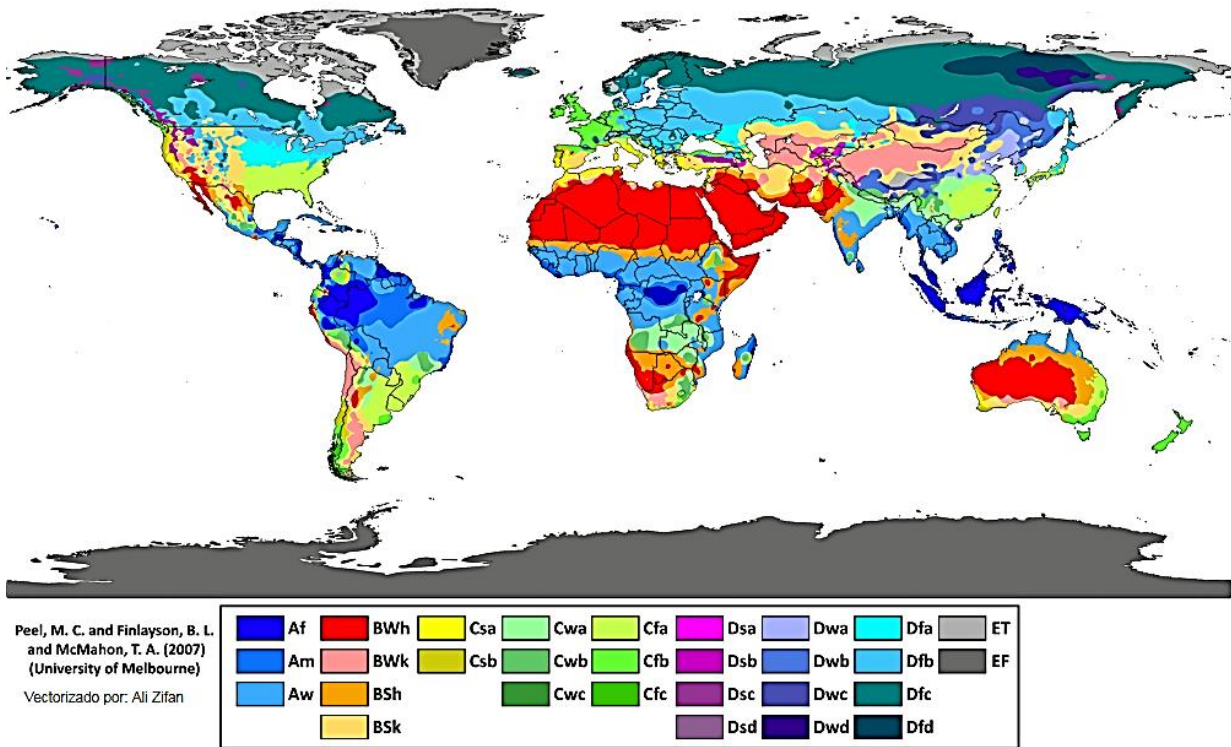
1.10. Clasificación de Köppen

Es una de las clasificaciones más utilizadas. Fue desarrollada por Wladimir Köppen, un climatólogo alemán, sobre 1900, con algunas modificaciones posteriores (1918, 1936). Está fundamentada en la idea de que la vegetación natural es el mejor reflejo del clima y combina las medias anuales de temperaturas y precipitación, junto con la estacionalidad de las precipitaciones (Alcaraz Ariza, 2013).

Es una clasificación empírica de las distintas zonas climáticas del mundo y hasta hoy es uno de los métodos más conocidos y usados en la clasificación climática. Comprende un grupo de letras para designar los grandes grupos climáticos; los subgrupos dentro de estos y posteriores subdivisiones para designar especiales características de temperatura y precipitaciones en las distintas estaciones. Se consideran 6 grupos climáticos principales, designados con letra mayúscula (A: climas tropicales; B: climas secos; C: climas templados; D: climas de invierno frío; E: climas polares, H: climas de alta montaña). Los subgrupos se designan con una segunda letra (Strahler, 1989).

En la figura 4 se ubican los diferentes tipos de clima en el mundo.

Figura 4: Mapa mundial de la clasificación climática de Köppen



Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Clasificaci%C3%B3n_clim%C3%A1tica_de_K%C3%B6ppen

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

En las bases de datos bibliográficos, existen numerosas investigaciones y publicaciones sobre la LC en Argentina y también en otros países, tales como: Canadá, Australia, Francia, Holanda, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Brasil, Suiza, Uruguay, Venezuela, Perú, Turquía, India y Cuba entre otros. En algunos de ellos se han implementado medidas de prevención y control y han desarrollado métodos de inmunodiagnóstico y métodos de determinación de interacciones entre proteínas (Arsenault *et al.*, 2003; Cabrera *et al.*, 2003; Chávez Esponda *et al.*, 2016; Chirino-Zarraga *et al.*, 2005; Dercksen *et al.*, 1996; Folador *et al.*, 2016; Hariharan *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Literak *et al.*, 1999; Medrano *et al.*, 2003; Paton *et al.*, 1994; Pepin *et al.*, 1989; Ruiz *et al.*, 1995; Songer *et al.*, 1988; Williamson, 2001).

Pero en países en vías de desarrollo son escasos los trabajos sobre la prevalencia de esta enfermedad, las características genéticas del agente y mucho menos el desarrollo y la evaluación de un inmunógeno. Con relación a la frecuencia de presentación de la enfermedad, del 60 % de los países que la reportan, solo el 18,7 % la consideran una enzootia y el 10 % la notifican como casos excepcionales. La LC una vez que se instaura en la producción es difícil de controlar, por la facilidad de contagio, la pobre respuesta a agentes terapéuticos y el costo del tratamiento, la habilidad del agente etiológico de persistir en el ambiente, la dificultad en detectar subclínicamente a los animales afectados, la ausencia de vacunación y la falta de consciencia en los productores (Al-gaabary *et al.*, 2009; Ortiz Arana, 2016).

Solo el 31,2 % de los países se declaran afectados y toman algún tipo de medida, de ellos solo el 8,3 % realiza algún tipo de prueba para su diagnóstico; elemento que refleja el bajo nivel diagnóstico que existe internacionalmente para esta enfermedad. En los países afectados solo el 25 % realizan algún tipo de tratamiento para el control de la enfermedad y solo el 10,4 % aplica algún tipo de programa de vacunación. Existen vacunas y bacterinas comerciales, multicomponentes con fracciones de exoproteínas en países desarrollados, pero no han logrado dar un resultado confiable en ovejas y cabras (Ortiz Arana, 2016).

En cuanto a nuestro país la linfadenitis caseosa es subestimada sin mayores atenciones (Gómez *et al.*, 2015).

No están evaluadas las medidas de manejo de los animales enfermos; las vacunas comerciales disponibles para ovinos y caprinos no están autorizadas (Aquad *et al.*, 2017; Palmero *et al.*, 2013).

En Patagonia Argentina, la LC está muy difundida, siendo un serio riesgo sanitario para la producción ovina, la prevalencia a nivel de majadas en establecimientos que crían ovejas, está estimada en un 70 %, siendo considerada una enfermedad de alta prevalencia en majadas patagónicas de acuerdo a los datos informados por Arrigo (1984), Robles y Olaechea (2001). Según datos de mataderos supervisados por SENASA, la prevalencia en ovejas faenadas en los años 2000 a 2005, se registra entre un 7 a 11 % en ovejas y capones, basados en el examen de hígado y pulmón (Estevao Belchior *et al.*, 2006).

Desde el año 2003 al 2018 ha habido continuidad en las investigaciones sobre esta patología, en la Patagonia Argentina por el grupo de investigación de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud - de la Universidad Nacional de la Patagonia “San Juan Bosco” (Alvarez *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2010a; Alvarez *et al.*, 2010b; Alvarez *et al.*, 2017; Estevao Belchior *et al.*, 2006; Estevao Belchior *et al.*, 2007; Estevao Belchior *et al.*, 2009; Estevao Belchior *et al.*, 2011; Estevao Belchior *et al.*, 2014; Gallardo *et al.*, 2004; Gallardo *et al.*, 2010; Gallardo *et al.*, 2013; Gallardo *et al.*, 2016a; Gallardo *et al.*, 2016b; Jodor *et al.*, 2007).

Es así que, las características metabólicas de aislamientos autóctonos de ovejas de la región patagónica argentina fueron determinadas por Estevao Belchior *et al.* (2007).

La línea de investigación referente al estudio de la pseudotuberculosis en ovinos patagónicos se inició en el año 2003, a través de cinco proyectos de investigación. En el año 2005 se estableció vínculo con la Agencia de Extensión Regional-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (AER-INTA) y la sociedad Rural de Comodoro Rivadavia declaró de interés la realización de estos proyectos y se establecieron acciones conjuntamente con la AER-INTA para la presentación de resultados en las exposiciones de Ganadería y Afines organizadas por la Sociedad Rural de Comodoro Rivadavia.

En el año 2007, el grupo de investigación, recibió el Premio “San Isidro Labrador” en la 69° Exposición de Ganadería y Afines, organizada por la Sociedad Rural de la ciudad de Comodoro Rivadavia, provincia de Chubut por los avances en la investigación de la enfermedad en ovinos de la región.

El grupo de Salud Animal de INTA EEA Bariloche, INTA EE Rafaela y Universidad Católica de Córdoba, también se encuentran trabajando en la línea de investigación de LC

(Marcellino *et al.*, 2016; Marcellino *et al.*, 2018). Es así que, Auad *et al.* (2017), reportaron el primer aislamiento en Argentina de *C. pseudotuberculosis* en llama (*Lama glama*).

Por lo tanto, aunque en Argentina, la problemática de LC en la ganadería ovina y caprina data de varios años, se vislumbra la necesidad de caracterizar los factores de virulencia de aislamientos autóctonos de *C. pseudotuberculosis*, de Patagonia Argentina, y realizar una comparación integral con aislamientos de otros orígenes según su sitio de lesión, el tipo de animal, características morfológicas, metabólicas, fisiológicas, localización geográfica que se derivan de aspectos demográficos y efecto climático, que permita establecer algún tipo de relación. El desarrollo continuo de conocimiento acerca de diversos aspectos de aislamientos locales, será de vital importancia para el desarrollo de nuevas estrategias de inmunógeno, que permitan mejorar las medidas de prevención y control de esta enfermedad tan arraigada en la Patagonia Austral de la Argentina.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivos Generales

1-Estudiar las características morfológicas, fisiológicas, metabólicas y de virulencia en aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, aislados de lesiones de linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes.

2-Determinar si existe relación entre los aislamientos locales y de otras regiones con alta prevalencia de LC.

2.2.2. Objetivos particulares

1-Characterizar bioquímica y genéticamente aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de diferentes fuentes y localizaciones geográficas.

2-Estudiar *in vitro* la sensibilidad antibiótica e investigar mecanismos de resistencia.

3-Investigar factores de virulencia de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* seleccionados y caracterizados.

4-Analizar la relación entre aislamientos de regiones con prevalencia de LC (Patagonia Argentina y estados de Brasil) mediante sistema de información geográfica (SIG) y clasificación climática.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento e identificación de *C. pseudotuberculosis* de diferentes orígenes.

3.1.1-Selección de aislamientos.

Se estudiaron 35 aislamientos provenientes de lesiones caseosas y/o abscedativas compatibles con linfadenitis caseosa, en pequeños rumiantes de diferentes fuentes y localizaciones geográficas (tabla 1).

Tabla 1: Descripción de los aislamientos estudiados.

Aislamiento	Animal	Sitio de lesión	Lugar origen
ARGENTINA			
Cp 10	Oveja	Absceso pulmonar	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz
Cp 11	Oveja	Linfonódulo mediastínico	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz
Cp14	Oveja	Absceso pulmonar	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz
Cp15	Oveja	Linfonódulo mediastínico	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz
Cp16	Oveja	Absceso pulmonar	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz
Cp17	Oveja	Absceso renal	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz
Cp20	Oveja	Absceso renal	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz
Cp21	Oveja	Absceso renal	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz
Cp32	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz
Cp36	Oveja	Linfonódulo inguinal superficial	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz
Cp 93	Oveja	Absceso renal	Departamento Escalante - provincia de Chubut
Cp94	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Departamento Escalante - provincia de Chubut
Cp95	Oveja	Linfonódulo inguinal superficial	Departamento Escalante - provincia de Chubut
Cp96	Oveja	Linfonódulo inguinal superficial	Departamento Escalante - provincia de Chubut
Cp97	Oveja	Linfonódulo inguinal superficial	Departamento Escalante - provincia de Chubut
5807	Oveja	Linfonódulo inguinal superficial	Provincia de Tierra del Fuego
6007	Oveja	Linfonódulo inguinal superficial	Provincia de Río negro

K107	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Departamento Languiño - provincia de Chubut
K407	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Departamento Languiño- provincia de Chubut
K507	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Departamento Languiño - provincia de Chubut
7506	Cabra	Absceso testicular	Provincia de Río Negro
BRASIL			
355 CRE	Oveja	Linfonódulo subilíaco (pre-crural)	Aracatuba- Estado San Pablo
103	Oveja	Linfonódulo subilíaco (pre-crural)	Aracatuba- Estado San Pablo
106	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Aracatuba- Estado San Pablo
173	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Aracatuba - Estado San Pablo
174	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Aracatuba- Estado San Pablo
297	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Aracatuba- Estado San Pablo
310	Oveja	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Aracatuba- Estado San Pablo
356	Oveja	Linfonódulo subilíaco (pre-crural)	Aracatuba - Estado San Pablo
VD 40	Cabra	Linfonódulo inguinal superficial	Estado de Bahía
VD 50	Cabra	Linfonódulo inguinal superficial	Estado de Bahía
VD 52	Cabra	Linfonódulo inguinal superficial	Estado de Bahía
VD 53	Cabra	Linfonódulo inguinal superficial	Estado de Bahía
VM 189	Cabra	Linfonódulo inguinal superficial	Estado de Bahía
1002	Cabra	Linfonódulo inguinal superficial	Estado de Bahía

3.1.2-Cultivo, caracterización de colonias y conservación de los aislamientos

Los aislamientos se cultivaron en agar tripteína soya (TSA) suplementado con 5 % de sangre de oveja y se incubaron en atmósfera normal a 37 °C por 48-72 h. Las colonias se caracterizaron de acuerdo al tamaño, pigmento y presencia de hemólisis (Leardini *et al.*, 2002).

Los aislamientos se preservaron como cultivos puros en CRYOBANK™, para futuros ensayos. Se basa en un sistema de un criovial que contiene perlas químicamente tratadas suspendidas en una solución preservante criogénica especial.

3.2. Identificación

3.2.1-Morfología bacteriana

Se realizaron las siguientes técnicas de microscopía:

-a-Coloración de Gram: de acuerdo a técnicas estándar

-b-Microscopía electrónica de barrido: las muestras se analizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro Científico Tecnológico – CONICET-Bahía Blanca.

A partir de un cultivo puro de *C. pseudotuberculosis*, en caldo tripteína de soja de 24 h de incubación, se obtuvo un pellet por centrifugación a 3000 rpm, al que se le realizó el siguiente procedimiento (Hayat, 2000).

1-Fijación: utilizando una solución de 10 ml de formaldehído, 5 ml de ácido acético glacial, 25 ml de agua destilada y 50 ml alcohol etílico 96° (Reactivo FAA).

2-Deshidratación: la mezcla anterior se sometió a concentraciones crecientes de alcohol etílico en agua destilada (25 %, 50 %, 75 % y 100 %) cada una por 15 min. Posteriormente con acetona/alcohol etílico 96° 50/50 (v/v) durante 15 min hasta llegar a 100 % (v/v) (100 % acetona pura sin diluir) por 30 min (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

3- Secado: se realizó por punto crítico (E3000, Polaron) empleando CO₂.

4-Metalización: las muestras se montaron en portamuestras especiales para microscopía electrónica. Finalmente, fue evaporado oro (300 Å) empleando una evaporadora de metales en plasma de Argón (91000 Model 3, Pelco).

Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio electrónico de barrido (LEO EVO 40X VP), con un nivel de voltaje de 7 Kv, y con una amplificación de 10000 x.

3.2.2. Bioquímica

Los aislamientos se identificaron sobre la base de pruebas de: catalasa, oxidasa, oxidación/fermentación de glucosa en agar cistina tripteína (CTA), producción de hemólisis y efecto de los lípidos sobre el crecimiento (lipofilismo) (Estevao Belchior *et al.*, 2007, Leardini *et al.*, 2002, Vay & Famiglietti, 2009). También se realizaron las pruebas de sensibilidad a O/129 e hidrólisis de gelatina a 22 °C, estas determinaciones se practicaron e interpretaron de acuerdo a metodología estandarizada (Collins & Cummins, 1986, Graevenitz & Krech, 1992; Leardini *et al.*, 2002).

El perfil metabólico de los aislamientos se complementó con la aplicación del método comercial API® Coryne (bioMérieux, France 2009). El desarrollo y la interpretación de resultados se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A las 24 h se efectuó la lectura de 12 pruebas enzimáticas: reducción de nitratos a nitritos (NIT), catalasa (CAT), pirazinamidasas (PIZ), pirolidónilarilamidasas (PYRA), fosfatasa alcalina (PAL), β -glucuronidasa (β GUR), β -galactosidasa (β GAL), α -glucosidasa (α GLU), N-acetil- β -glucosaminidasa (β NAG), esculina (ESC), ureasa (URE) e hidrólisis de gelatina (GEL) a 37°C, además de un control negativo. A las 48 h se evaluó la producción de ácido a partir de ocho hidratos de carbono (fermentación): glucosa (GLU), ribosa (RIB), lactosa (LAC), glicógeno (GLYG), xilosa (XYL), manitol (MAN), maltosa (MAL) y sacarosa (SAC).

3.2.3. Caracterización genotípica.

La identificación de los aislamientos se confirmó por técnicas moleculares mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. La amplificación de este gen se realizó con los primers correspondientes a la posición 827 y 1492 del gen ARNr 16S de *Escherichia coli*. Los productos de PCR se secuenciaron utilizando el equipo Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) y analizados en el ABI 377 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa BLAST, comparándolas con secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para la identificación bacteriana se utilizó el programa Bioinformatics Bacterial Identification (BIBI) y mediante el programa CLUSTAL W se construyó un árbol filogenético (Estevao Belchior *et al.*, 2007).

Además, se amplificaron mediante PCR y PCR múltiple (mPCR) los genes ARNr 16S, *rpoB* y *pld*. El marcador utilizado fue TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder (número de catálogo 10488085-Invitrogen) y además se utilizó un control positivo y uno negativo; de acuerdo a la metodología detallada en Pacheco *et al.* (2007), en el Laboratorio de Genética Celular y Molecular, del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Minas Gerais (ICB– UFMG), en Brasil. Con esta institución se mantienen vínculos de cooperación entre los grupos de trabajo a través de un convenio marco entre ambas instituciones universitarias.

3.3. Estudio de sensibilidad a antibióticos

3.3.1. Determinación de la sensibilidad antibiótica por métodos de difusión en agar.

La sensibilidad a antibióticos se determinó por el método de difusión con discos de acuerdo a metodologías estándar ya establecidas (Isenberg, 1992). Para ello se utilizó agar Mueller- Hinton suplementado con 5 % de sangre de oveja, las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera normal y las lecturas de los halos de inhibición se evaluaron a las 24 h y se reconfirmaron a las 48 h. Se ensayaron los siguientes antibióticos: amicacina (30 µg), amoxicilina-clavulánico (20/10 µg), ampicilina (10 µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (30 µg), estreptomina (300 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), kanamicina (120 µg), norfloxacina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg), trimetroprima-sulfametoxazol (25 µg) y vancomicina (30 µg). Para la interpretación de los resultados se utilizaron los valores recomendados por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para *Staphylococcus* spp., que fueron validados por estudios previos debido a que no hay

valores de corte aceptados que específicamente asignen categorías interpretativas para las corinebacterias por este método. (CLSI M 100-S. 2016, Funke *et al.*, 1997). Se consultó el documento M100-S17 para ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxima, imipenem, oxacilina y vancomicina (CLSI 2007).

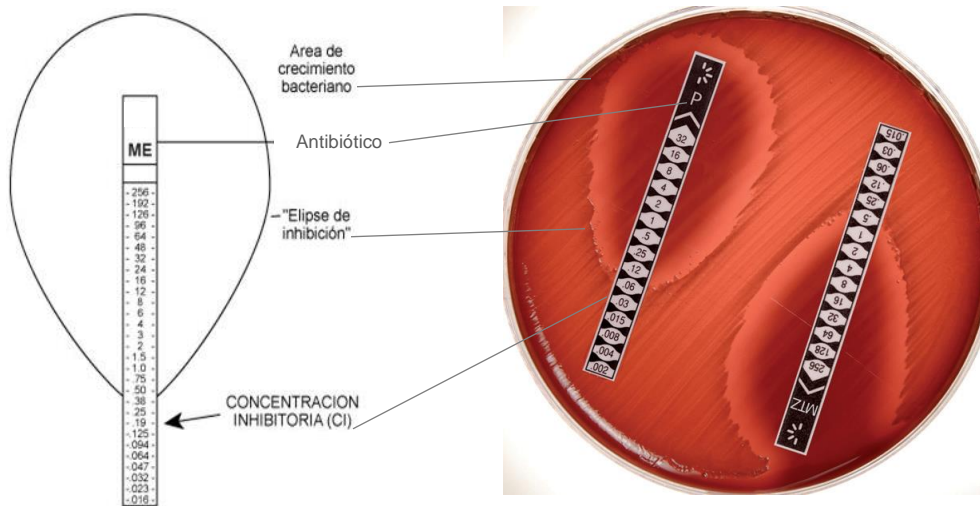
Estos valores se utilizaron para todos los antibióticos testeados a excepción de estreptomina. Como cepa de control de calidad de la metodología se utilizó *S. aureus* ATCC 25923.

Para la interpretación de resultados se clasificaron antibióticos activos cuando el aislamiento bacteriano fue inhibido *in vitro* por una concentración correspondiente al criterio de sensibilidad del estándar para *Staphylococcus* spp y no activo cuando no fue inhibido.

3.3.2. Determinación de la sensibilidad antibiótica por métodos de dilución.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se estudió por el método epsilométrico (Oxoid M.I.C. Evaluator™ Strip-Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, Reino Unido), basado en el uso de tiras inertes impregnadas con gradientes de los antibióticos: cefotaxima (0,015-256 µg/ml), ciprofloxacina (0,002-32 µg/ml), eritromicina (0,015-256 µg/ml), gentamicina (0,06-1.024 µg/ml), imipenem (0,002-32 µg/ml), penicilina (0,015-256 µg/ml), tetraciclina (0,015-256 µg/ml) y vancomicina (0,015-256 µg/ml). Para el ensayo se empleó agar Mueller-Hinton suplementado con 5 % de sangre de oveja. Los resultados se registraron a las 24 h y reconfirmados a las 48 h. Se interpretó el valor de la CIM en µg/ml, obtenido de la intersección entre la concentración dada por la tira reactiva y el crecimiento bacteriano que forma una elipse (figura 5). Los datos se analizaron de acuerdo con los criterios establecidos en CLSI para *Corynebacterium* spp. (CLSI 2016; M45-3rd Edition). Como cepa de control de calidad de la metodología se utilizó *S. aureus* ATCC 29213.

Figura 5: Método epsilométrico (Oxoid M.I.C.Evaluator™ Strip -Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK).



3.4. Estudio de mecanismo de resistencia

3.4.1. Determinación de la presencia de integrones que vehiculizan genes de resistencia.

-Extracción de ADN

A partir de una suspensión en 300 μ l de agua destilada estéril de un cultivo bacteriano, se realizó la extracción de ADN mediante la lisis por ebullición (5 min). Luego de la centrifugación (11000 x g a 4 °C por 3 min) se separó el sobrenadante para ser utilizado en la PCR.

-Detección de integrones

En la PCR se emplearon cebadores específicos para detectar los genes de la integrasa *intI1* de acuerdo al método descrito por Orman *et al.* (2002) con modificaciones: la reacción de PCR se desarrolló en un volumen total de 25 μ l conteniendo: 5 μ l de ADN templado, los cebadores respectivos en concentración 1 μ M, 1 μ M dNTP (Promega, Madison, EE.UU.), 1XGreen GoTaq Reaction Buffer (1,5 μ M MgCl₂, pH 8,5); 1,5 μ M MgCl₂ y 0,2 U de Go Taq ADN polymerase (Promega, Madison, EE.UU.). La reacción de amplificación de ADN se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 3 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 30 s a 52 °C (apareamiento) y 2 min a 72 °C (extensión); extensión final 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se observaron en geles de

agarosa al 1,8 % (p/v) (Biodynamics SRL, Argentina) en buffer TAE 1X y se revelaron con colorante SYBR Safe. Se utilizó la cepa control *Enterobacter cloacae* E702.

3.5.-Estudio de los factores de virulencia

3.5.1. Ácidos micólicos

3.5.1.1. Técnica según Minnikin *et al.* (1975)

La presencia de AM se determinó, mediante metanólisis ácida de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*. Se pesaron 50 mg de bacteria seca y en un tubo de metanólisis se mezcló con 3 ml de metanol, 3 ml de tolueno y 0,1 ml de ácido sulfúrico concentrado. El contenido se mezcló y se llevó a cabo la metanólisis por 12-16 h a 50 °C en estufa de cultivo. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron 1,5 ml de hexano, se agitó la mezcla y se observó la formación de dos capas.

Los ésteres metílicos de AM extraídos de la capa superior se guardaron en freezer a -20 °C hasta su utilización.

-Siembra

Se cortaron secciones de 10 x 10 cm de placas cromatográficas de sílica gel G80F (SIGMA, USA). En cada una se trazaron dos líneas a un cm de distancia de cada extremo con un lápiz tipo 6B. En una de las líneas trazadas se marcaron puntos separados 1 cm entre ellos, dejando en cada extremo de la placa 1,5 cm de separación con el borde (línea base). En esta línea se sembraron, con micro pipeta, los ésteres metílicos de los AM utilizados como estándares (cepas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* SIGMA M4537, USA) y de las muestras problema.

-Corrida cromatográfica

Se realizó una corrida unidireccional en el sistema de elución n-hexano/éter dietiléter (85:15) (v/v) (Minnikin *et al.*, 1975). Se consideraron las siguientes condiciones de corrida: distancia: 8 cm, tiempo: 30 min y temperatura: 25 °C. El cromatograma que desarrolló, se colocó en un recipiente lleno de cristales de yodo. En varios minutos aparecieron manchas marrones sobre fondo amarillo claro.

3.5.1.2 Técnica según Chiani *et al.* (1996) y Zerbini *et al.* (1996) con modificaciones

-Saponificación y esterificación de la muestra

La saponificación de la muestra se efectuó según Chiani *et al.* (1996) y Zerbini *et al.* (1996) con modificaciones. Se resuspendieron dos ansadas de aislamientos puros de *C. pseudotuberculosis*, con 2 ml de hidróxido de potasio al 25 % en agua-metanol (1:1 v/v), bajo cámara de flujo laminar (General Filter Argentina) Clase II, Tipo A2. La mezcla se autoclavó a 121 °C durante 90 min, se enfrió y luego se agregó 2 ml de cloroformo. Posteriormente, se acidificó con 2 ml de ácido clorhídrico-agua (1:1 v/v), se centrifugó a 3500 rpm en centrífuga (IEC, Argentina) durante 15 min (figura 6) y se transfirió la fase orgánica a otro tubo donde se evaporó a sequedad en manta calefactora (Fischer, USA) a 80 – 90 °C, utilizando un digestor como soporte de los tubos. La esterificación se realizó con la mezcla metilante ácido clorhídrico–metanol 1N (esterificación ácida) calentando durante 90 min a 80-90 °C sobre manta calefactora. Posteriormente se efectuaron dos extracciones sucesivas con éter de petróleo. Una vez evaporado el solvente los ésteres metílicos extraídos se resuspendieron en 1 ml de n-hexano y se guardaron en freezer a -20 °C hasta su utilización.

Figura 6: Centrifugación en la saponificación y esterificación de la muestra.



Cromatografía en placa delgada (TLC).

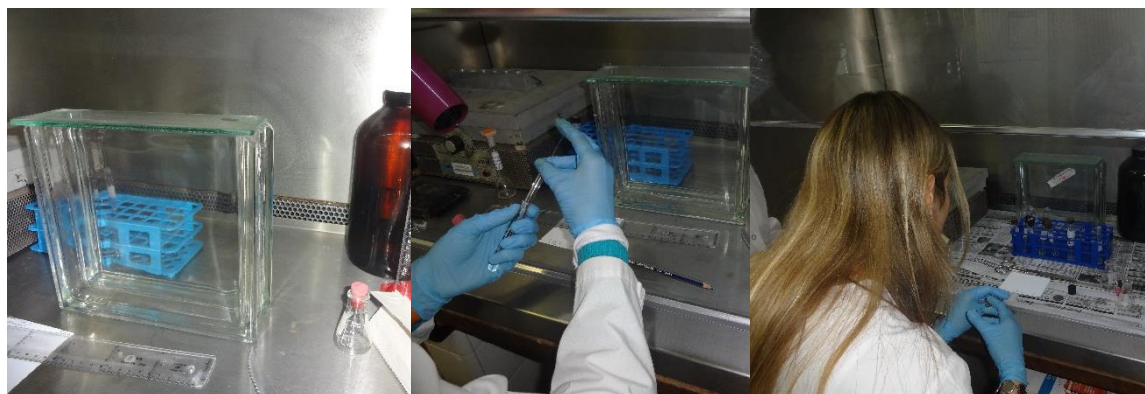
-Siembra.

Se cortaron secciones de 10 x 10 cm de placas cromatográficas de sílica gel G80F (SIGMA, USA). En cada una se trazaron dos líneas a 1 cm de distancia de cada extremo con un lápiz tipo 6B. En una de las líneas trazadas se marcaron puntos separados 1 cm entre ellos, dejando en cada extremo de la placa 1,5 cm de separación con el borde (línea base). En esta línea se sembraron, con micro jeringa Hamilton, los ésteres metílicos de los AM utilizados

como estándares (cepas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. bovis* (BCG) Pasteur, *M. smegmatis* mc² 155 y *M. tuberculosis* (SIGMA M4537, USA) y de las muestras problema (figura 7).

Para determinar el volumen que permitiera la mejor visualización de las manchas, se sembraron simultáneamente para cada muestra, 10, 20, 30, 40 y 50 μ l.

Figura 7: Preparación y siembra de placas cromatográficas de sílica gel G80F (SIGMA, USA).



-Corrida Cromatográfica.

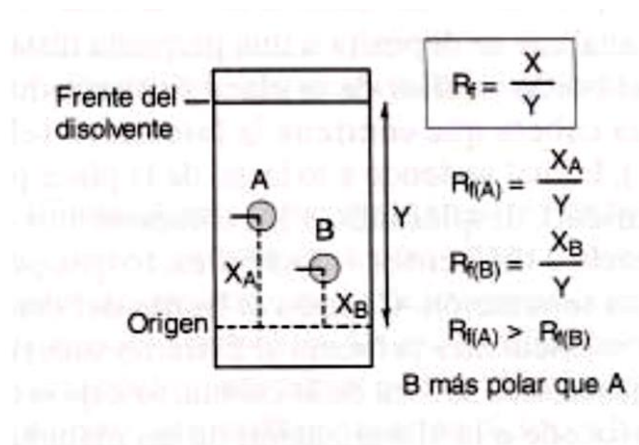
Con el objetivo de tener registro de los 6 tipos de ácidos micólicos, se utilizaron dos sistemas de elución con distintos solventes de desarrollo: 1- diclorometano, donde los AM tipo III y IV no se separan y 2-dietiléter/n-hexano (15:85) (v/v) donde los AM tipo II y tipo III no se separan (figura 8). En la cuba 1 se realizó una corrida unidireccional en el sistema de elución diclorometano. En la cuba 2 se realizaron dos corridas cromatográficas unidireccionales en el sistema de elución dietiléter/n-hexano (15:85) (v/v) (de la Torre, 2011). Se consideraron las siguientes condiciones de corrida: distancia: 8 cm, tiempo: 30 min y temperatura: 25 °C. Para revelar las manchas se rociaron uniformemente las placas cromatográficas con solución de ácido fosfomolibdico al 10% (P/V) en etanol bajo campana y hasta evaporación de la solución de revelado (figura 9). Se colocaron las placas cromatográficas en estufa (DALVO, Argentina) a una temperatura entre 80 y 100 °C, durante 20 min o hasta la aparición de manchas grises características. Se visualizaron múltiples manchas en el cromatograma y se calculó la relación de frente (Rf) para cada una (figura 10), realizando el cociente entre la distancia recorrida por la muestra problema (X) (en cm) y la distancia recorrida por cada solvente de desarrollo elegido (Y) (en cm) (Chiani *et al.*, 1996).

Figura 8: Cuba cromatográfica y sistemas de elución



Figura 9: Revelado con ácido fosfomolibdico al 10 % (p/v) en etanol bajo campana.



Figura 10: Calculo del Rf**-Registro fotográfico.**

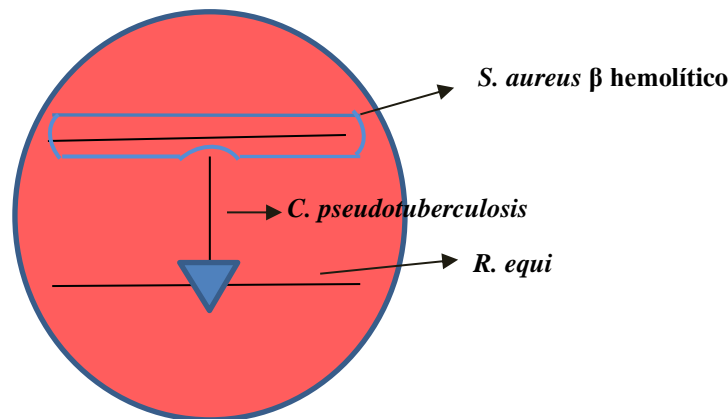
Se utilizó una cámara digital Sony de 12 megapíxeles. Los cromatogramas se colocaron sobre una superficie clara para mejorar la iluminación y la imagen final.

3.5.2. Exotoxina: Fosfolipasa D.**3.5.2.1. Método de screening**

Se ensayaron las pruebas de hemólisis sinérgica frente a *Rhodococcus equi* (prueba de CAMP: Christie-Atkins-Munch-Peterson) y de inhibición de la hemolisina del *S. aureus* ATCC 29213 (CAMP reversa), para demostrar la presencia de la exotoxina (Baird & Fontaine, 2007).

Para este ensayo se utilizaron placas de agar sangre de oveja. Se sembraron los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* en forma de estría y perpendicularmente a la estría de *S. aureus* y de *Rhodococcus equi*, sin que las mismas entren en contacto (figura 11). Las placas se incubaron a 37 °C por 24 - 48 h.

En la interpretación, el factor equi interacciona con la fosfolipasa D de *C. pseudotuberculosis* y se observa un aumento de la hemólisis en forma de punta de flecha, mientras que con el *S. aureus* hay una inhibición de la hemólisis completa. (Hébert & Hancock, 1985; Weinstock & Brown, 2002).

Figura 11: Esquema de la prueba de CAMP y CAMP reversa

3.5.2.2. Obtención y caracterización preliminar de la exotoxina

-Obtención

Se desarrolló un protocolo de trabajo empleando la metodología detallada por Brown *et al.* (1986). La exotoxina se obtuvo a partir de un cultivo en medio líquido del aislamiento de *C. pseudotuberculosis*, a 37 °C y 72 h. Posteriormente se separaron las células de cultivo por sedimentación reposando toda la noche en heladera (4 °C), luego se centrifugó a 8000 rpm a 10 °C por 30 min en centrífuga refrigerada y finalmente se filtró utilizando membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm de porosidad, en equipo de filtración Sartorius.; obteniéndose así la toxina en el sobrenadante.

-Determinación de masa molecular aparente

A partir del sobrenadante la toxina se caracterizó de manera preliminar sobre la base de su masa molecular aparente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de acuerdo a la técnica propuesta por Laemmli (1970).

El SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) se realizó a partir del sobrenadante en un equipo MiniProtean II de Biorad®.

La concentración total del monómero fue de 10 % (p/v), la tinción de los geles se realizó con Coomassie Blue 0,2 % en metanol: ácido acético: agua (20:0,5:79,5) por 30 min y se decoloró con metanol: agua (30:70).

El buffer de siembra se preparó con 1 ml de Tris-HCl 0,5M pH 6,8; glicerol 0,8 ml; 1,6 ml de lauril sulfato sódico o dodecil sulfato sódico (SDS) 10 % (p/v); 0,4 ml de 2-b-mercaptoetanol; 0,2 ml de azul de bromofenol 0,05 % (p/v).

El gel realizado es llamado discontinuo o tipo Laemmli, que se basa en utilizar dos tipos de geles, el primero llamado de siembra, estaqueo o starring y el segundo llamado de resolución, corrida o running, en la tabla 2 se describe la composición de cada uno de los geles utilizados.

Tabla 2: Construcción del gel discontinuo

	Gel de siembra	Gel de resolución
MONÓMERO	0,33 ml	1,5 ml
H ₂ O	1,55 ml	0,90 ml
GEL BUFFER	0,62 ml	1,50 ml
GLICEROL	-----	0,5 ml
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	5 ul	4 ul
Persulfato amónico 10 % (APS)	50 ul	40 ul

Como patrón de peso molecular se utilizó un estándar, con un rango de pesos moleculares (PM) entre 14 - 205 kDa: miosina (200 kDa), beta galactosidasa (116,25 kDa), fosforilasa b (97,40 kDa), albúmina sérica (66,20 kDa), ovoalbúmina (45,00 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,50 kDa), lisozima (14,40 kDa) y aprotinina (6,50 kDa) (Bio Rad Life Science®). Se registró la distancia recorrida por cada banda y se representó la relación entre la movilidad aparente y la masa molecular aparente de las proteínas del patrón molecular.

3.5.3. Enzimas.

Para determinar la producción enzimática, se empleó agar base adicionado con diferentes sustratos de acuerdo a la prueba a desarrollar. Todas las pruebas se incubaron a 37 °C hasta 10 días con observaciones diarias a excepción de la coagulasa, ADNsa, fenil alanina y la urea que se les realizó la lectura a las 48 h.

3.5.3.1. Actividad hemolítica

Se ensayó y observó la capacidad hemolítica en agar TS suplementado con 5 % de sangre de oveja, de caballo y humana.

Interpretación: la hemólisis es completa (beta) si produce un halo transparente o parcial (alfa) con halo verdoso, por digestión incompleta de la hemoglobina. Se denomina hemólisis gamma a la ausencia de hemólisis (García Martos *et al.*, 1997).

3.5.3.2. Actividad proteolítica

Las proteasas son excretadas al medio para la degradación de proteínas. Se demostró la producción de caseinasas y gelatinasas.

-Caseinasa: para evidenciarla se utilizó agar TS, adicionado con 20 % de leche descremada estéril.

Interpretación: en una reacción positiva la caseína es hidrolizada, observándose alrededor del crecimiento bacteriano un halo transparente. Como cepa control positivo se utilizó una cepa *S. aureus* ATCC 29213.

-Gelatinasa: se utilizó gelatina bacteriológica Britania[®], además se evaluó la actividad a 4 °C.

Interpretación: se consideró una reacción positiva cuando la gelatina permaneció en estado líquido luego de exponer el medio a 4 °C. Como control positivo se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y control negativo *E. coli* ATCC 35218 (García Martos *et al.*, 1997).

3.5.3.3. Actividad lipolítica

Se determinó la producción de esterases extracelulares y lipasas verdaderas en medio base adicionado con 1 % Tween 80 y medio base suplementado con 0,25 % aceite de oliva, respectivamente (Ranjitha, 2009).

Interpretación: se consideró como reacción positiva la presencia de opalescencia alrededor de las colonias a causa de la precipitación de los ácidos grasos, utilizando los distintos sustratos. Como cepa control positivo de actividad esterasa extracelular se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.5.3.4. Otras

-Lecitinasas

Se utilizó agar TS adicionado con 5 % de solución yema de huevo. El agar yema de huevo permitió evidenciar además actividad proteolítica y lipolítica.

Interpretación: las lecitinasas actúan sobre la lecitina del huevo generando un precipitado blanco alrededor de la colonia. En la actividad lipasa se observa una iridiscencia alrededor de las colonias, visible por reflejo de la luz y en la actividad proteolítica se evidencia una zona transparente que rodea las colonias. Como control positivo se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 (García Martos *et al.*, 1997).

-Amilasas

Se empleó agar TS adicionado con 1 % de almidón.

Interpretación: se consideró reacción positiva cuando se observó un halo transparente alrededor de la colonia por la hidrólisis del almidón, que se hace más visible por adición de una solución lugol. En una reacción negativa el almidón no hidrolizado se coloreó de azul cuando se combinó con el yodo de la solución de lugol. Como control positivo se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 (García Martos *et al.*, 1997).

-ADNsas

Se utilizó agar ADNsa.

Interpretación: la hidrólisis enzimática del ácido desoxirribonucleico por la enzima desoxirribonucleasa (ADNsa) se manifestó por un aclaramiento del medio alrededor de la colonia cuando se añadió ácido clorhídrico 1 N. Como control positivo se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 (MacFaddin, 2003).

-Coagulasa libre

Se empleó plasma humano. La técnica se efectuó en tubo, inoculando la bacteria en 0,5 ml de plasma e incubándolo por un período superior de 4 h.

Interpretación: la coagulación del plasma indica la capacidad del microorganismo de coagular el plasma por acción de la coagulasa libre. Como control positivo de la reacción se utilizó una cepa de *S. aureus* ATCC 29213 (MacFaddin, 2003).

-Ureasa

Se utilizó el medio Christensen (urea agar base -Britania[®]) con el agregado de urea al 40 %.

Interpretación: La hidrólisis de la urea se manifestó por el viraje del indicador rojo fenol, de naranja pálido a fucsia, debido a la producción de compuestos amoniacales. Como control positivo se utilizó una cepa de *P. mirabilis* proveniente de muestra clínica.

-Desaminasas

Se utilizó agar fenilalanina. Se realizó la investigación de desaminasas por acción de la fenilalaninadesaminasa.

Interpretación: el aminoácido aromático fenilalanina sufre una desaminación oxidativa y se forma fenilpirúvico, con la consiguiente acidez del medio. Para poner de manifiesto esta acidez se añaden unas gotas de cloruro férrico al 10 %, que actúa como oxidante formándose un color verde extemporáneo por la reducción del ion férrico con los cetoácidos. Como control positivo se utilizó una cepa de *P. mirabilis* proveniente de muestra clínica (MacFaddin, 2003).

3.5.4. Capacidad de adherencia celular de *C. pseudotuberculosis* y visualización de efectos citopáticos (ECP).

La capacidad de adherencia de *C. pseudotuberculosis* se evaluó “in vitro” por inoculación de la bacteria en cultivos celulares. Para ello se infectaron cultivos confluentes de líneas celulares MDBK (Madin Darb Bovine Kidney), facilitadas por el Laboratorio de Virología Clínica de EEA INTA Balcarce.

-Línea celular

Líneas celulares MDBK fueron propagadas en Medio Esencial Mínimo (MEM) (Eagle), con sales de Earle (MEM-E) (Sigma Chemicals, U.S.A.) y suplementado con suero fetal bovino (Internegocios) al 10 %, libre de virus y anticuerpos. Las células MDBK fueron provistas por ABAC (Argentinean Cell Bank, <http://www.abac.org.ar/>), libres de bacterias contaminantes, micoplasma y virus. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las mismas se desarrollaron en placas estériles de 24 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) a una concentración de 200000 células/ml, alrededor de 90 % de monocapa confluyente con 24 h de crecimiento.

-Preparación del inóculo

Colonias de los aislamientos a evaluar se resuspendieron en buffer fosfato pH 7 hasta una turbidez equivalente al 2 de la escala de McFarland; la turbidez se controló por espectrofotómetro (Spectrum sp-2100 UV) a 600 nm. La suspensión bacteriana se centrifugó 10 min a 2500-3000 rpm, se separó el sedimento para luego reconstituirlo con medio MEM (sin antibióticos) llevándolo nuevamente a la turbidez correspondiente.

-Inoculación

Cada pocillo se infectó con 500 µl de la suspensión de cada aislamiento por duplicado para cada tiempo y técnica a evaluar y se incluyeron células sin infectar como control negativo. Las células inoculadas se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO₂ durante 6, 24 y 72 h.

Se realizó un control de viabilidad y pureza del aislamiento, en placas agar sangre, transcurrido cada tiempo de incubación.

Las células del cultivo celular infectadas con *C. pseudotuberculosis* y los controles se lavaron tres veces con buffer fosfato estéril pH 7,0 y fijadas con metanol puro durante 20 min a 4 °C para la tinción de Giemsa y con glutaraldehído para microscopía electrónica de barrido, con el fin de observar las características de la adherencia y los efectos citopáticos provocados por la infección celular de la bacteria.

-Observación y semicuantificación de efectos citopáticos.

La adherencia y los ECP como lisis celular, vacuolización citoplasmática y alteración de la relación núcleo/citoplasma, se observaron mediante: 1-microscopía óptica por tinción con Giemsa y 2- microscopía electrónica de barrido. Estos efectos se expresaron en porcentaje y se determinaron a las 6, 24 y 72 h, comparando con células control que corresponden a células MDBK sin infectar.

1-Los frotis coloreados con Giemsa se observaron con microscopía óptica utilizando objetivo de 10 x y 40 x. Se observaron 100 campos y se determinó el porcentaje de lisis celular; vacuolización citoplasmática y alteración en la relación núcleo/citoplasma.

2-La microscopía electrónica de barrido se realizó en el laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP). El MEB utilizado fue marca Jeol JSM – 6460 LV (figura 12). Una vez deshidratadas las muestras se procedió a la metalización de las mismas (figura 13), con una capa de oro-paladio con observación al alto vacío según el protocolo detallado en la figura 14.

Interpretación: la determinación de la lisis celular se estimó por medición del desprendimiento de la monocapa. Se consideró alteración en la relación núcleo/citoplasma aquellas células que mostraron un citoplasma alargado (>0%); se interpretó como (0%), cuando no se detectó alteración del citoplasma de la célula. La vacuolización citoplasmática se interpretó como el promedio de células en 100 campos observados, que presentaron vacuolas en el citoplasma expresado en porcentaje (%) (Chiapparrone, M.L., comunicación personal, 3 de diciembre, 2018).

Se obtuvieron registros fotográficos para ambas microscopías.

Para analizar los resultados se aplicó estadística no paramétrica, mediante análisis de ji-cuadrado (χ^2) de Pearson y test exacto (procedimiento Fisher); se utilizó el programa *SISA table analysis*. Se comparó el efecto citopático de los aislamientos a distintos tiempos (6, 24, 72 h) (Agresti, 1992).

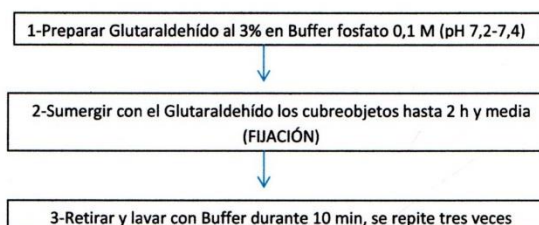
Figura 12: Microscopio electrónico de barrido (MEB)



Figura 13: Metalizadora



Figura 14: Protocolo para la preparación de la muestra para observación en MEB.



3.5.5. Desarrollo de biopelículas por *C. pseudotuberculosis*

Capacidad de *C. pseudotuberculosis* en la formación de biopelículas utilizando la técnica de microplaca.

Se preparó una suspensión al 1 de McFarland en solución fisiológica estéril. Un ml de esta suspensión se inoculó en caldo tripteína soya, se incubó a 37 °C, 24 h a 120 rpm en un agitador orbital. 200 µl de una dilución 1/10 del cultivo se sembró por triplicado en una placa de 8 pocillos estériles. Además se incluyó un control positivo (cepa control *S. aureus* ATCC 29213) y un control negativo (medio de cultivo sin inocular). Se incubó en estufa a 37 °C durante 48 h. Posteriormente se lavó, se fijó con metanol durante 20 minutos; se lavó y coloreó con cristal violeta al 0,1 % 20 min a temperatura ambiente. Se eluyó el colorante adherido a las biopelículas con alcohol etílico 95 % durante 15 min a 150 rpm y se determinaron las densidades ópticas (DO) mediante lector de Elisa a 570 nm. Las DO se

promediaron y se obtuvieron las desviaciones estándar (DE) (Cáceres *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2013; Villanueva Durand, 2015).

Interpretación y análisis de los resultados.

El punto de corte (DOC) y la clasificación de los aislamientos fueron definidos de acuerdo a las recomendaciones de Stepanovic' *et al.* (2004). El DOC está conformado por el promedio de las densidades ópticas (DO) obtenidas en los controles negativos más tres desviaciones estándar.

La capacidad de formación de biopelícula se clasificó en cuatro categorías en función de la DO₅₇₀ de cada aislamiento según la clasificación propuesta por Stepanovic' *et al.* (2004): no formadoras, formadoras débiles, formadoras moderadas y formadoras fuertes de biopelículas (tabla 3)

Tabla 3: Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislamientos mediante la tinción con cristal violeta.

DO ₅₇₀	Clasificación
$DO \leq DOC$	no formadora de biopelícula
$DOC < DO \leq 2 \times DOC$	formadora débil de biopelícula
$2 \times DOC < DO \leq 4 \times DOC$	formadora moderada de biopelícula
$4 \times DOC < DO$	formadora fuerte de biopelícula

Referencias: DO: densidad óptica, DOC: punto de corte

Para evaluar la asociación entre las variables se utilizó el método de las diferencias aplicando la prueba ANOVA, empleando el test de Student-Newman-Keuls como *prueba post-hoc*. Los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete informático INSTAT 2.02 y se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ (Pagano *et al.*, 2001).

3.6. Análisis multivariante

3.6.1. Métodos de interdependencia – datos métricos.

3.6.1.1. Análisis cluster.

Se llevaron a cabo dos análisis complementarios de agrupamiento y ordenación.

Para el primero de ellos se utilizó un índice de distancia euclidiana entre muestras, con transformación de raíz cuadrada de los datos. Las variables descriptivas fueron: animal, sitio de lesión y sensibilidad a amicacina. A continuación se aplicó el método Unweighted Pair

Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), que es un método de agrupamiento aglomerativo jerárquico (Legendre & Legendre, 1998; van Tongeren, 1995). El proceso de agrupamiento fue detenido cuando la distancia entre pasos sucesivos fue máxima, como fuera sugerido por Hair *et al.*, (1992).

3.6.1.2. Análisis de componentes principales

El método de ordenación se escogió, previo análisis del largo de gradiente, mediante un análisis de correspondencias (sin tendencias) (DCA). El largo de gradiente según el primero de los ejes fue de 0,949 y el largo de gradiente del segundo eje fue de 0,514. Según ter Braak, (1995) con gradientes de este orden corresponde utilizar un método lineal, como el análisis de componentes principales (PCA). Este método, además emplea distancia euclidiana como índice de base, produce gráficos donde los descriptores de cada muestra están señalados por flechas y los valores más altos corresponden a la punta de flecha. Para la interpretación se consideró que dos descriptores están relacionados positivamente entre sí, cuando las flechas respectivas forman un ángulo agudo. En tanto que ángulos rectos significan ausencia de correlación entre descriptores.

3.7. Sistemas de información geográfica (SIG)

3.7.1. Distribución espacial de aislamientos.

El programa utilizado fue arc gis 9.3 versión académica que forma parte de los SIG. Esta información fue suministrada por el gabinete SIG de la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales (FCH) de la UNPSJB.

Para este estudio se creó la cobertura de puntos y se diseñó la base de datos con los atributos correspondientes (nº aislamiento, sitio de lesión, lugar origen, latitud, longitud, departamento, provincia, país y sensibilidad antibiótica para amicacina).

Las coordenadas geográficas (latitud y longitud en grados, minutos y segundos) de cada uno de los lugares geográficos de donde provenían los aislamientos, se establecieron mediante el programa informático Google Earth.

3.7.2. Distribución por descripción.

Se ubicaron los puntos geográficamente de acuerdo a las variables analizadas.

3.7.3. Distribución espacial de grupos.

Se ubicaron los puntos geográficamente de acuerdo a los grupos de aislamientos resultantes, del análisis estadístico multivariado previo.

3.7.4. Distribución de aislamientos relacionados con la clasificación de climas según Köppen.

Se escaneó el mapa de climas según la clasificación de climas de Köppen (Strahler, 1989), se georreferenció el mismo, se integraron los datos, se diseñó la base de datos y se generaron mapas temáticos.

3.8. Aspectos bioéticos y normas de bioseguridad.

1-Resguardo del operario.

En todos los ensayos se aplicaron barreras de contención primaria y secundaria correspondiente al trabajo con microorganismo de nivel de riesgo 2, al que pertenece *C. pseudotuberculosis* (Manual de Bioseguridad en el laboratorio. OMS, 2005).

2-Resguardo de terceros.

Al respecto, en el desarrollo de la presente investigación, se aplicaron las normativas correspondientes al envío de muestras de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*. Este tipo de muestra bacteriológica se considera como sustancia infecciosa categoría A, según la Organización mundial de la Salud (OMS), es así que se siguieron los lineamientos que propone esta organización para sistema básico de embalaje/envasado, en el transporte de las muestras microbiológicas. Cuando un paquete de sustancias infecciosas se transporta entre el punto de origen, las unidades de transporte de carga, los almacenes y su destino, puede estar sujeto a desafíos, entre las que se incluyen son: el movimiento, las vibraciones, los cambios de temperatura, la humedad y la presión. Por lo tanto, es esencial que el embalaje/envasado utilizado para el envío de sustancias infecciosas sea de buena calidad y lo suficientemente resistente como para soportar los distintos problemas a los que se puede enfrentar. Por lo tanto, las sustancias infecciosas deben estar dentro de un sistema de embalaje/envasado de tres capas, en el que se puedan utilizar capas redundantes de embalaje/envasado y cantidades suficientes de material absorbente para controlar las fugas o las filtraciones de la contención (Guía-OMS, 2019-2020)

CAPÍTULO 4



RESULTADOS

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Identificación de *C. pseudotuberculosis*

4.1. 1. Características de los aislamientos analizados.

Los aislamientos estudiados procedentes de ovejas y cabras se agruparon según su origen en:

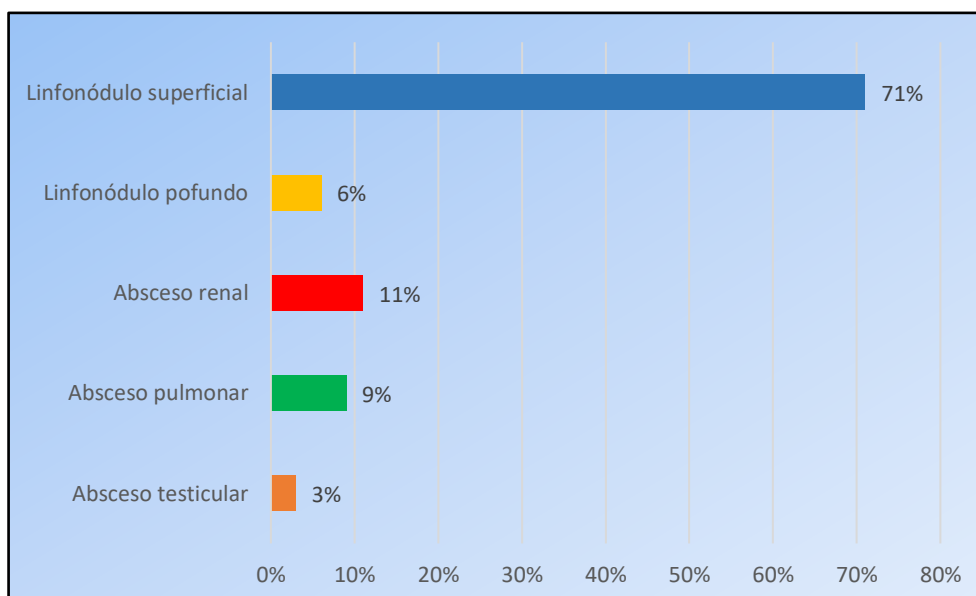
1-Argentina: 21 aislamientos de la Región Patagónica de las provincias de Tierra del Fuego (1), Santa Cruz (10), Chubut (8) y Río Negro (2), ovejas de razas Merino y Corriedale

2-Brasil: 14 aislamientos del estado de San Pablo-Aracatuba-Región noroeste paulista (8) y estado de Salvador de Bahía (6), ovejas de razas Suffolk, Santa Inês, Highlander, Dorper y sin raza definida – mestiza (Ile de France - Santa Inês). Las cabras eran sin raza definida, mestizas.

De un total de 35 aislamientos estudiados, el 80 % fueron procedentes de ovejas.

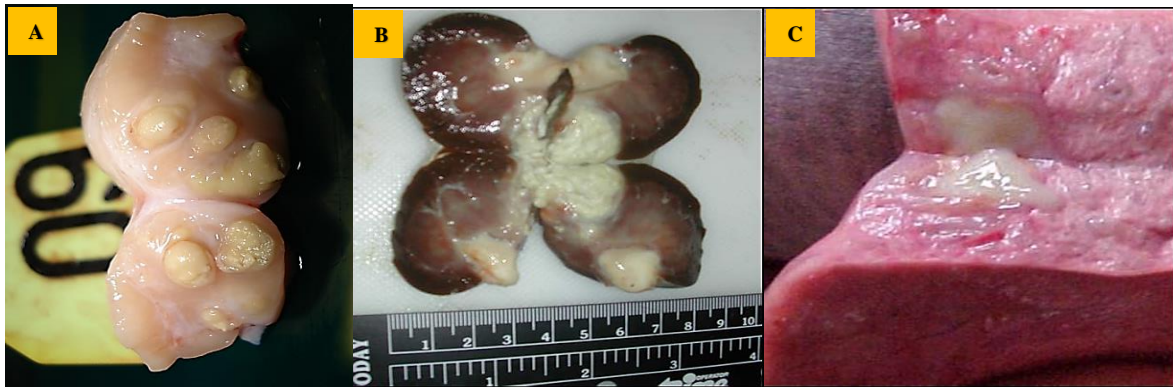
La distribución de aislamientos de acuerdo al sitio de lesión, se observa en la figura 15. Se consideraron al linfonódulo mediastínico como profundo y a los linfonódulos subilíaco (pre-cural), cervical superficial (pre-escapular) e inguinal superficial como superficiales.

Figura 15: Distribución de aislamientos de acuerdo a la procedencia del sitio de lesión.



En la figura 16 se observa la afección de linfonódulos y vísceras de los animales estudiados.

Figura 16: Aspecto macroscópico de los linfonódulos y vísceras afectadas.

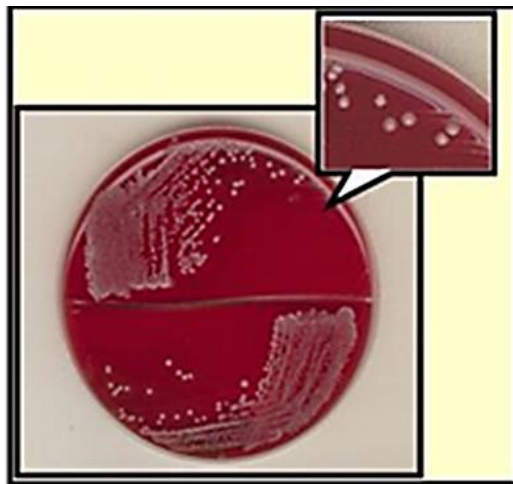


Referencias: A-linfonódulo; B-absceso renal, C-absceso pulmonar

4.1.2. Cultivo, caracterización de colonias y conservación de los aislamientos.

Los aislamientos desarrollaron en agar sangre de oveja 5 % como colonias de 1 mm de diámetro, de color blanco y de consistencia seca, rodeadas de un halo tenue de β hemólisis (figura 17).

Figura 17: Aislamiento de *C. pseudotuberculosis* en agar sangre.



Los aislamientos preservados como cultivos puros en CRYOBANK™, se recuperaron exitosamente.

4.2. Identificación

4.2.1. Morfología bacteriana

a- Coloración de Gram

La coloración de Gram confirmó que las colonias correspondían a cocobacilos positivos, algunos con disposición en empalizada, compatibles con corinebacterias (figura 18).

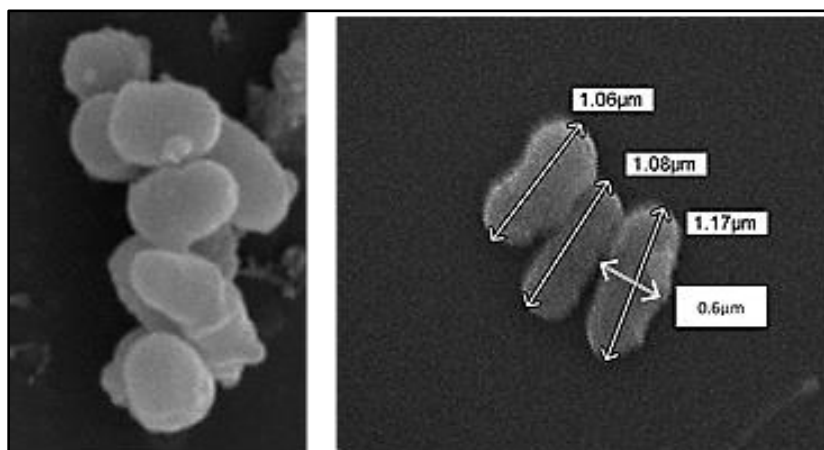
Figura 18: Tinción de Gram (1000 x)



b- Microscopia electrónica de barrido

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (figura 19) mostraron cocobacilos pleomórficos de 1,06 - 1,17 μm de largo por 0,6 μm de ancho y la distribución en empalizada de los cocobacilos así como también agrupados.

Figura 19: Microscopía electrónica de barrido de *C. pseudotuberculosis*



4.2.2. Bioquímica

En la identificación preliminar los 35 aislamientos fueron no lipofílicos, con metabolismo fermentativo; presentaron reacción positiva para las pruebas de catalasa, oxidasa; siendo negativos para la sensibilidad al 0/129, hidrólisis de gelatina a 22 °C, y reducción de nitratos. Se seleccionaron 15 aislamientos para ampliar el perfil bioquímico mediante el método comercial API® Coryne bioMérieux (figura 20).

Figura 20: Galería API Coryne. Sistema estandarizado para identificación de bacterias corineformes.



Los ensayos realizados con este método, presentaron reacción positiva para la producción de: ureasa, catalasa. Reacción variable para α glucosidasa (α GLU) y fosfatasa alcalina (PAL). Siendo negativos para la producción de: nitrato reductasa, pirazinamidas (PIZ), pirrolidonil arilamidas (PYRA), β -glucuronidasa (β GUR), β -galactosidasa (β GAL), N-acetil- β -glucosaminidasa (β NAG), hidrólisis de esculina y de gelatina a 37 °C

Con respecto a los azúcares, presentaron reacción positiva para la fermentación de glucosa y ribosa y reacción negativa la fermentación de lactosa, glicógeno, xilosa, manitol y sacarosa. La fermentación de maltosa fue variable (tabla 4).

Tabla 4: Distribución porcentual de los aislamientos estudiados en función de las características fenotípicas.

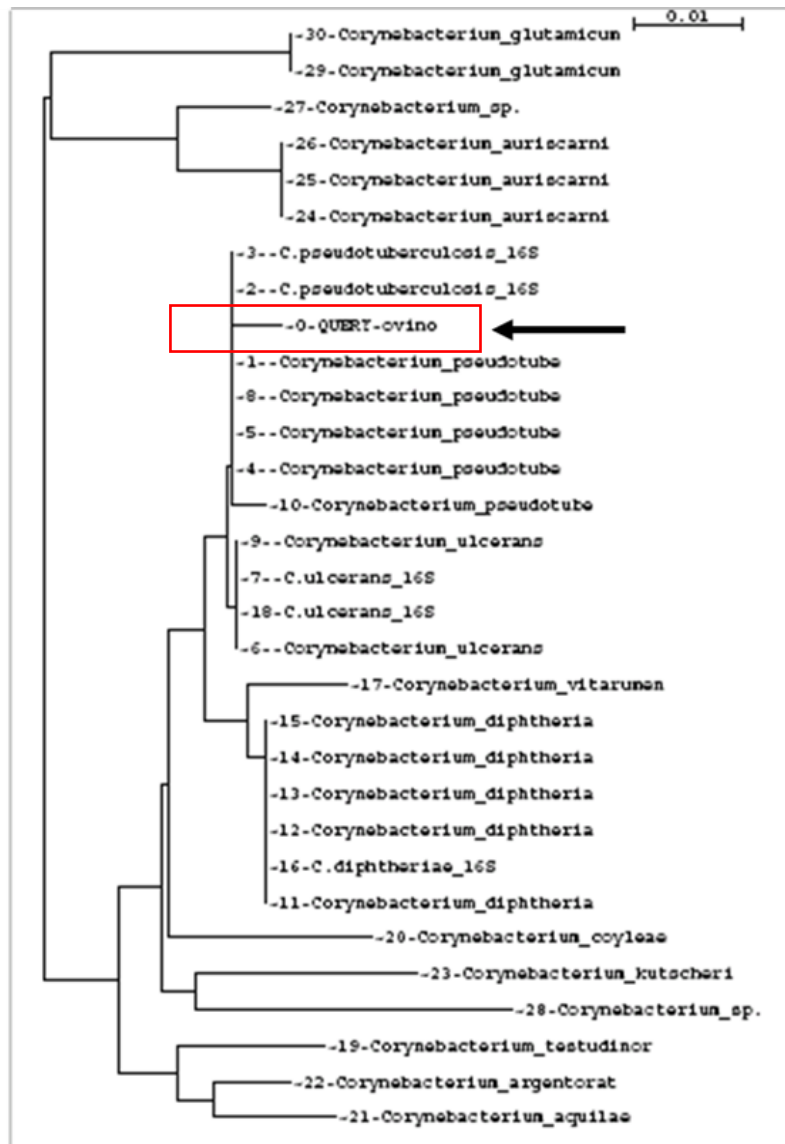
Aislamiento	ARGENTINA																					
	NIT	PYZ	PyrA	PAL	βGUR	βGAL	αGLU	βNAG	ESC	UREA	GEL (22 °C)	GEL (37 °C)	O/129	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG	CAT
10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
20	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
95	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
5807	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
6007	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
7506	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
K407	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
BRASIL																						
355	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
CRE	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
103	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
174	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
1002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Porcentaje de aislamientos positivos n=15	0	0	0	47	0	0	87	0	0	100	0	0	0	100	100	0	0	67	0	0	0	100

4.2.3. Caracterización genotípica

Se seleccionó uno de los aislamientos de Argentina (10) de las cepas y se identificó mediante la secuenciación del gen que codifica para el 16S ARNr, que es ampliamente utilizado para la taxonomía de bacterias por ser altamente conservado.

Se obtuvo una similitud del 99 % con las secuencias de referencia de *C. pseudotuberculosis* CIP 102968T y NCTC 3450, depositadas en el GenBank como se observa en la figura 21.

Figura 21: Árbol que muestra las distancias filogenéticas del aislamiento respecto a *C. pseudotuberculosis*.



En la tabla 5 se detallan los aislamientos de Argentina y Brasil confirmados mediante PCR y PCR múltiple de los genes 16S ARNr, *rpoB* y *pld*.

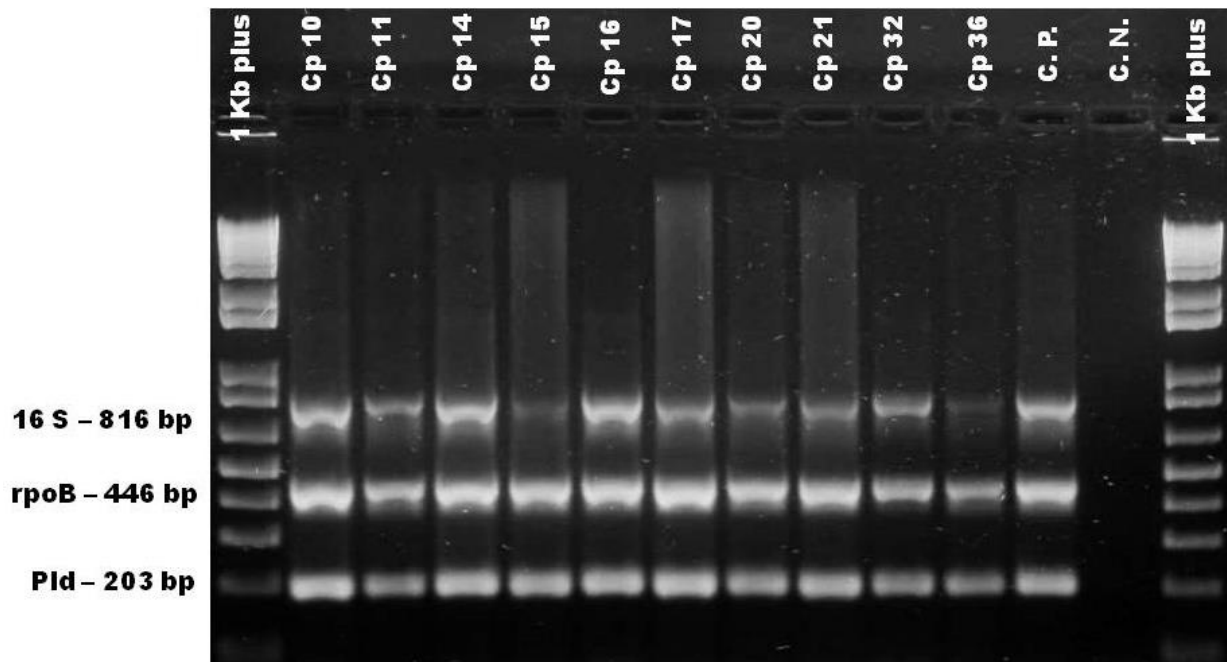
Tabla 5: Aislamientos confirmados por métodos moleculares

ARGENTINA		
AISLAMIENTO	PCR gen <i>pld</i>	PCR múltiple - <i>16S/ rpoB/ pld</i>)
Cp 10	+	+
Cp 11	+	+
Cp14	+	+
Cp15	+	+
Cp16	+	+
Cp17	+	+
Cp20	+	+
Cp21	+	+
Cp32	+	+
Cp36	+	+
BRASIL		
355 CRE	+	nd
103	+	+
106	+	+
174	+	nd
173	+	+
297	+	+
VD 40	+	+
VM 189	+	+
VD 52	+	+
VD 53	+	+
356	+	+
310	+	+
1002	+	+
Porcentaje de aislamientos positivos	100	100

Referencia: nd (no determinado)

La figura 22 muestra el gel de agarosa 1 % obtenido del ensayo PCR múltiple, en el mismo se observa los productos de PCR de los genes 16S ARNr, *rpoB* y *pld* correspondientes a aislamientos de la región patagónica.

Figura 22: PCR múltiple de aislamientos patagónicos



El número de acceso al Genbank de la cepa PAT 10 es: CP002924 (Soares *et al.* 2013).

4.3. Estudio de sensibilidad a antibióticos

4.3.1. Determinación de la sensibilidad antibiótica por métodos de difusión en agar

En la tabla 6, se expresan los rangos de diámetro de los halos de sensibilidad tanto para los antibióticos activos como no activos. Los resultados por este método mostraron que a excepción de amicacina y oxacilina que presentaron resultados variables, el resto de los antibióticos fueron activos frente al 100 % de los aislamientos.

Tabla 6: Diámetros de los halos de sensibilidad y porcentajes de antibióticos activos y no activos por el método de difusión en agar.

Antibiótico	Punto de corte CLSI	% no activos	Rango de diámetro ⁽¹⁾	% activos	Rango de diámetro ⁽²⁾
ARGENTINA n = 21					
Amicacina	$S \geq 17$	62	7-12	38	17-37
Amoxicilina- clavulánico	$S \geq 20$	0		100	25-40
Ampicilina	$S \geq 29$	0		100	32-49
Cefotaxima	$S \geq 23$	0		100	32-40
Cefoxitina	$S \geq 25$	0		100	25-32
Ciprofloxacina	$S \geq 21$	0		100	30-40
Cloranfenicol	$S \geq 18$	0		100	32-40
Eritromicina	$S \geq 23$	0		100	30-40
Estreptomina	$S \geq 9$	0		100	11-18
Gentamicina	$S \geq 15$	0		100	16-36
Imipenem	$S \geq 16$	0		100	20-30
Kanamicina	$S \geq 18$	0		100	26-40
Norfloxacina	$S \geq 17$	0		100	30-40
Oxacilina	$S \geq 18$	74	10-14	26	18-22
Penicilina	$S \geq 29$	0		100	38-40
Rifampicina	$S \geq 20$	0		100	36-40
Tetraciclina	$S \geq 19$	0		100	30-46
Trimetroprima- sulfametoxazol	$S \geq 16$	0		100	29-40
Vancomicina	$S \geq 15$	0		100	30-40
BRASIL n=14					
Amicacina	$S \geq 17$	50	8-14	43	18-24
Amoxicilina- clavulánico	$S \geq 20$	0		100	35-40
Ampicilina	$S \geq 29$	0		100	32-46
Cefotaxima	$S \geq 23$	0		100	30-40
Cefoxitina	$S \geq 25$	0		100	30-32
Ciprofloxacina	$S \geq 21$	0		100	30-40
Cloranfenicol	$S \geq 18$	0		100	20-40
Eritromicina	$S \geq 23$	0		100	30-40

Estreptomicina	$S \geq 9$	0	100	13-18
Gentamicina	$S \geq 15$	0	100	22-38
Imipenem	$S \geq 16$	0	100	25-36
Kanamicina	$S \geq 18$	0	100	30-40
Norfloxacin	$S \geq 17$	0	100	30-40
Oxacilina	$S \geq 18$	100	10-16	0
Penicilina	$S \geq 29$	0	100	38-40
Rifampicina	$S \geq 20$	0	100	36-40
Tetraciclina	$S \geq 19$	0	100	30-40
Trimetroprima-sulfametoxazol	$S \geq 16$	0	100	25-40
Vancomicina	$S \geq 15$	0	100	28-40

Referencias: (1)-Rango de diámetros registrados para los antibióticos no activos -
 (2)-Rango de diámetros registrados para los antibióticos activos.

En la tabla 7 se observa la distribución de los antibióticos no activos frente a *C. pseudotuberculosis* según el sitio de lesión.

Tabla 7: Distribución de antibióticos no activos según el tipo de lesión.

Antibiótico	Tipo de lesión				
	AP	AR	AT	LS	LP
Amicacina	1	2	-	-	1
Oxacilina	-	-	1	10	1
Amicacina-oxacilina	-	2	-	13	-

Referencias: AP: absceso pulmonar; AR: absceso renal; AT: absceso testicular;
 LS: linfonódulo superficial; LP: linfonódulo profundo.

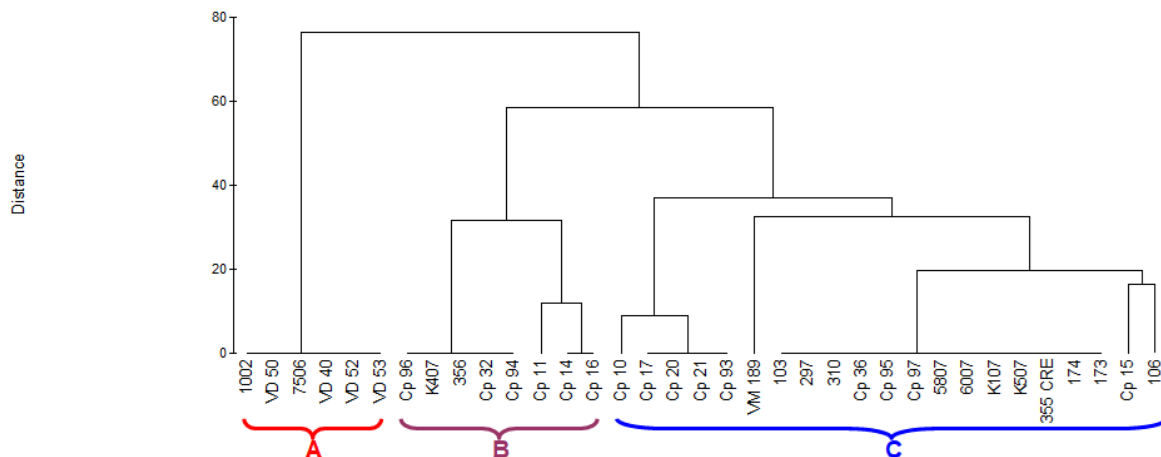
En lo que respecta a la especie animal, en la distribución de antibióticos no activos el mayor porcentaje (43 %) de aislamientos desarrollo frente a amicacina y oxacilina simultáneamente y fueron recuperados de ovejas (tabla 8).

Tabla 8: Distribución de antibióticos no activos frente a *C. pseudotuberculosis* según la especie animal.

Antibiótico	Animal	
	Oveja	Cabra
Amicacina	4	-
Oxacilina	6	6
Amicacina-oxacilina	15	1

Los resultados de la prueba de actividad antibiótica a amicacina y su relación con la especie animal se estudiaron a través de un análisis de agrupamiento y de ordenación. El análisis de agrupamiento mostró 3 grupos (figura 23). Los mismos se caracterizaron como; grupo A que incluyó aislamientos con 100 % de similitud procedentes de cabras y sin desarrollo frente a amicacina; el grupo B, aislamientos de ovejas y sin desarrollo frente a amicacina y grupo C, aislamientos de ovejas y cabras con desarrollo frente a amicacina.

Figura 23: Análisis de agrupamiento entre aislamientos

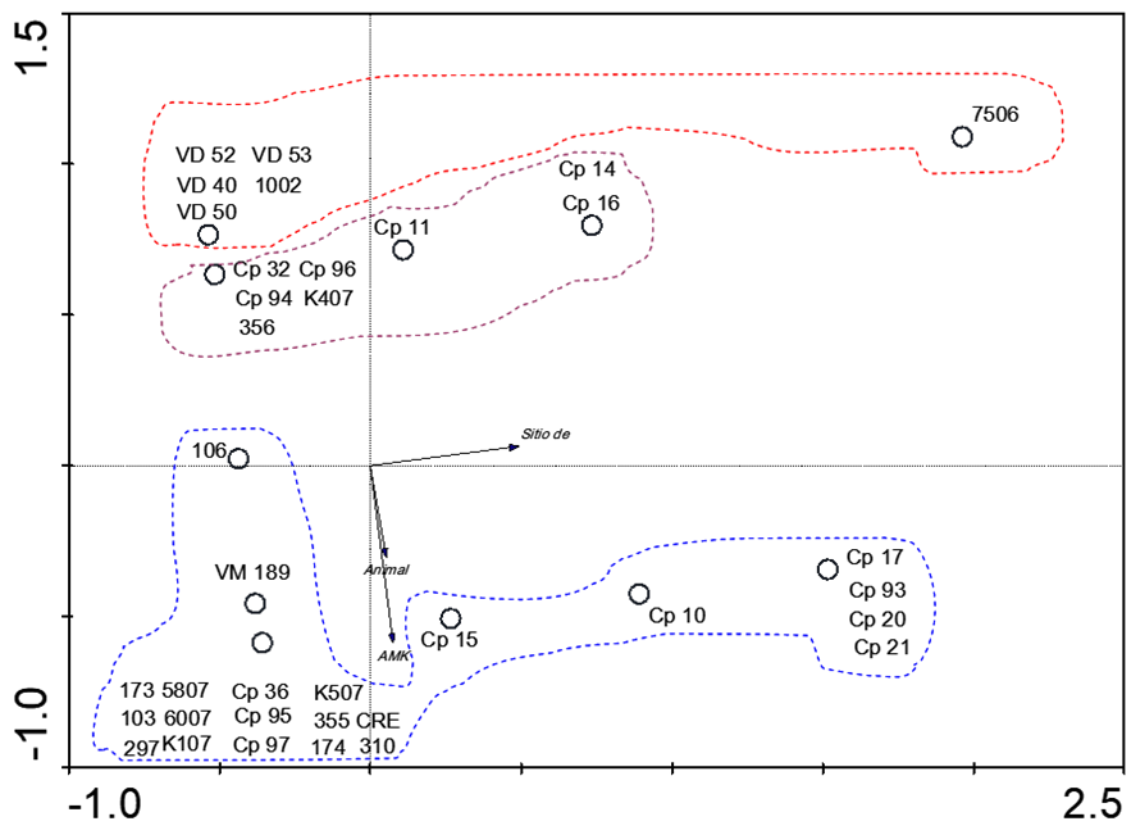


Con la finalidad de analizar la relación entre la especie animal, sitio de lesión y la actividad del antibiótico amicacina, se realizó un estudio de ordenación. Los resultados del análisis de componentes principales (ACP) se presentan en la tabla 9 donde los ejes primero y segundo explican el 86,8 % de la varianza de los datos de los aislamientos.

Tabla 9. Resumen de la ordenación con ACP.

Ejes	1	2	3	4	Varianza total
Valores propios	: 0.723	0.145	0.123	0.009	1.000
Porcentaje acumulado de la varianza de los datos de especie	: 72.3	86.8	99.1	100.0	
Suma de todos los valores propios					1.000

La ordenación, que se ilustra en el biplot de la figura 24, muestra la relación entre la especie animal y el antibiótico amicacina mientras que ambos descriptores no presentan relación con el sitio de lesión en el animal.

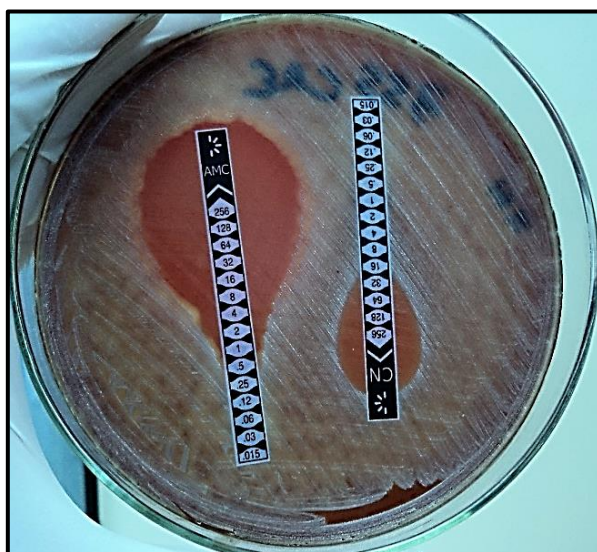
Figura 24: Representación biplot para la especie animal, antibiótico amicacina y sitio de lesión.

A partir de este análisis se seleccionaron 15 aislamientos representativos de cada grupo (A, B y C), que permitieron continuar profundizando los estudios sobre *C. pseudotuberculosis* acerca de su sensibilidad antibiótica y la caracterización de sus factores de virulencia.

4.3.2. Determinación de la sensibilidad antibiótica por métodos de dilución.

Para esta determinación se aplicó el método epsilométrico (figura 25).

Figura 25: Método epsilométrico para determinar la CIM.



El perfil de sensibilidad antibiótica por el método de dilución de los 15 aislamientos seleccionados, que surgieron del análisis de agrupamiento, se expresa en la tabla 10.

Tabla 10: Concentración inhibitoria mínima de 7 antibióticos

Antibiótico	<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar ovis (n=15)		
	Rango (µg/ml)	50 %	90 %
Cefotaxima	0,25 - 1	0,5	1
Ciprofloxacina	0,03 – 0,06	0,06	0,06
Eritromicina	<0,015 – 0,12	0,015	0,03
Gentamicina	0,06 - 8	4	8
Penicilina	0,03 – 0,5	0,06	0,25
Tetraciclina	0,06 – 0,5	0,12	0,25
Vancomicina	0,5 - 1	1	1

Cefotaxima, ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina y vancomicina fueron activos en el 100 % de los aislamientos. Considerando los valores de CIM₉₀, los compuestos más eficaces

fueron ciprofloxacina y eritromicina (0,06 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente, seguidos por tetraciclina, con valores menores o iguales a 0,25 $\mu\text{g/ml}$. El 90 % de los aislamientos fueron inhibidos por concentraciones ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ de cefotaxima y vancomicina. De acuerdo con los valores de CIM₉₀, los aislamientos mostraron sensibilidad intermedia para gentamicina y penicilina.

4.4. Estudio de mecanismos de resistencia.

4.4.1. Detección de integrones.

En los aislamientos que desarrollaron frente a aminoglucósidos y β -lactámicos, se investigó la presencia del gen de la integrasa *intI1* para integrones de clase 1. El resultado fue negativo.

4.5. Estudio de los factores de virulencia.

4.5.1. Ácidos micólicos.

Se trabajó con 15 aislamientos seleccionados a partir de los estudios de agrupamiento y ordenación. Los ensayos se desarrollaron a temperatura ambiente. En cada cromatograma se midió la distancia recorrida por la muestra y la distancia recorrida por el solvente y con ambos valores se calculó el R_f. Los valores de R_f obtenidos y el tipo de AM correspondiente se detallaron en tablas. Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de cada muestra con los estándares correspondientes debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa. Por lo tanto, cada cromatograma se consideró único e irrepetible.

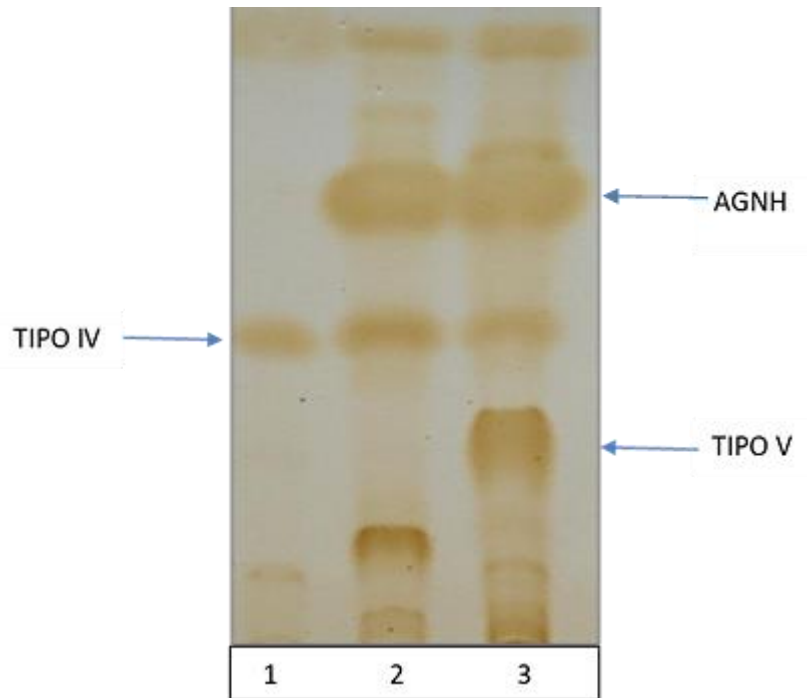
4.5.1.1. Técnica según Minnikin *et al.* (1975)

Se estableció como volumen de siembra 10 μl , debido a que se observó una mejor definición de las manchas. De acuerdo a Minnikin *et al.* (1975) y Goodfellow *et al.* (1976), se consideraron a los componentes con valores de R_f entre 0,1 y 0,5 como ésteres metílicos de AM y a aquellos con valores mayores a 0,6 como ésteres metílicos de ácidos grasos no hidroxilados.

A efectos de la presentación de los resultados, se muestra a modo de ejemplo un cromatograma con el solvente de desarrollo dietiléter/n-hexano (15:85) (v/v), dado que para todas las muestras se obtuvo el mismo perfil de corrida.

En la figura 26, se observa el cromatograma, correspondiente a los ésteres metílicos del aislamiento 1002, comparado con cepas estándar de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* (SIGMA).

Figura 26: Cromatograma desarrollado de acuerdo a la técnica de Minnikin *et al.* 1975.



Referencias: De izquierda a derecha: -Línea 1: Estándar *M. tuberculosis* (SIGMA);
 línea 2: Cp 1002; línea 3: *M. smegmatis*
 -AGNH: ácidos grasos no hidroxilados
 -Tipo I a VI: tipos de ácidos micólicos

En la tabla 11 se describen los Rf obtenidos y tipo de ácido micólico. Se observó que en los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* solamente se separó una mancha compatible con AM tipo IV.

Tabla 11: Valores de Rf de los ésteres metílicos de ácidos micólicos del cromatograma 1.

Especie	Tipos de ácidos micólicos (Rf)					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>M. tuberculosis</i> (SIGMA)	NV	-	NV	0,48	-	-
Cp 1002	-	-	-	0,48	-	-
<i>M. smegmatis</i>	NV	NV	-	-	0,29	-

Referencias: N.V: No visualizada

4.5.1.2. Técnica según Chiani *et al.* (1996) y Zerbini *et al.* (1996) con modificaciones.

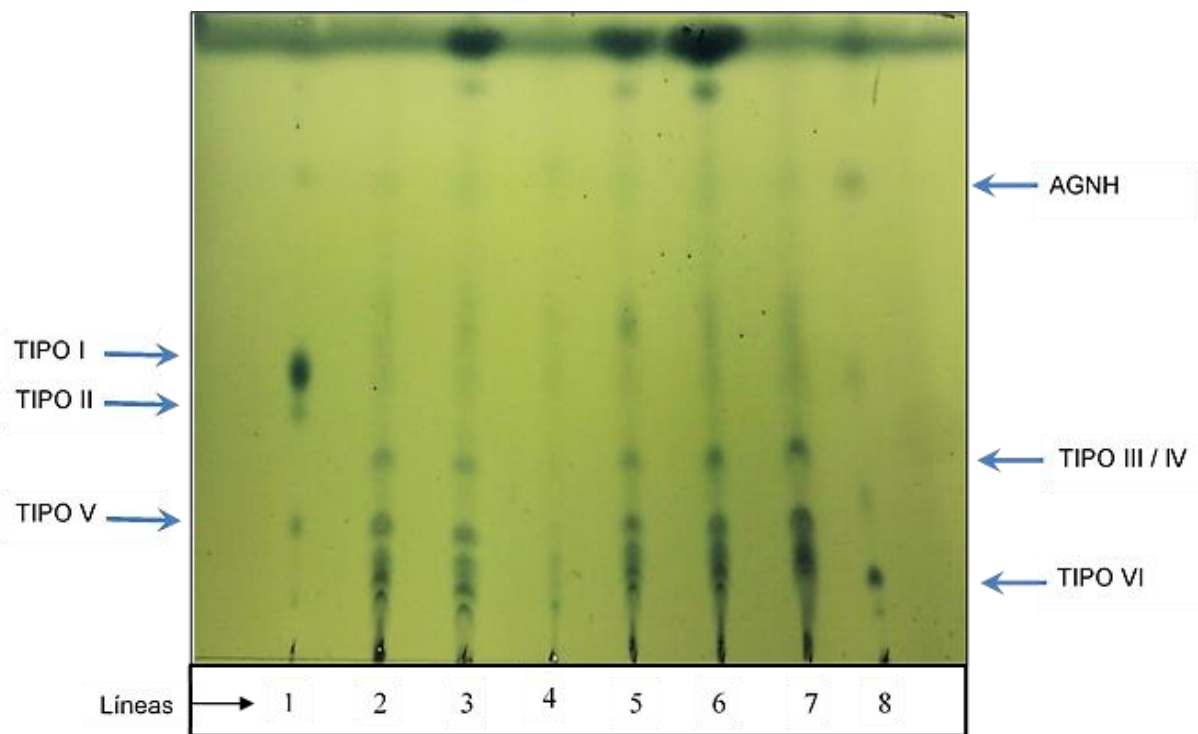
Se estableció como volumen de siembra 20 μ l, debido a que se observó una mejor definición de las manchas.

Las manchas con un Rf mayor o igual a 0,80 se consideraron ésteres metílicos de ácidos grasos no hidroxilados (AGNH) (Chiani *et al.*, 1996).

A continuación se presentan los cromatogramas y los resultados obtenidos con el solvente de desarrollo diclorometano. En este sistema de elución no se separan los AM tipo III y IV.

En la figura 27 se observa el cromatograma 1, correspondiente a los ésteres metílicos de los aislamientos Cp 355, Cp 5807, Cp 1002, Cp 20, Cp 103 comparados con cepas estándar de *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* (SIGMA) y *M. bovis* (BCG). *M. avium* subsp *paratuberculosis*.

Figura 27: Cromatograma 1.



Referencias: De izquierda a derecha: -Línea 1: *M. smegmatis*; línea 2: Cp 355; línea 3: Cp 5807; línea 4: Estándar *M. tuberculosis* (SIGMA); línea 5: Cp 1002; línea 6: Cp 20; línea 7: Cp 103 y línea 8: *M. avium* subsp *paratuberculosis*.

-AGNH: ácidos grasos no hidroxilados

-Tipo I a VI: tipos de ácidos micólicos

En la tabla 12 se describen los Rf obtenidos y tipo de ácido micólico. Se observó que las corinebacterias presentaron los AM tipo III/IV, V y VI.

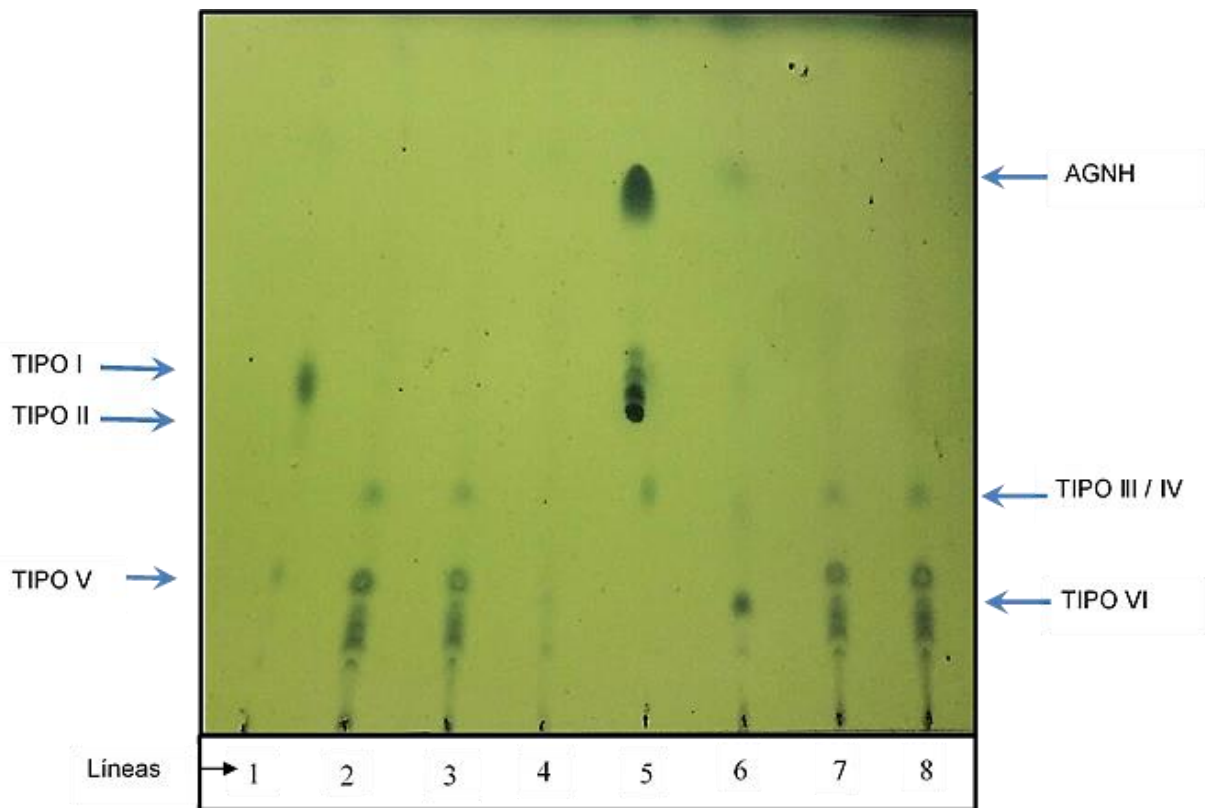
Tabla 12: Valores de Rf de los ésteres metílicos de ácidos micólicos del cromatograma 1.

Especie	Tipos de ácidos micólicos (Rf)				
	I	II	III/IV	V	VI
<i>M. smegmatis</i>	0,42	0,37	-	0,19	-
Cp 355	-	-	0,31	0,20	0,14
Cp 5807	-	-	0,31	0,18	0,14
<i>M. tuberculosis</i> (SIGMA)	0,42	-	0,31	-	-
Cp 1002	-	-	0,31	0,20	0,14
Cp 20	-	-	0,31	0,20	0,14
CP 103	-	-	0,31	0,22	0,14
<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	0,42	-	N.V.	-	0,14

Referencias: N.V: No visualizada

En la figura 28 se observa el cromatograma 2, correspondiente a los ésteres metílicos de los aislamientos Cp 14, Cp 6007, Cp 95 y Cp 7506 comparados con cepas estándar de *M. smegmatis*, *Rhodococcus equi*, *M bovis* (BCG) y *M. avium* subsp *paratuberculosis*.

Figura 28: Cromatograma 2



Referencias: De izquierda a derecha: -Línea 1: *M. smegmatis*; línea 2: Cp 14; línea 3: Cp 6007; línea 4: *Rhodococcus equi*; línea 5: *M. bovis* (BCG); líneas 6: *M. avium* subsp *paratuberculosis*; línea 7: Cp 95 y línea 8: Cp 7506.

-AGNH: ácidos grasos no hidroxilados

-Tipo I a VI: tipos de ácidos micólicos

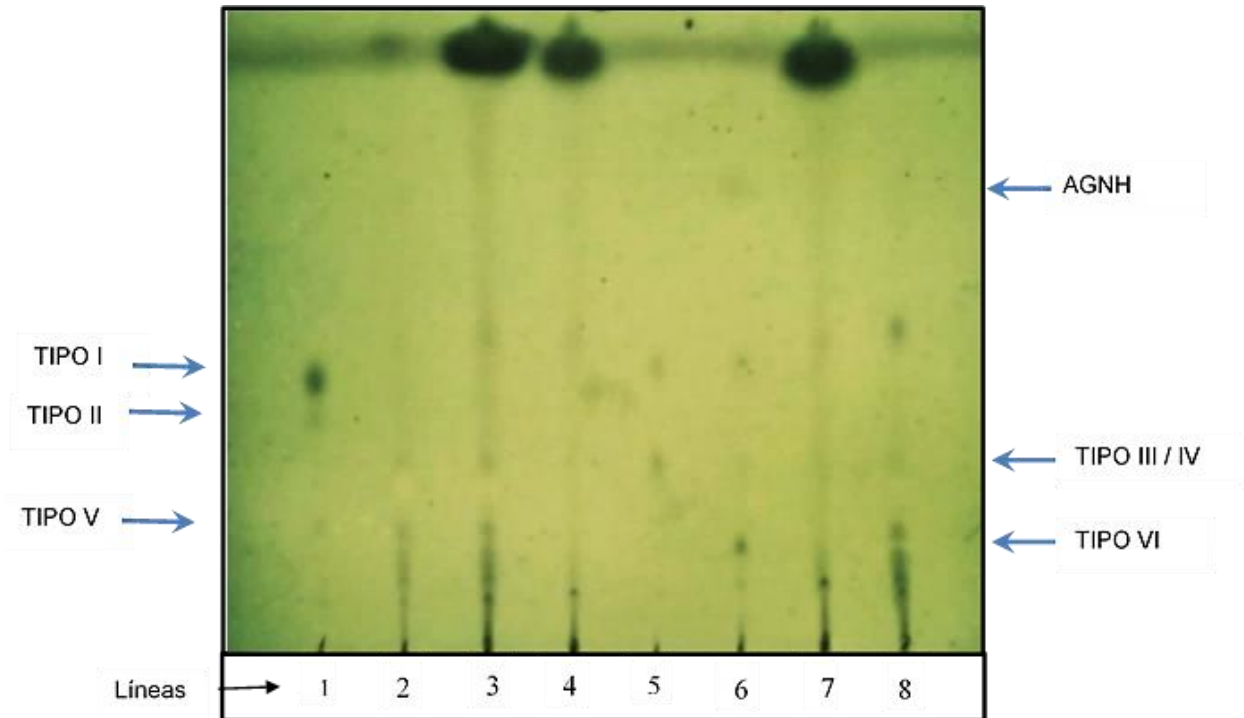
En la tabla 13 se describen los Rf obtenidos correspondientes a los AM tipo III/ IV, V y VI para las corinebacterias.

Tabla 13: Valores de Rf de los diferentes esteres metílicos de ácidos micólicos del cromatograma 2.

Especie	Tipos de ácidos micólicos (Rf)				
	I	II	III/IV	V	VI
<i>M. smegmatis</i>	0,41	0,35	-	0,18	-
Cp 14	-	-	0,28	0,18	0,13
Cp 6007	-	-	0,27	0,18	0,14
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	-	-	-
Cp 95	-	-	0,28	0,18	0,14
Cp 7506	-	-	0,28	0,18	0,14
<i>M. bovis</i>	0,40	-	0,28	-	-
<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	0,42	-	0,29	-	0,14

En la figura 29 se presenta el cromatograma 3 correspondiente a los aislamientos Cp 10, Cp 15, Cp 93 comparados con cepas estándar de *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* (SIGMA), *M. bovis* (BCG), *M. avium* subsp *paratuberculosis*.

Figura 29: Cromatograma 3.



Referencias: De izquierda a derecha: -Línea 1: *M. smegmatis*; línea 2: Cp 10; línea 3: Cp 15; línea 4: *M. tuberculosis* (SIGMA); línea 5: *M. bovis* (BCG); líneas 6: *M. avium* subsp *paratuberculosis*, línea 7: *M. tuberculosis* (SIGMA) y línea 8: Cp 93
 -AGNH: ácidos grasos no hidroxilados
 -Tipo I a VI: tipos de ácidos micólicos

Los Rf obtenidos se compararon con los estándares observándose la presencia de AM tipo III/IV, V y VI. En el caso de *M. tuberculosis* (SIGMA), no se visualizaron las manchas correspondientes al estándar (tabla 14).

Tabla 14: Valores de Rf de los diferentes esteres metílicos de ácidos micólicos del cromatograma 3.

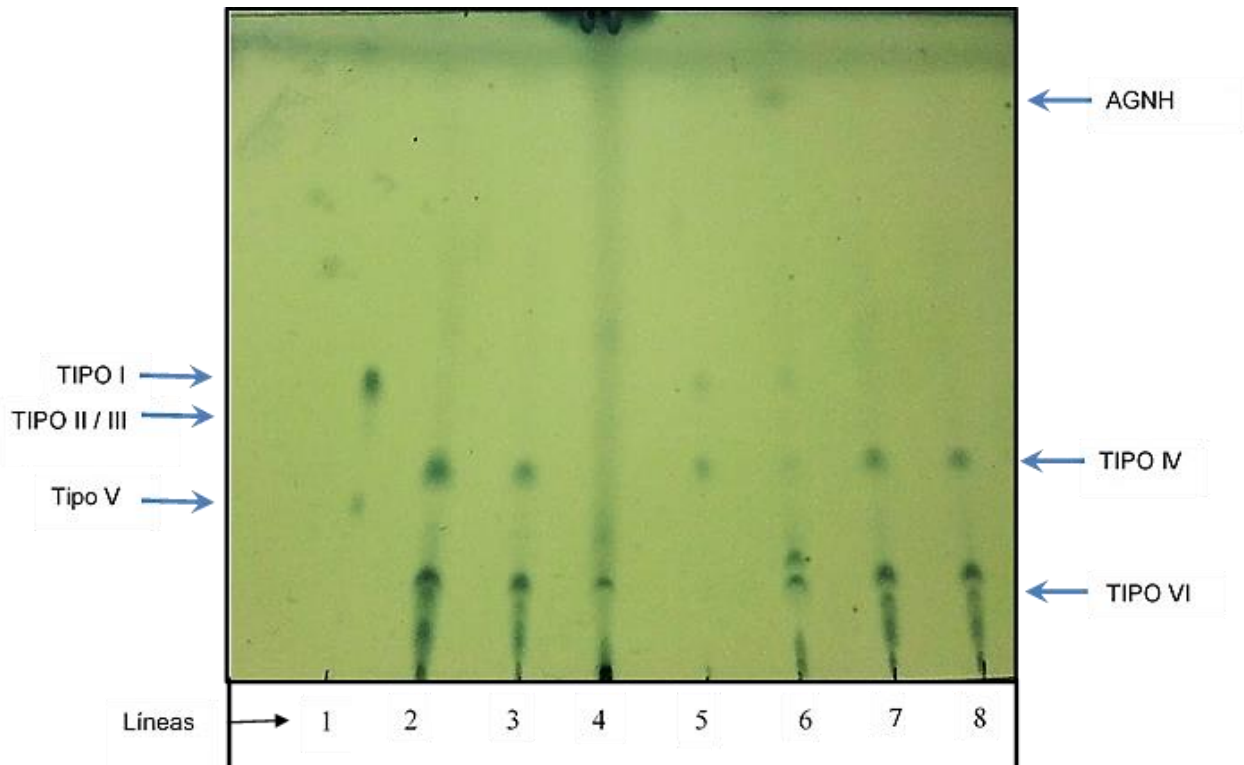
Especie	Tipos de ácidos micólicos (Rf)				
	I	II	III/IV	V	VI
<i>M smegmatis</i>	0,41	0,35	-	0,20	-
Cp 10	-	-	0,29	0,18	0,15
Cp 15	-	-	0,29	0,19	0,15
Cp 93	-	-	0,28	0,18	0,15
<i>M bovis</i>	0,41	-	0,28	-	-
<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	0,42	-	N.V.*	-	0,16
<i>M tuberculosis</i> (SIGMA)	N.V.*	-	N.V.*	-	-

Referencia: N.V: No visualizada

A continuación se presentan los cromatogramas y los resultados obtenidos con el **solvente de desarrollo dietiléter/n-hexano (15:85) (v/v)**. En este sistema de elución no se separan los AM **tipo II y III**.

En la figura 30 se observa el cromatograma 4 en el que se analizan los ésteres metílicos de los aislamientos Cp 103, Cp 6007, Cp 14, Cp 95 comparados con cepas estándar de *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* (SIGMA) y *M. bovis* (BCG), *M. avium* subsp *paratuberculosis*.

Figura 30: Cromatograma 4



Referencias. De izquierda a derecha: -Línea 1: *M. smegmatis*; línea 2: Cp 103; línea 3: Cp 14; línea 4: *M. tuberculosis* (SIGMA); línea 5: *M. bovis* (BCG); línea 6: *M. avium* subsp *paratuberculosis*; línea 7: Cp 6007 y línea 8: Cp 95.
 -AGNH: ácidos grasos no hidroxilados
 -Tipo I a VI: tipos de ácidos micólicos

Los Rf obtenidos y tipo de ácido micólico, se describen en la tabla 15. Las corinebacterias presentaron los AM tipo IV y VI, en esta corrida no se visualizó la mancha correspondiente al AM tipo V que se observó en cromatogramas anteriores en los aislamientos de corinebacterias. En el caso de *M. tuberculosis* (SIGMA), no se visualizaron las manchas correspondientes al estándar y en el caso de *M. bovis* no se visualizó la mancha correspondiente al AM tipo III.

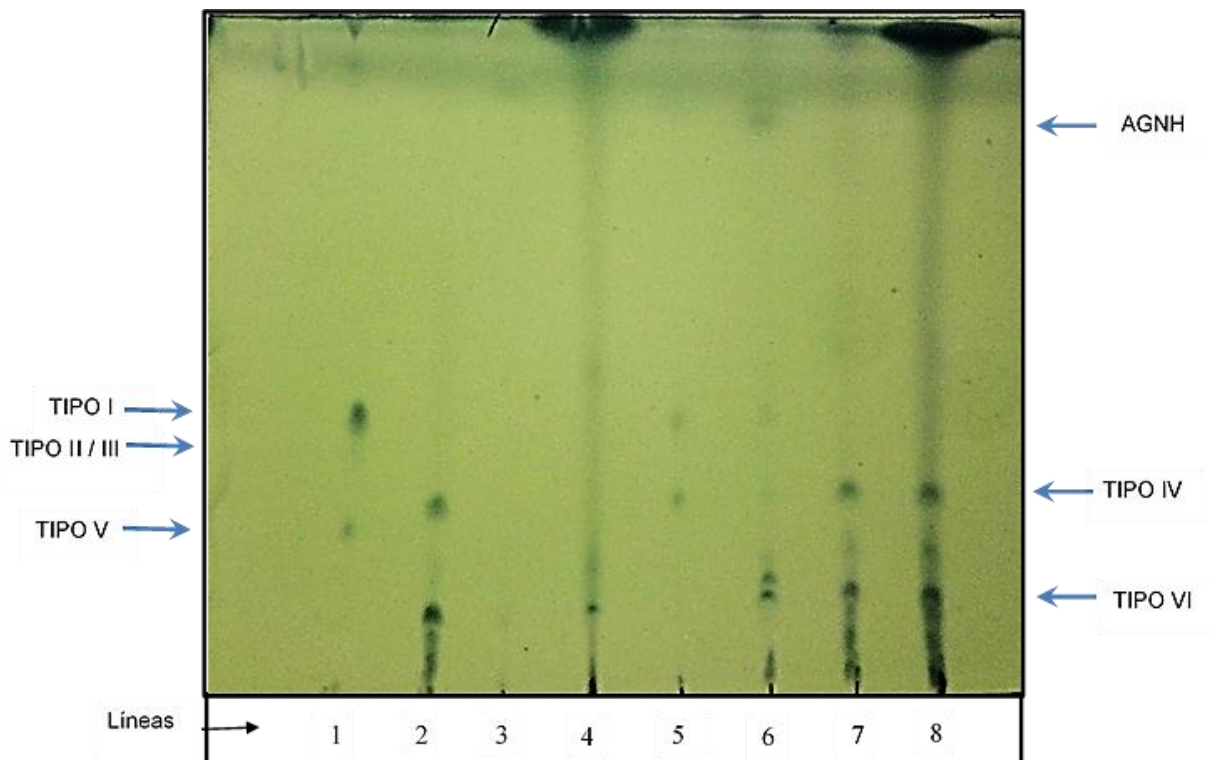
Tabla 15: Valores de Rf de ésteres metílicos de ácidos micólicos del cromatograma 4.

Especie	Tipos de ácidos micólicos (Rf)					
	I	II/III	IV	V	VI	
<i>M. smegmatis</i>	0,41	0,36	-	(0,24)	-	
Cp 103	-	-	0,27	N.V.	0,15	
Cp 14	-	-	0,29	N.V.	0,14	
<i>M. tuberculosis</i> (SIGMA)	N.V.	N.V.	N.V.	-	-	
Cp 6007			0,29	N.V.	0,14	
Cp 95			0,29	N.V.	0,14	
<i>M. bovis</i>	0,40	N.V.	0,30	-	-	
<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	0,41	-	0,30	-	0,14	

Referencias: N.V.: No visualizada

En el cromatograma 5, se observan a los ésteres metílicos de los aislamientos Cp 7506, Cp 10 y Cp 15 comparados con cepas estándar de *M. smegmatis*, *R. equi*, *M. tuberculosis* (SIGMA), *M. bovis* (BCG), *M. avium* subsp *paratuberculosis* (figura 31)

Figura 31: Cromatograma 5



Referencias: De izquierda a derecha: -Línea 1: *M. smegmatis*; línea 2: Cp 7506; línea 3: *Rhodococcus*; Línea 4: *M. tuberculosis* (SIGMA); línea 5: *M. bovis* (BCG); líneas 6: *M. avium* subsp *paratuberculosis*; línea 7: Cp 10 y línea 8: Cp 15.

-AGNH: ácidos grasos no hidroxilados

-Tipo I a VI: tipos de ácidos micólicos

De acuerdo a los Rf obtenidos *C. pseudotuberculosis* presentó los AM tipo IV, V y VI, a excepción del aislamiento Cp 7506 que no se visualizó la mancha correspondiente al AM tipo V. En el caso de *M. tuberculosis* (SIGMA) y *M. bovis* no se observaron las manchas correspondientes al estándar y la mancha correspondiente al AM tipo III, respectivamente (tabla 16).

Tabla 16: Valores de Rf de los ésteres metílicos de ácidos micólicos del cromatograma 5.

Especie	Tipos de ácidos micólicos (Rf)				
	I	II/III	IV	V	VI
<i>M smegmatis</i>	0,41	0,35	-	0,24	-
Cp 7506	-	-	0,27	N.V.	0,12
<i>R equi</i>	-	-	-	-	-
<i>M tuberculosis</i> (SIGMA)	N.V.	N.V.	N.V.	-	-
Cp 10	-	-	0,29	0,21	0,14
Cp 15	-	-	0,29	0,21	0,14
<i>M bovis</i>	0,39	NV	0,27	-	-
<i>M.avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	0,39	-	0,27	-	0,14

Referencias: N.V.: No visualizada

Con los resultados de los cromatogramas desarrollados con ambos solventes se construyó la tabla 17, en la que se comparan los ésteres metílicos de AM que se revelaron.

Tabla 17: Tipos de ácidos micólicos hallados en aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de pequeños rumiantes de Argentina y Brasil.

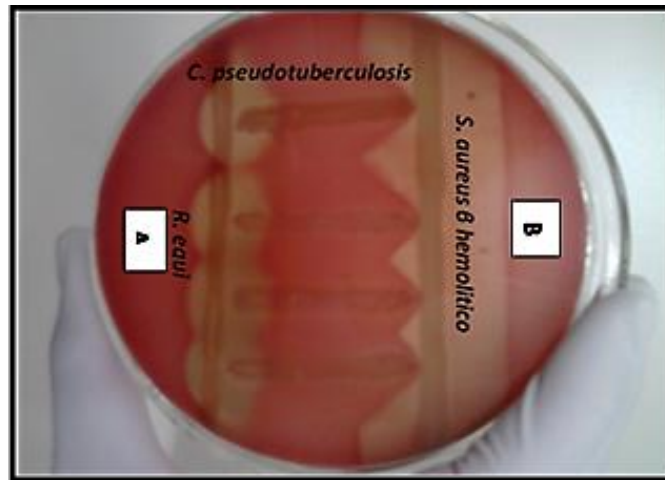
Aislamiento	ÁCIDOS MICÓLICOS					
	I	II	III	IV	V	VI
ARGENTINA						
10	-	-	-	+	+	+
14	-	-	-	+	+	+
15	-	-	-	+	+	+
17	-	-	-	-	+	+
20	-	-	-	+	+	+
93	-	-	-	+	+	+
95	-	-	-	+	+	+
5807	-	-	-	+	+	+
6007	-	-	-	+	-	+
K407	-	-	-	+	-	+
7506	-	-	-	+	+	+
BRASIL						
355 CRE	-	-	-	+	+	+
103	-	-	-	+	+	+
174				+	-	+
1002	-	-	-	+	+	+

4.5.2. Exotoxina: Fosfolipasa D (FLD)

4.5.2.1. Método de screening

La expresión fenotípica del gen *pld*, se confirmó mediante las pruebas de CAMP y CAMP reversa (figura 32).

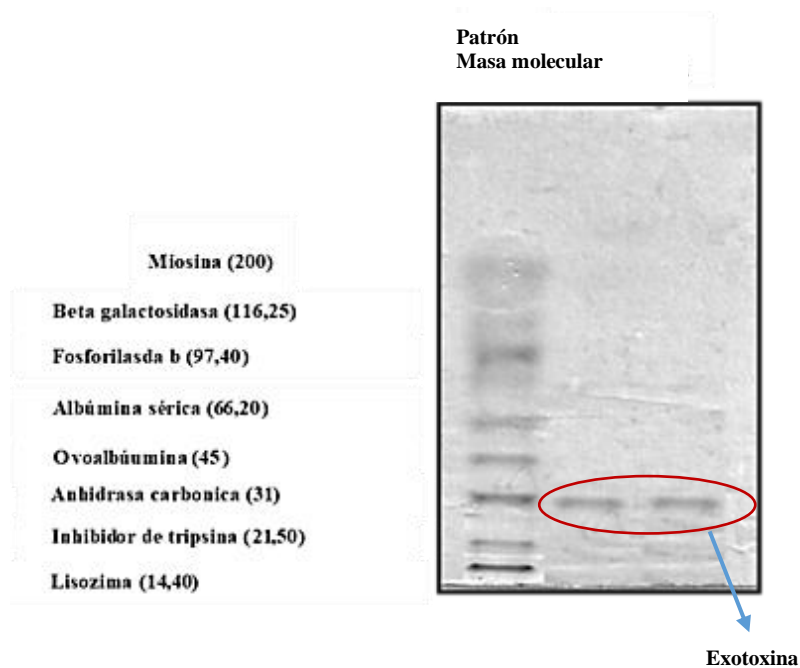
Figura 32: A- Prueba de CAMP (+) – B- Prueba de CAMP inversa (+)



4.5.2.2. Obtención y caracterización preliminar de la exotoxina

Por otra parte se determinó la masa molecular aparente de la exotoxina mediante la técnica de SDS-PAGE. Se observó una única banda de proteína. La misma se comparó con proteínas de masa molecular conocida y se estimó en 29,55 kDa (figura 33).

Figura 33: Determinación de la masa molecular aparente de la exotoxina de *C. pseudotuberculosis*.



4.5.3.-Enzimas

La tabla 18, muestra la frecuencia de detección de las diferentes enzimas extracelulares de los aislamientos ensayados de *C. pseudotuberculosis*.

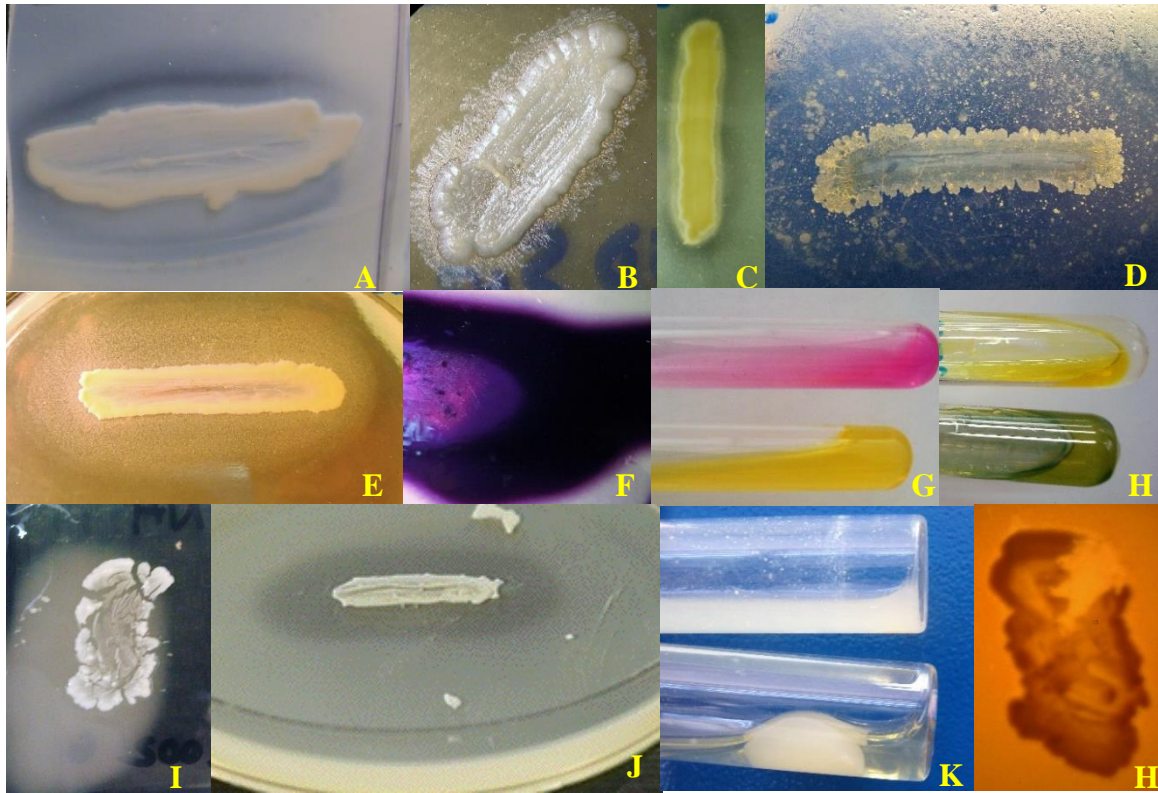
Tabla 18: Distribución porcentual de los aislamientos en función de la actividad enzimática

Sustrato	Peróxido de Hidrogeno	Caseína	Yema de huevo	T80	Aceite de Oliva	Gelatina	Almidón	Urea	Fenil alanina	ADN	Plasma	Sangre humana	Sangre oveja	Sangre caballo		
	Actividad – Enzimas extracelulares (EEC)															
Aislamiento	catalasa	Caseinasa	Lecitinasa	Actividad lipasa	Actividad proteolítica	Carboxilesterasa	Lipasa verdadera	Gelatinasa	Amilasa	Ureasa	Fenilalanina deaminasa	ADNasa	Coagulasa	Hemolisinas		
ARGENTINA																
10	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
11	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
14	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
15	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
16	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
17	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
20	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
21	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
32	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
36	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
93	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
94	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
95	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
96	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
97	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
5807	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
6007	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
K107	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
K407	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-

K507	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
7506	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
BRASIL																
355 CRE	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
103	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
106	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
173	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
174	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
297	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
310	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
356	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VD40	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VD50	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VD52	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
VD53	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VM89	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
1002	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Porcentaje de aislamientos positivos n=15	100	48	0	100	100	100	0	0*	100	100	0	0	0	97	100	0

Referencias: (*): Corresponde a determinación a 4 °C y a 37 °C.

En la figura 34 se exponen imágenes representativas del perfil enzimático obtenido.

Figura 34: Imágenes observadas en la lectura de los resultados de las pruebas realizadas

Referencias: A) Prueba de caseinasa positiva para *C. pseudotuberculosis* biovar ovis; B) y C) Agar yema de huevo, en (B) se observa “capa perlada” una película iridiscente dentro e inmediatamente alrededor de las colonias, visible por reflejo de la luz (actividad lipasa) y en (C) zona clara que rodea las colonias (actividad proteolítica); D) Medio base con aceite de oliva, zona clara alrededor de la colonia control cepa *S. aureus* ATCC 29213, en *C. pseudotuberculosis* biovar ovis no se observa; E) Prueba T80, se observa la precipitación de los ácidos grasos; F) Reacción débilmente positiva para la producción de amilasa G) Hidrólisis de la urea, reacción positiva para *C. pseudotuberculosis* biovar ovis; H) Ausencia de fenilalaninadesaminasa, reacción positiva para control; I y J) Estudio de la hidrólisis enzimática del ADN, reacción negativa para *C. pseudotuberculosis*; reacción positiva para cepa *S. aureus* ATCC 29213, K) Ausencia de la enzima coagulasa en *C. pseudotuberculosis* biovar ovis y L) Actividad hemolítica en agar sangre, con sangre de oveja.

4.5.4. Capacidad de adherencia de *C. pseudotuberculosis* y visualización de ECP.

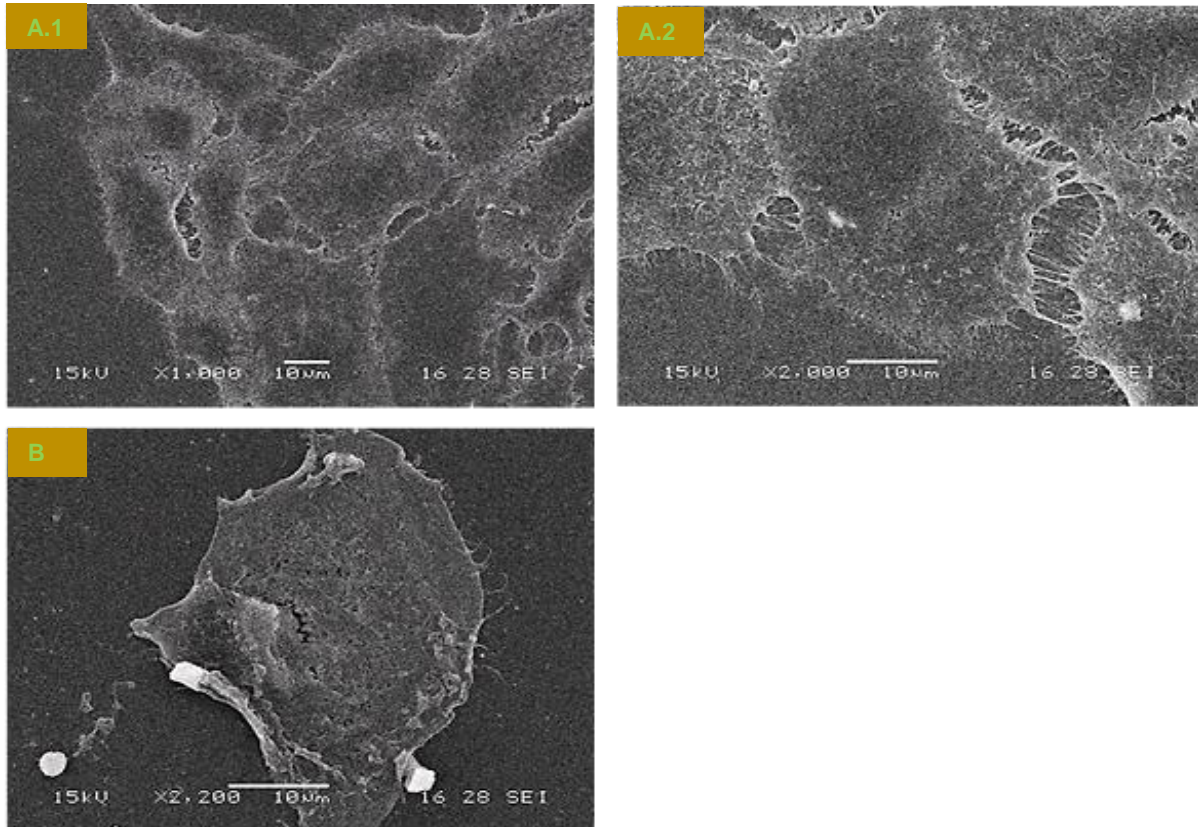
Las células MDBK (Madin Darb Bovine Kidney), de epitelio riñón de bovino adulto fueron elegidas para infectar el cultivo celular con *C. pseudotuberculosis* de manera de evaluar la adherencia y los ECP.

-Capacidad de adherencia

Para analizar el primer paso de interacción entre la bacteria y la célula huésped, en células MDBK, infectadas con *C. pseudotuberculosis*, se examinó a nivel de ultraestructura mediante microscopía electrónica de barrido, para entender el mecanismo de unión, colonización e internalización de la bacteria.

En la figura 35, se observan las células control que corresponden a las células MDBK sin infectar.

Figura 35: A.1-A.2: control células 24 h, B: control células 72 h

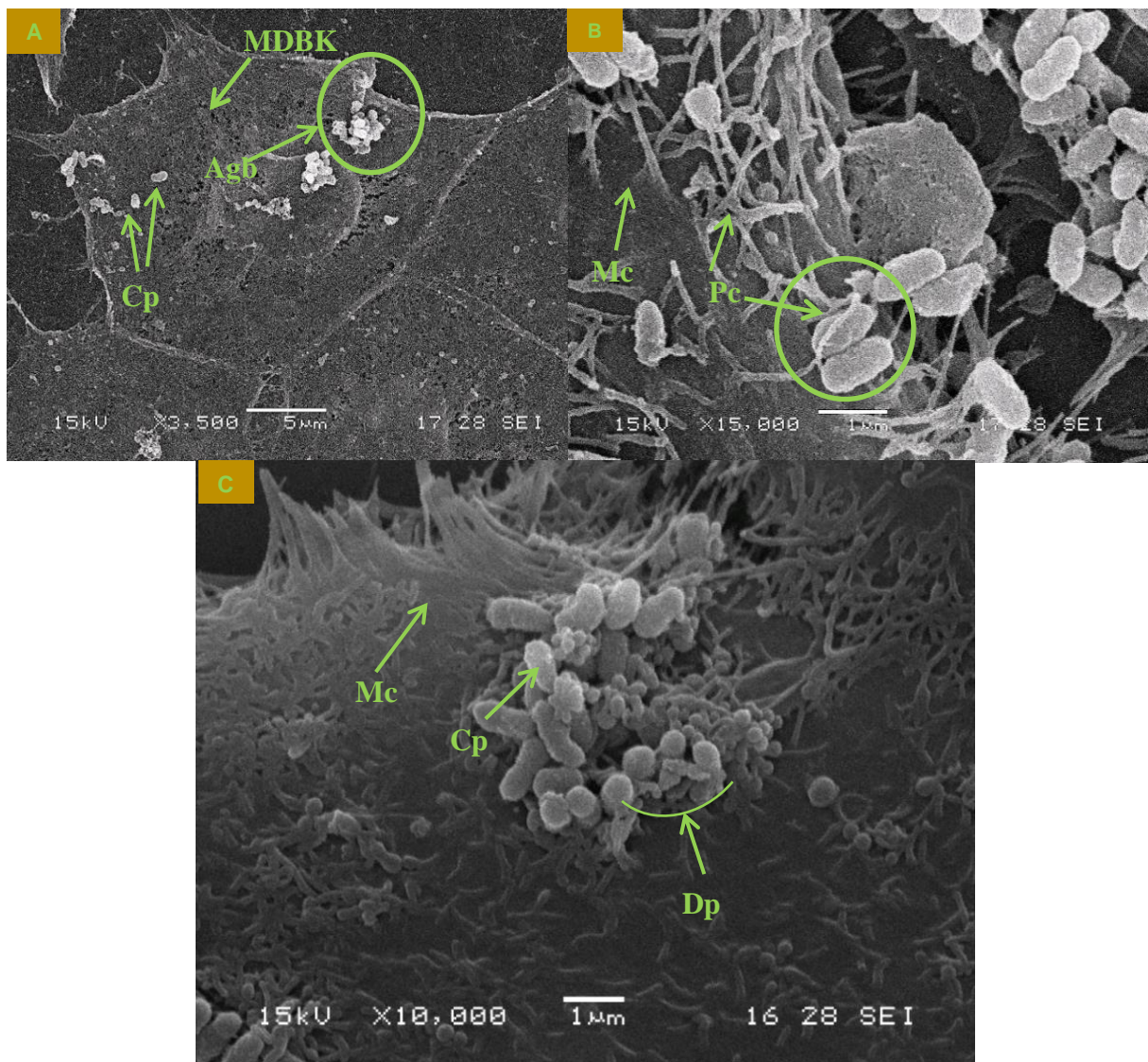


C. pseudotuberculosis (Cp) colonizó las células MDBK en grupos de agregados bacterianos (Agb) que forman estructuras en forma de racimos de uva en la superficie de la célula (figura 36 A).

La adhesión de la bacteria estaría mediada por proyecciones celulares (Pc) que se forman en la superficie de la célula MDBK, en el sitio de unión de la bacteria. Estas proyecciones se alargan y extienden sobre el largo de la bacteria antes de envolverse alrededor de la misma (figura 36 B).

La interacción entre *C. pseudotuberculosis* y las proyecciones de la célula huésped comprometen a la membrana celular local, que se adhiere firmemente a las bacterias que colonizan.

Las bacterias son internalizadas a través de estructuras similares a depresiones (Dp) en la membrana celular (Mc) de las células MDBK (figura 36 C).

Figura 36: Microscopía electrónica de barrido de células MDBK a las 6 h post infección.

En las figuras 37 a 43 se puede observar la interacción de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* con las células MDBK a los distintos tiempos de exposición (24 h y 72 h).

Figura 37: Microscopía electrónica de barrido de células MDBK a las 24 h post infección por aislamiento 7506.

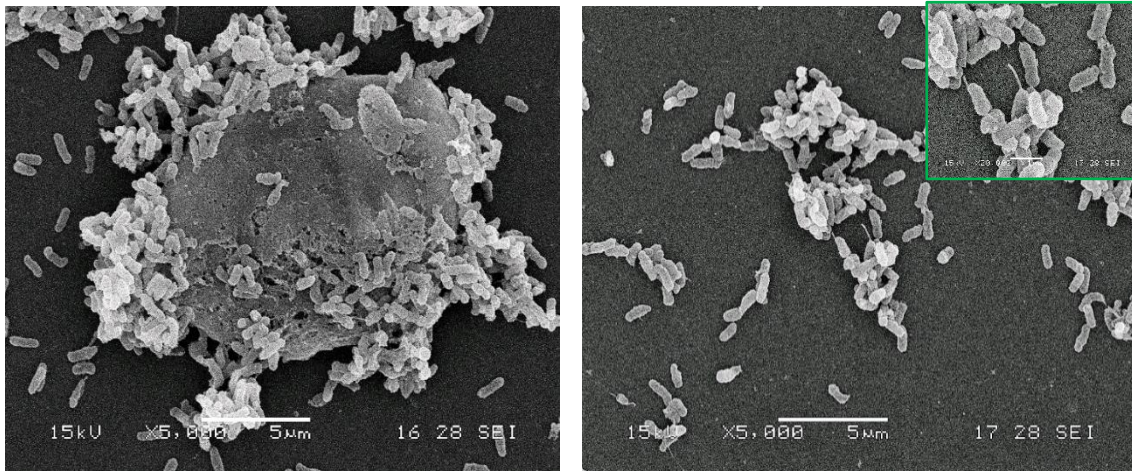


Figura 38: Microscopía electrónica de barrido de células MDBK a las 72 h post infección por aislamiento 7506.

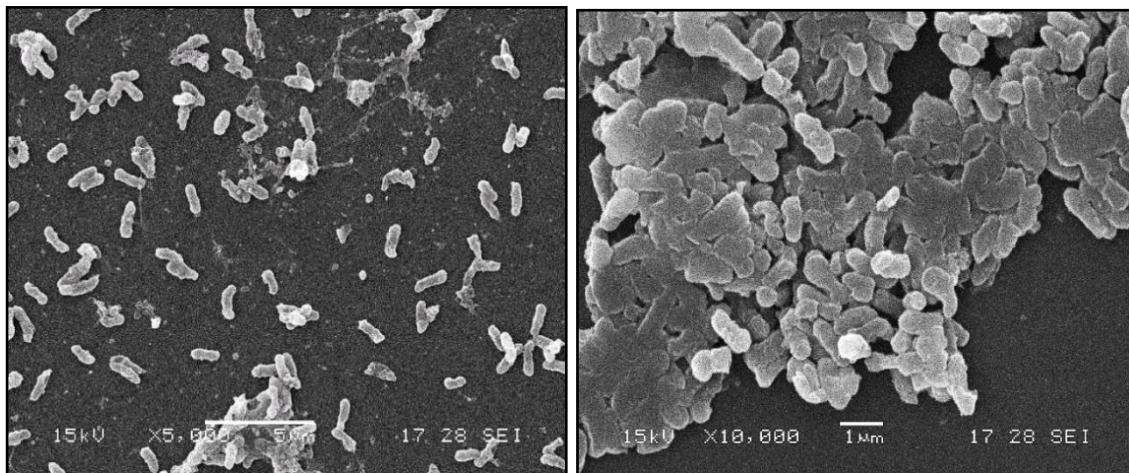


Figura 39: Microscopía electrónica de barrido de células MDBK a las 24 h post infección por aislamiento 10.

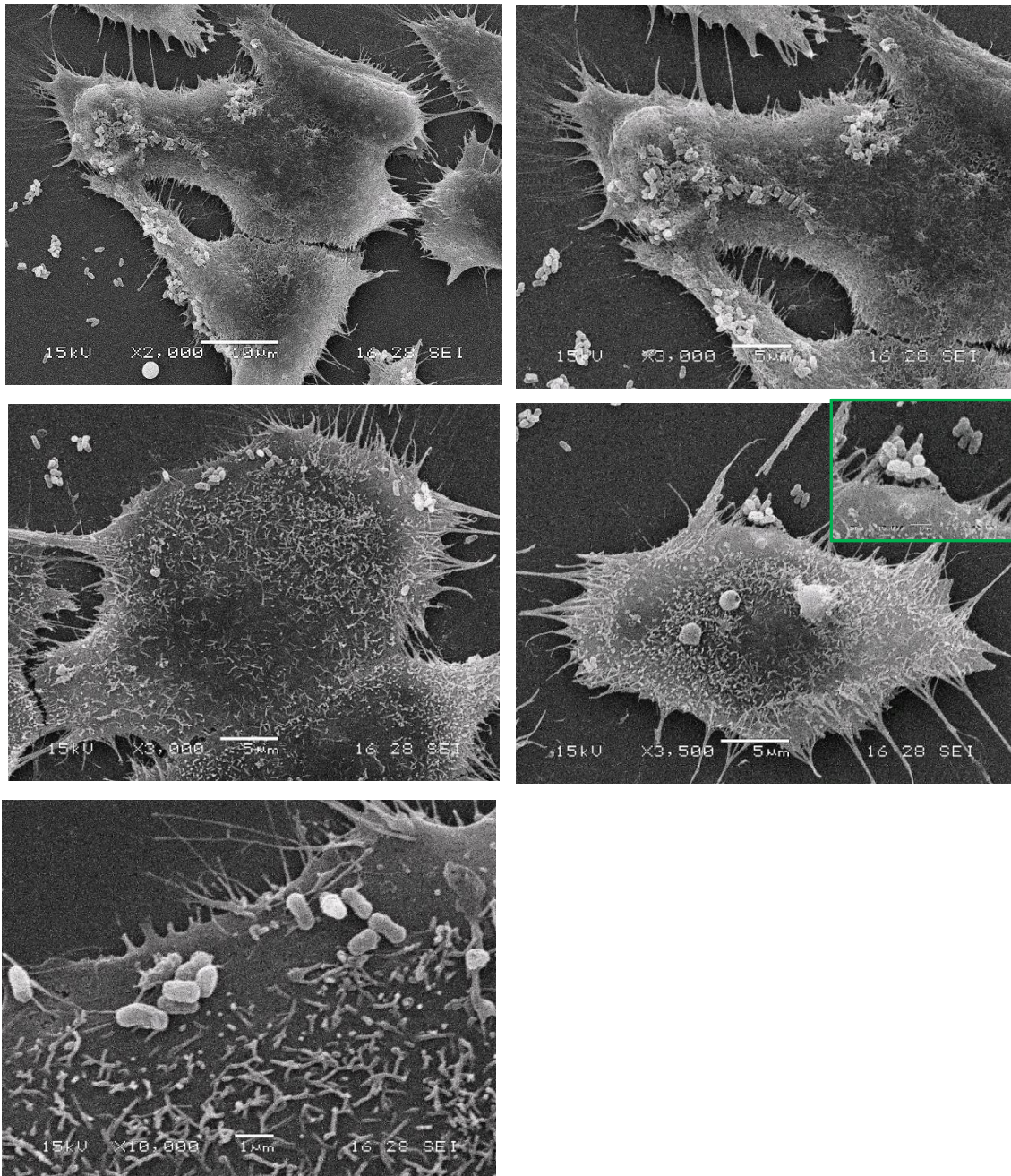


Figura 40: Microscopía electrónica de barrido de células MDBK a las 72 h post infección por aislamiento 10.

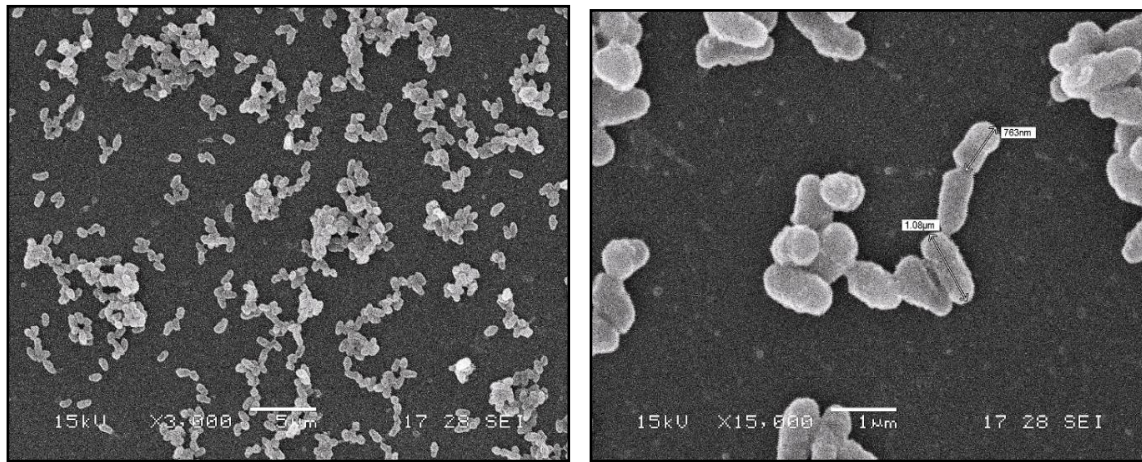


Figura 41: Microscopía electrónica de barrido de células MDBK a las 24 h post infección por aislamiento 15.

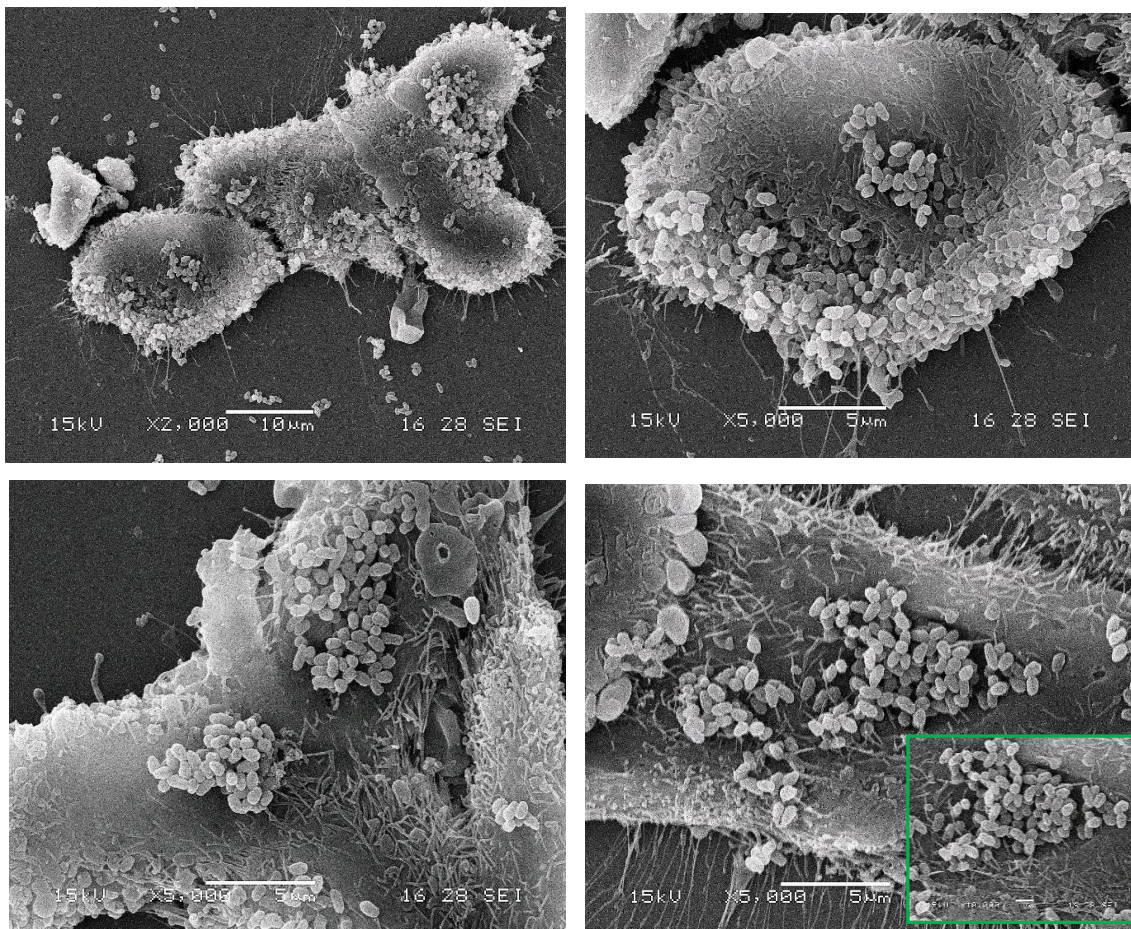


Figura 42: Microscopía electrónica de barrido de células MDBK a las 72 h post infección por aislamiento 15.

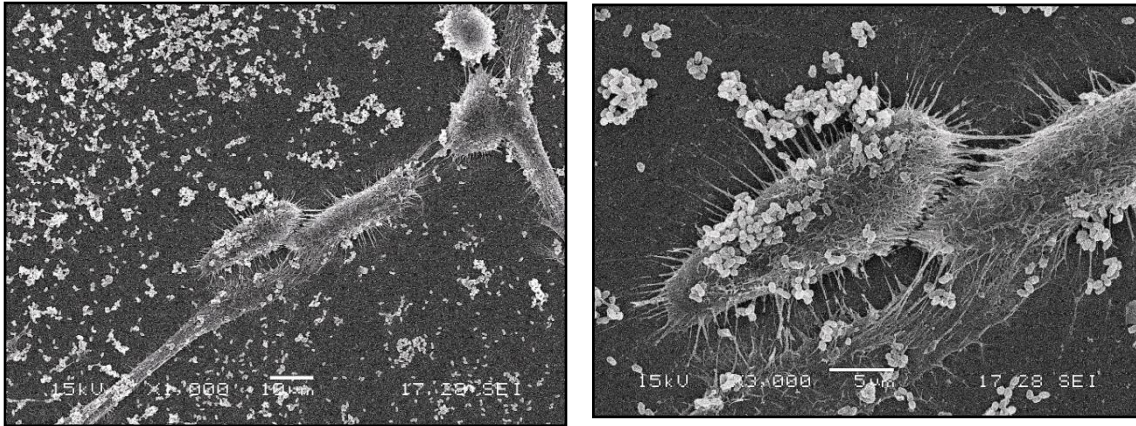
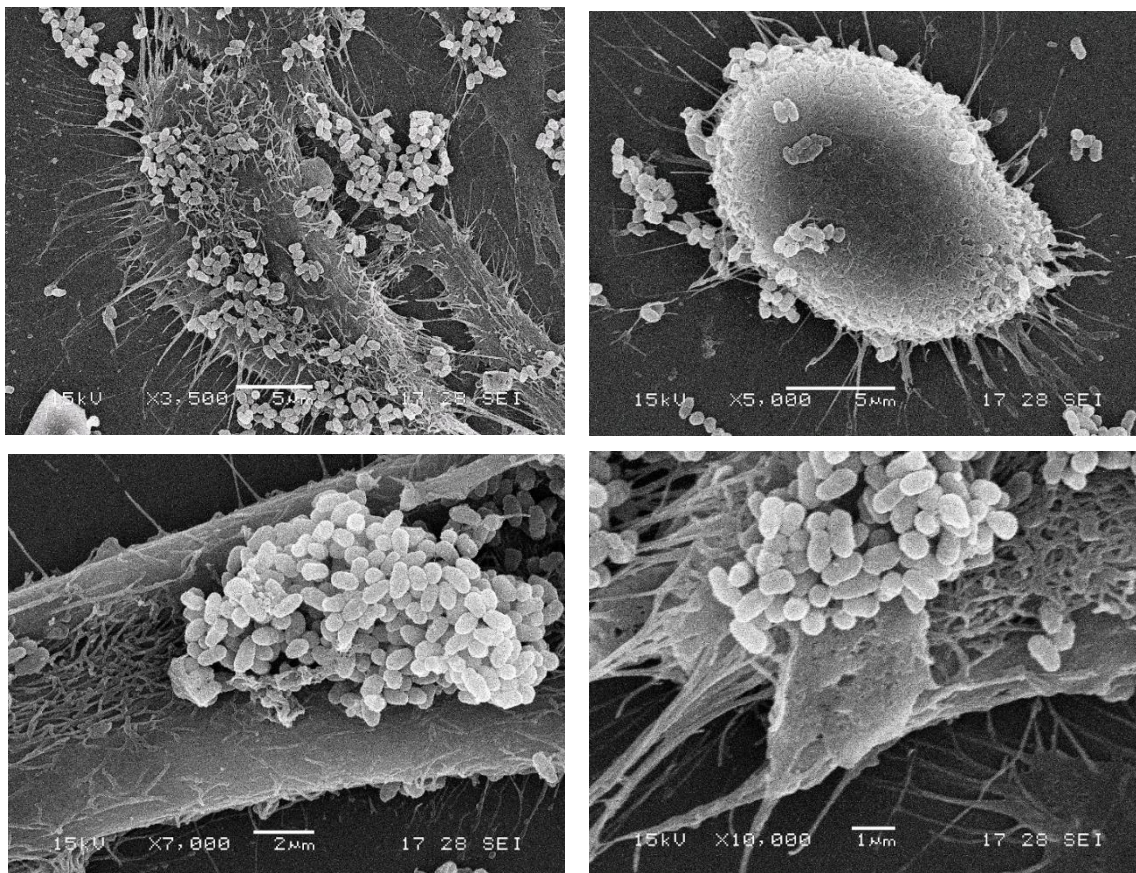


Figura 43: Microscopía electrónica de barrido de células MDBK a las 24 h post infección por aislamiento 93.

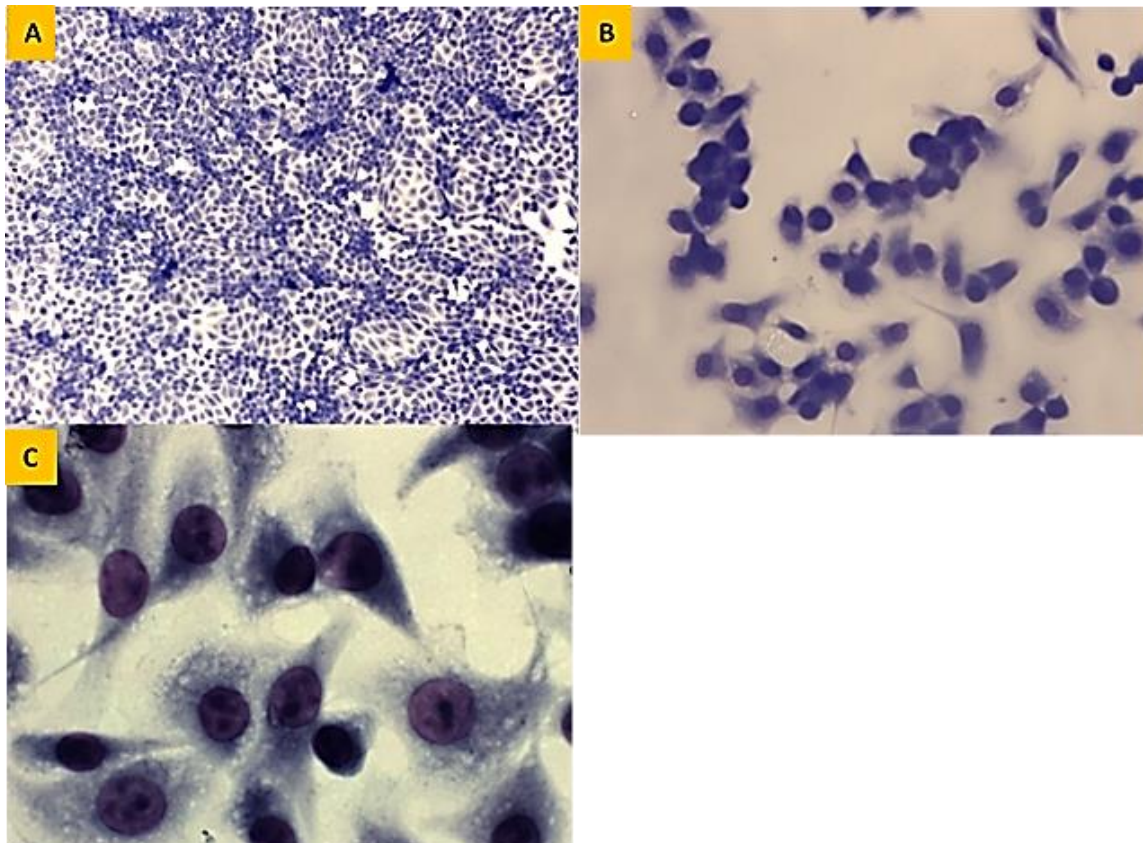


En el análisis de la microscopía electrónica de barrido, los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* mostraron un contacto íntimo con las células MDBK, que demuestra la capacidad de adherencia en estas líneas celulares.

Evaluación de efectos citopáticos.

En la observación por microscópica óptica, las células MDBK mostraron un desarrollo epitelial característico y formaron un crecimiento denso y una monocapa confluyente. Las células fueron fusiformes con abundante citoplasma que se tiñó violeta intenso en la coloración de Giemsa. Las células MDBK no infectadas mostraron una morfología normal y sin signos de degeneración a las 6 h (figura 44).

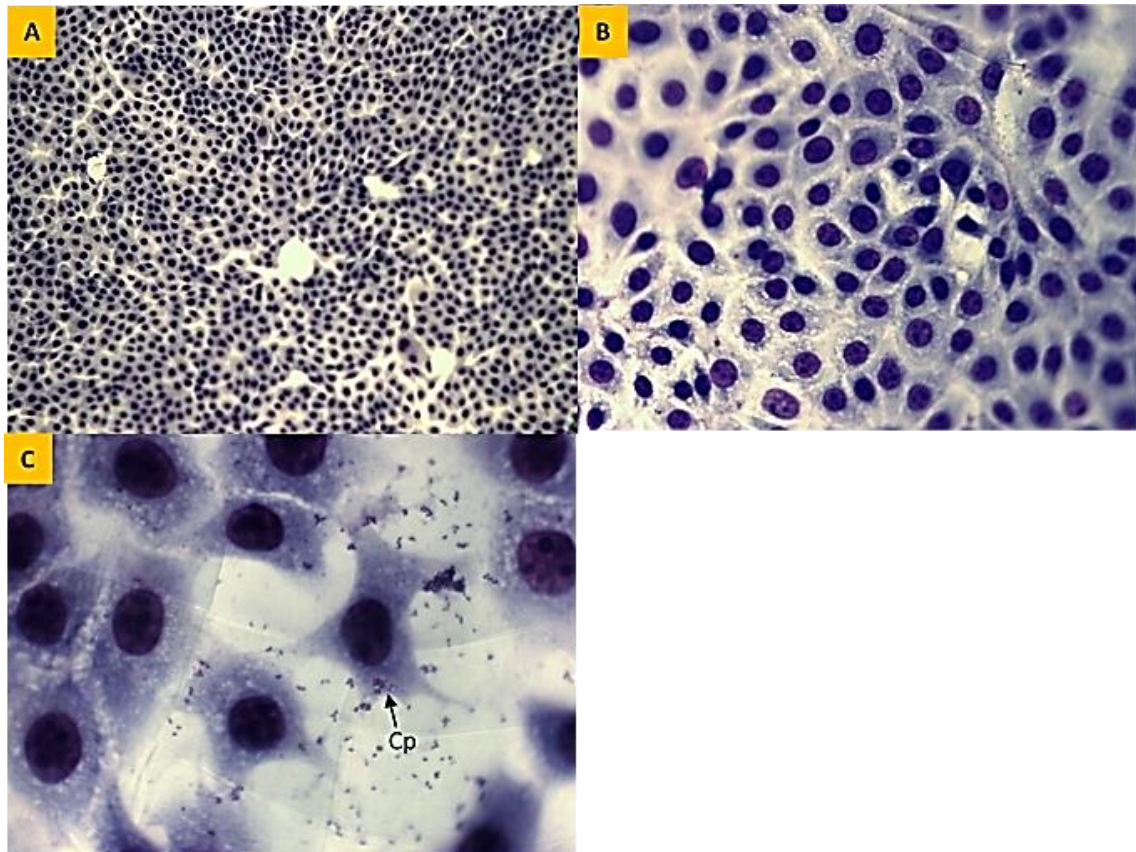
Figura 44: Microscopía óptica de células MDBK.



A: Coloración de Giemsa, células control 6 h con objetivo 10 x. B: Coloración de Giemsa, células control 6 h con objetivo 40 x. C: Coloración de Giemsa, células control 6 h con objetivo 100 x.

La figura 45 corresponde al cultivo con 6 h de incubación con *C. pseudotuberculosis*, se observaron pequeños grupos de bacterias concentradas adheridas al citoplasma de las células MDBK. En promedio cada célula presentaba entre 2 y 5 bacterias.

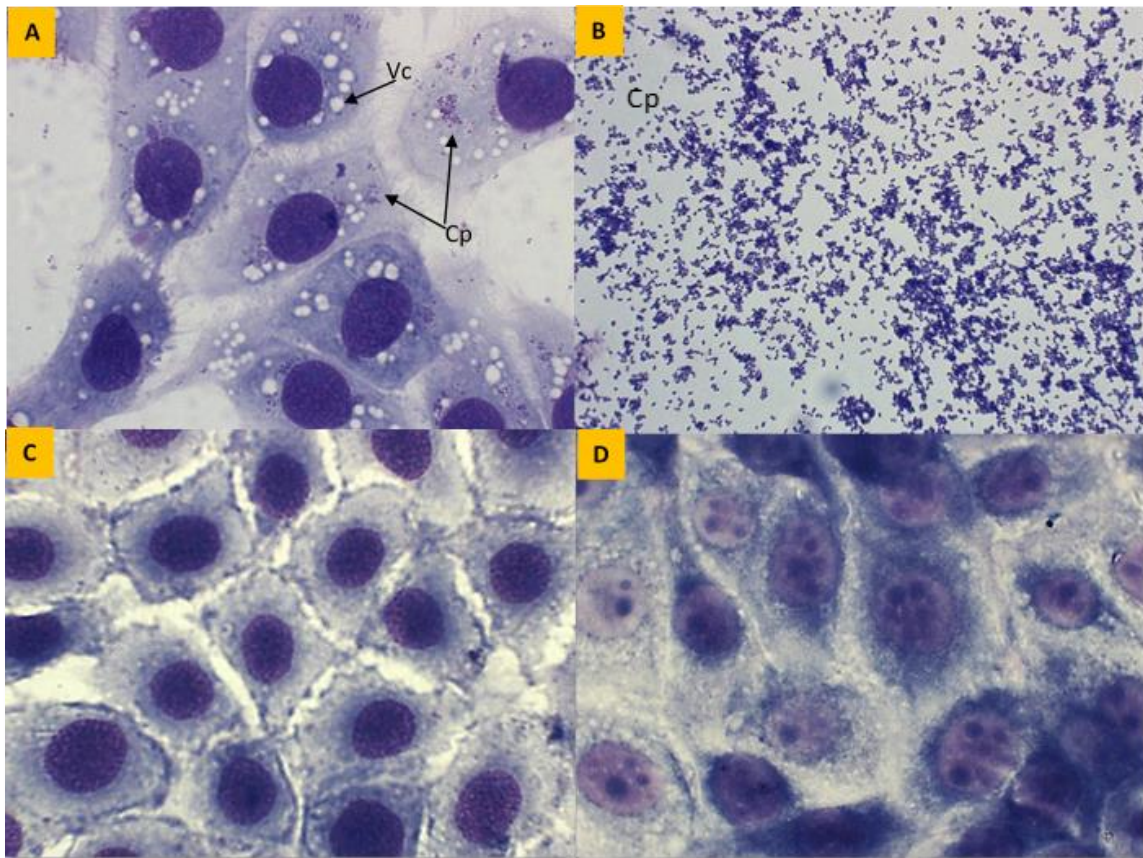
Figura 45: Microscopía óptica de células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis*.



A: Coloración de Giemsa, células 6 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 10 x. B: Coloración de Giemsa, células 6 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 40 x. C: Coloración de Giemsa, células 6 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* (Cp) con objetivo 100 x.

Luego de las 24 h post inoculación un considerable incremento en el número de bacterias adheridas fue visible. La monocapa comenzó a desprenderse y las células aparecieron alteradas, como consecuencia se observó la presencia de abundantes vacuolas citoplasmáticas y alteración de la relación núcleo/citoplasma (figura 46-A).

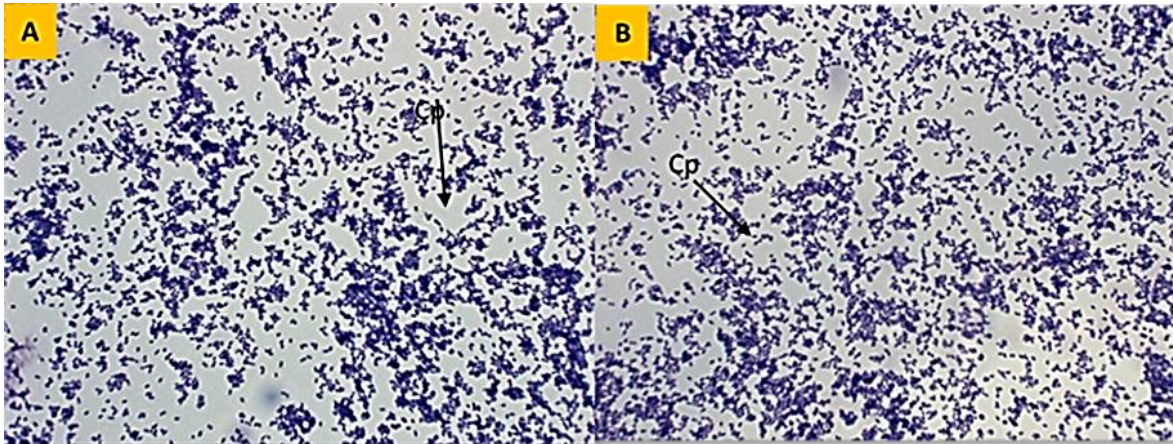
Figura 46: Microscopía óptica de células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis* (aislamiento 1002).



A: Coloración de Giemsa, células 24 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 100 x, B: Coloración de Giemsa, células 72 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 100 x, no se observan células solo bacterias. C: control células 24 h con objetivo 100 x. D: control células 72 h con objetivo 100 x.

A las 72 h post infección se observaron los mismos cambios pero más intensos. Con los aislamientos 7506, 1002 y 10 se observó un 100 % de desprendimiento de la monocapa (figura 46-B y figura 47-B).

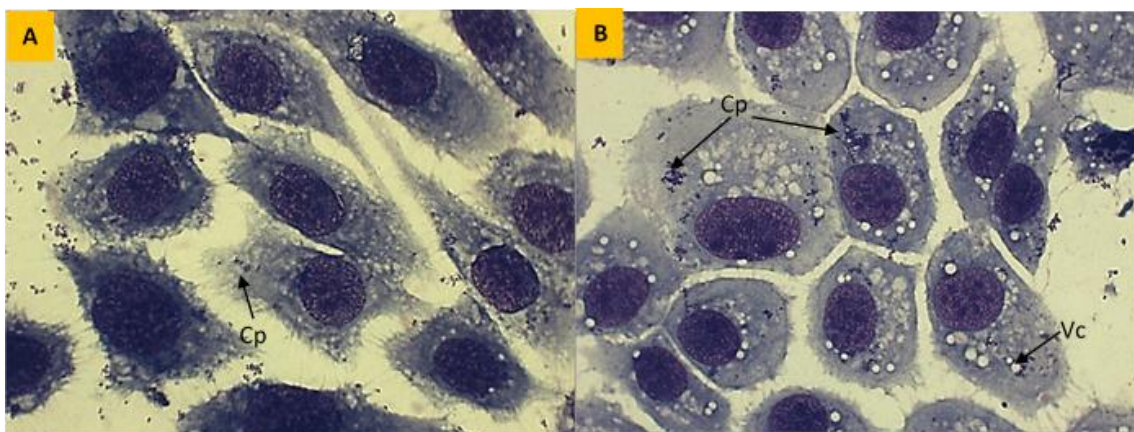
Figura 47: Microscopía óptica de células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis* (aislamiento 7506).



A: Coloración de Giemsa, células 24 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 100 x,
 B: Coloración de Giemsa, células 72 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 100 x.

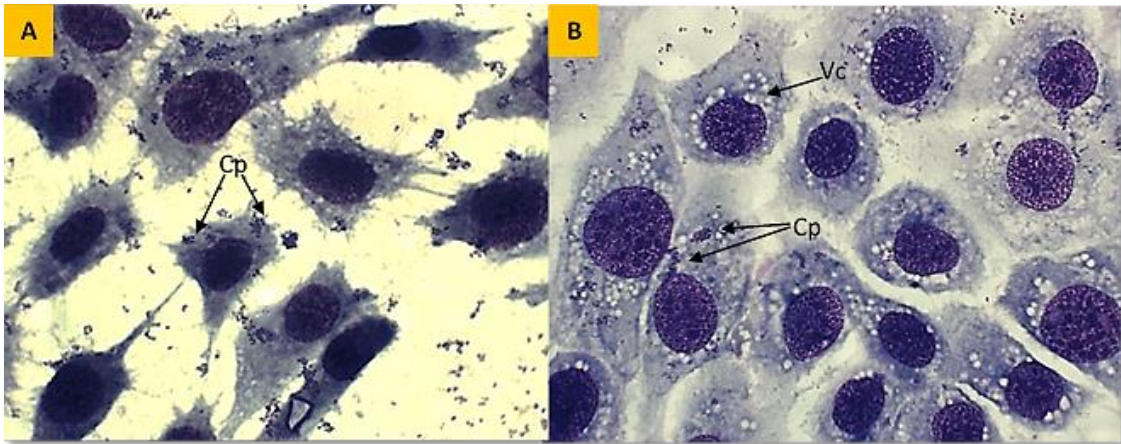
En contacto con los aislamientos 15 y 93, las células a las 24 h post infección muestran las bacterias agrupadas sobre la superficie celular (figura 48 A y 49 A). A las 72 h post infección se observó un 60 y 70 % de células con vacuolas citoplasmáticas (Vc) (figura 48 B y 49 B).

Figura 48: Microscopía óptica de células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis* (aislamiento 15)



A: Coloración de Giemsa, células 24 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 100 x, B:
 Coloración de Giemsa, células 72 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 100 x.

Figura 49: Microscopía óptica de células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis* (aislamiento 93)



A: Coloración de Giemsa, células 24 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 100 x, B: Coloración de Giemsa, células 72 h postinfección con *C. pseudotuberculosis* con objetivo 100 x.

En la tabla 19 se presenta un resumen de los efectos citopáticos a lo largo de los tiempos de incubación, al infectar las células MDBK con aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis.

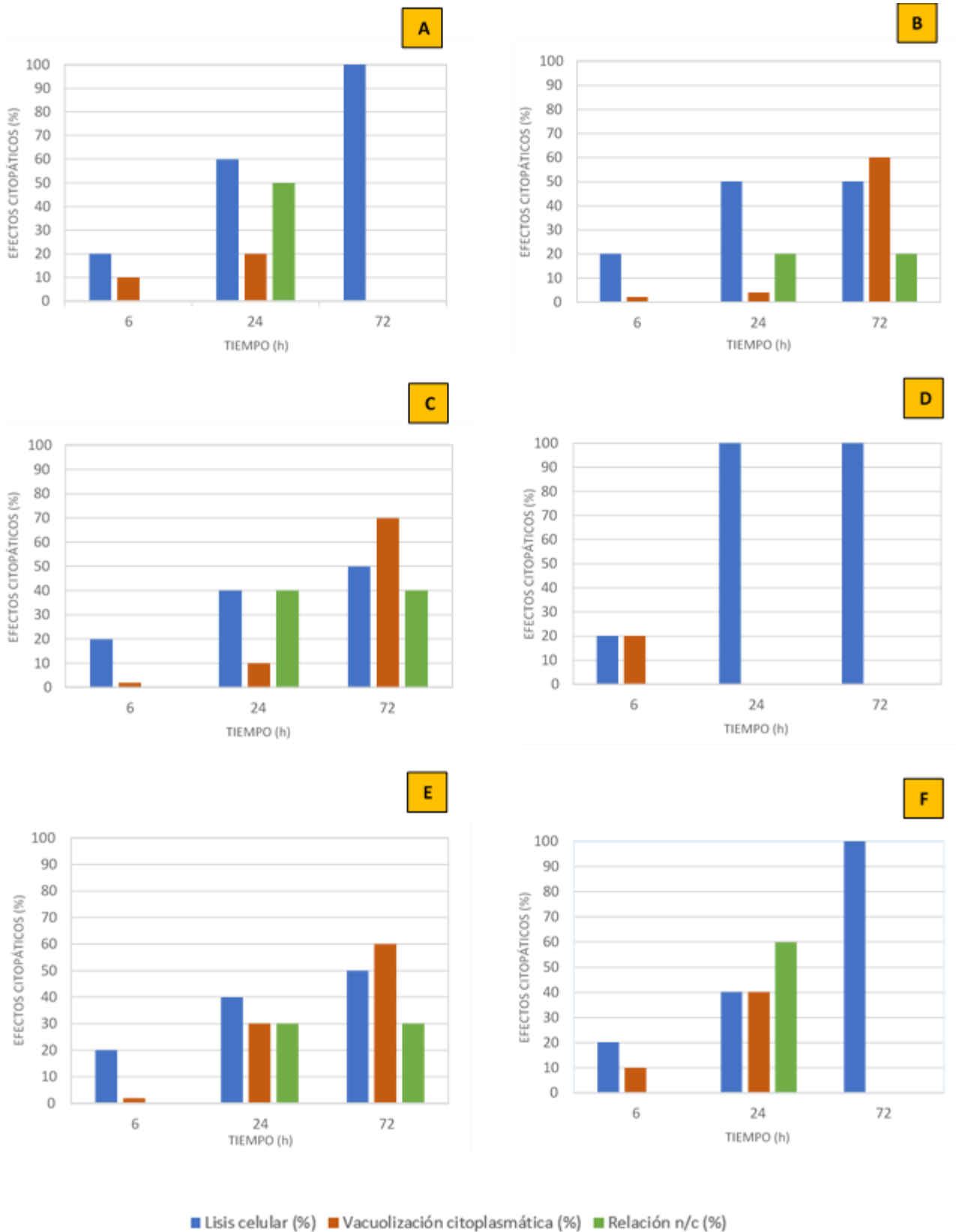
Tabla 19: Efectos citopáticos en células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis* biovar ovis

Células control / Aislamientos	Tiempo (h)	Efectos citopáticos		
		Lisis celular (%)	Vacuolización citoplasmática (%)	Relación: Núcleo/citoplasma (%)
Células control	6	20	2	0
Células control	24	30	4	3
Células control	72	30	4	5
ARGENTINA				
10	6	20	10	0
10	24	60	20	50
10	72	100	-	-
15	6	20	2	0
15	24	50	4	20
15	72	50	60	20
93	6	20	2	0
93	24	40	10	40
93	72	50	70	40
7506	6	20	20	0
7506	24	100	-	-
7506	72	100	-	-
K407	6	20	2	0
K407	24	40	30	30
K407	72	50	60	30
BRASIL				
1002	6	20	10	0
1002	24	40	40	60
1002	72	100	-	-

Referencias: (-): Sin lectura

En la figura 50 se grafican y comparan estos efectos citopáticos provocados en las células MDBK por cada aislamiento de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis evaluado.

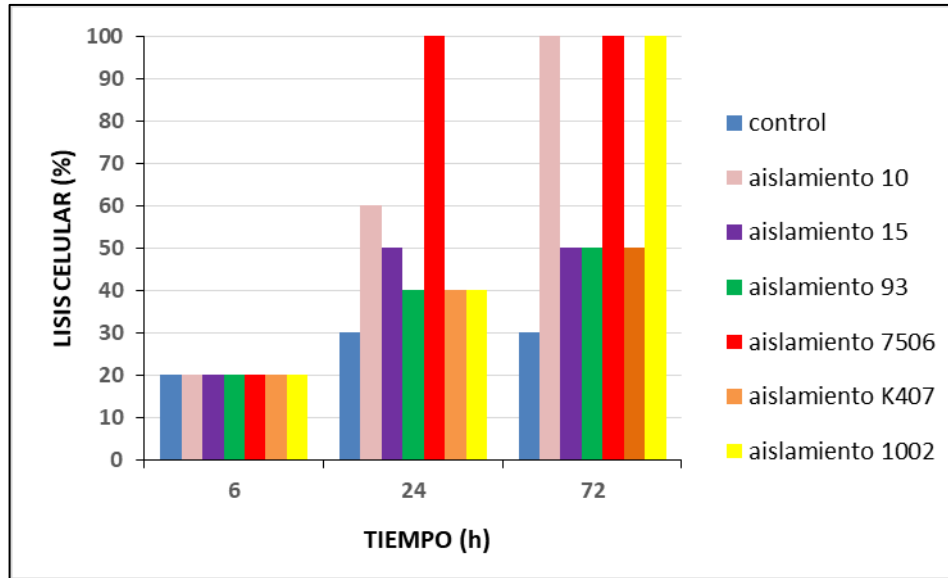
Figura 50: Efectos citopáticos de los distintos aislamientos a los diferentes tiempos de infección (6 h, 24 h, 72 h)



Referencias: A: aislamiento 10, B: aislamiento 15, C: aislamiento 93, D: aislamiento 7506, E: aislamiento K407, F: aislamiento 1002

En la figura 51 se comparan los porcentajes de lisis celular de los aislamientos analizados.

Figura 51: Lisis celular en células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis* biovar ovis.



Los resultados de lisis celular fueron analizados estadísticamente. No se encontraron diferencias significativas para las 6 h post infección del cultivo, mientras que si existen diferencias significativas a partir de las 24 h, observándose los mayores porcentajes de lisis celular en los aislamientos 7506, 10 y 1002 a las 72 h (tabla 20). A las 6 h la lisis observada es propia de las células.

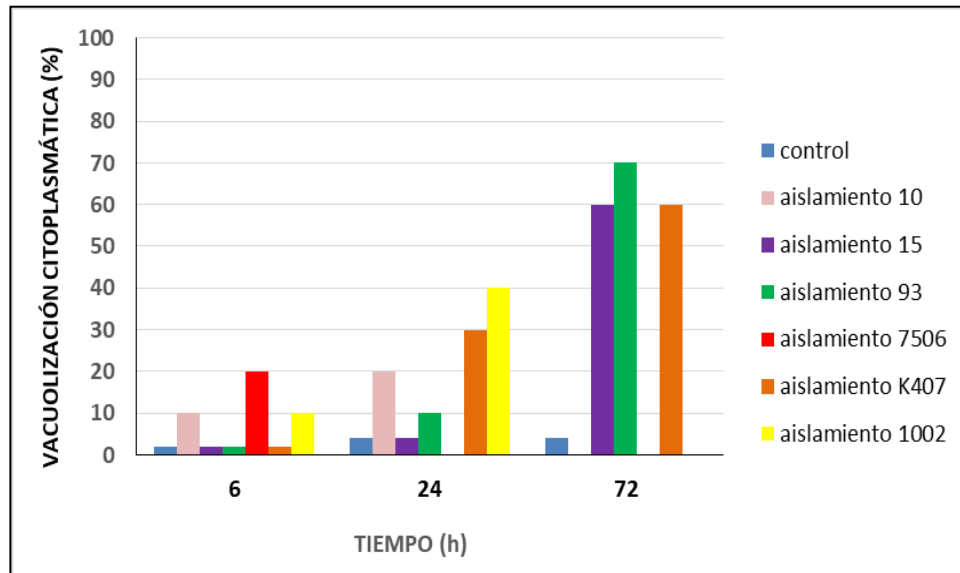
Tabla 20: Resumen de las pruebas no paramétricas para comparar la lisis celular de los distintos aislamientos a los diferentes tiempos de infección (6 h, 24 h, 72 h).

	χ^2	g.l	p
6 h	0	6	1
24 h	131,5	6	<0,01
72 h	254,5	6	<0,01

Referencias: χ^2 estadístico; g.l grados de libertad, p valor de probabilidad asociado.

Los porcentajes de vacuolización citoplasmática de los aislamientos analizados se comparan en la figura 52.

Figura 52: Vacuolización citoplasmática en células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis* biovar ovis.



El análisis estadístico en este caso reveló diferencias significativas desde las 6 h de iniciada la infección. El aislamiento 7506 presentó mayor porcentaje de vacuolización citoplasmática a las 6 h; 1002 y K407 a las 24 h y 93, 15 y K407 a las 72 h. Cuando se observó 100 % de lisis celular no se registraron efectos de vacuolización citoplasmática, ni alteración en relación núcleo/citoplasma, por lo tanto para el análisis estadístico no se tienen en cuenta estos valores (tabla 21).

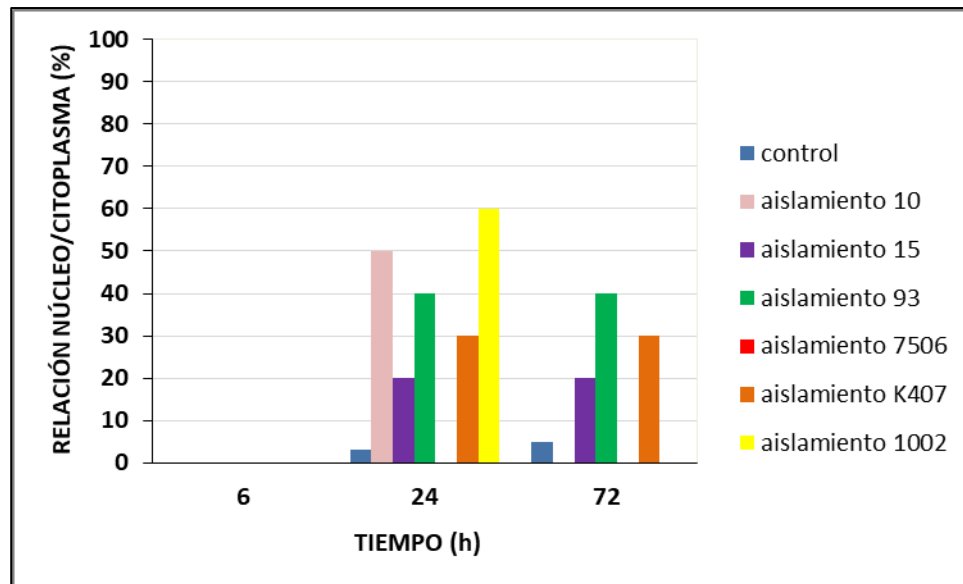
Tabla 21: Resumen de las pruebas no paramétricas para comparar la vacuolización citoplasmática de los distintos aislamientos a los distintos tiempos de infección (6, 24, 72 h).

	χ^2	g.l	p
6 h	44,91	6	<0,01
24 h	73,71	5	<0,01
72 h	108,4	3	<0,01

Referencias: χ^2 estadístico; g.l grados de libertad, p valor de probabilidad asociado.

En la figura 53 se comparan los porcentajes de alteración núcleo/citoplasma de los aislamientos analizados.

Figura 53 Relación núcleo/citoplasma en células MDBK infectadas con *C. pseudotuberculosis* biovar ovis.



Para el análisis de la relación núcleo/citoplasma (figura 52) se eligió el test exacto, que es una variante de la prueba de ji-cuadrado para los casos en que existen valores esperados menores que cinco. La prueba exacta es una generalización del procedimiento de Fisher y calcula una probabilidad exacta valor para la relación entre dos variables en grandes tablas (Agresti, 1992).

Se observaron diferencias significativas entre los distintos aislamientos a diferentes tiempos de infección. Los aislamientos 10 y 1002 presentaron el mayor porcentaje de alteración en la relación núcleo/citoplasma a las 24 h; 93 y K407 a las 72 h (tabla 22).

Tabla 22: Resumen de las pruebas no paramétricas para comparar la relación: núcleo/citoplasma de los distintos aislamientos a los distintos tiempos de infección (6 h, 24 h, 72 h).

	χ^2	g.l	p
6 h	6,86	6	<0,01
24 h	180,6	6	<0,01
72 h	180,2	6	<0,01

Referencias: χ^2 estadístico; g.l grados de libertad, p valor de probabilidad asociado.

4.5.5. Capacidad de *C. pseudotuberculosis* para el desarrollo de biopelículas.

Para cada una de las muestras se aplicó estadística descriptiva. Las DO se promediaron y se obtuvieron las desviaciones estándar (DE) (tabla 23).

Tabla 23: Promedio y desviación estándar de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* analizados.

Aislamiento	Promedio	DE
ARGENTINA		
10	0,55	0,04
14	0,86	0,03
15	1,09	0,18
17	1,63	0,30
20	0,49	0,02
93	1,70	0,20
95	0,51	0,08
K407	1,29	0,24
5807	1,34	0,56
6007	1,93	0,63
7506	0,51	0,05
BRASIL		
355 CRE	0,91	0,14
103	1,28	0,12
174	0,46	0,04
1002	1,25	0,34

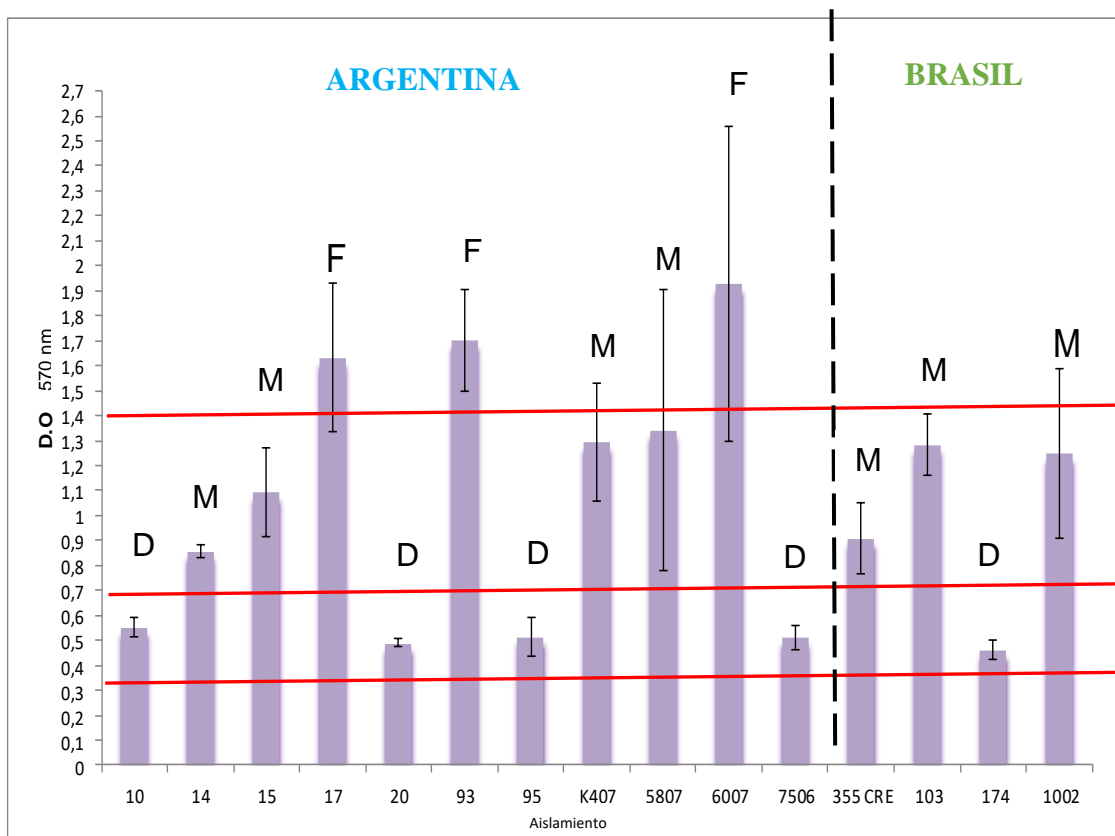
El punto de corte (DOC) se consideró como el promedio de las DO obtenidas en los controles negativos más tres DE (DOC: 0,34). Se categorizaron como no productores de

biopelícula a los aislamientos con lecturas de DO inferior al DOC ($\leq 0,34$), productores débiles a aquellos con valores de DO superior al DOC e inferior a 2 DOC ($>0,34$ y $\leq 0,68$), moderados los que presentaron una DO entre 2 DOC y 4 DOC ($> 0,68$ y $\leq 1,36$) y fuertemente productores a aquellos con DO superior a 4 DOC ($> 1,36$).

El 33 % se clasificaron como productores débiles de biopelículas con DO promedio entre 0,46 – 0,55; el 47 % presentaron valores de DO entre 0,86 – 1,34 y se consideraron productores moderados y el 20 % con DO entre 1,63 – 1,93 fueron categorizados como productores fuertes.

Los 15 aislamientos se clasificaron de acuerdo a su producción en débil (D), moderado (M) y fuerte (F), como puede observarse en la figura 54.

Figura 54: Clasificación de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de acuerdo a la capacidad de formación de biopelículas.



En la tabla 24, se compararon las categorías de biopelículas de cada aislamiento, con el sitio de lesión, los resultados de la sensibilidad antibiótica por método de difusión en agar para los antibióticos amicacina y oxacilina y el lugar de origen geográfico (Argentina y Brasil).

Tabla 24. Relación entre categoría de formación específica de biopelícula, sitio de lesión, sensibilidad antibiótica y origen geográfico.

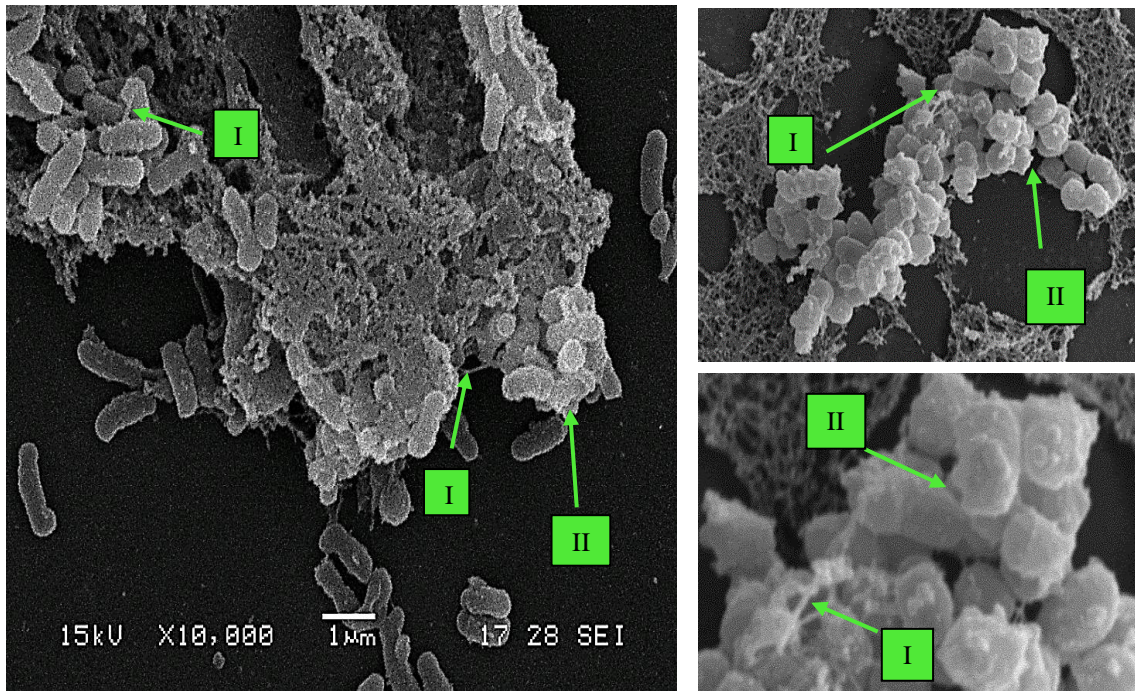
Aislamiento	Sitio de lesión	Formador de biopelícula	Sensibilidad antibiótica por método de difusión en placa
ARGENTINA			
10	Absceso pulmonar	Débil	AMK: R
14	Absceso pulmonar	Moderado	Sensible a todos los ATB ensayados
15	Linfonódulo de cadena mediastínica	Moderado	AMK: R
17	Absceso renal	Fuerte	AMK:R
20	Absceso renal	Débil	AMK: R y OXA: R
93	Absceso renal	Fuerte	AMK: R y OXA: R
95	Linfonódulo inguinal superficial	Débil	AMK: R y OXA: R
K407	Linfonódulo pre-escapular	Moderado	OXA: R
5807	Linfonódulo inguinal superficial	Moderado	AMK: R y OXA: R
6007	Linfonódulo inguinal superficial	Fuerte	AMK: R y OXA: R
7506	Absceso testicular	Débil	AMK: R
BRASIL			
355 CRE	Linfonódulo subilíaco (crural)	Moderado	AMK: R y OXA: R
103	Linfonódulo subilíaco (crural)	Moderado	AMK: R y OXA: R
174	Linfonódulo cervical superficial (pre-escapular)	Débil	AMK: R y OXA: R
1002	Linfonódulo inguinal superficial	Moderado	OXA: R

El análisis estadístico demostró que la capacidad de formación de biopelículas de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, no se asocia con el sitio de lesión ($\chi^2 = 3,61$; p 0,16), la sensibilidad antibiótica a amicacina ($\chi^2 = 4,28$; p 0,20) y a oxacilina ($\chi^2 = 0,17$; p 0,91) ni con el origen geográfico ($\chi^2 = 2,94$; p 0,39).

4.5.5. Microscopía electrónica de barrido en el análisis de biopelículas.

En el microscopio electrónico de barrido (MEB), se observaron acumulaciones densas de bacterias (figura 55-II) con formas esféricas y de bastoncillo recubiertas de estructuras fibrilares (figura 55-I), que podrían asociarse con la capacidad de formación de biopelículas.

Figura 55: Microscopía electrónica de barrido de la biopelícula producida por *C. pseudotuberculosis* en células MDBK, 72 h post infección.



4.6. Análisis geográfico

4.6.1. Distribución espacial de aislamientos.

Dado que en el análisis estadístico multivariado (método de interdependencia-análisis de componentes principales) que se aplicó no se incluyó la variable lugar de origen geográfico, se verificó posteriormente si existía una relación territorial entre los aislamientos estudiados. La distribución espacial de los aislamientos se plasmó en mapas generados con el SIG.

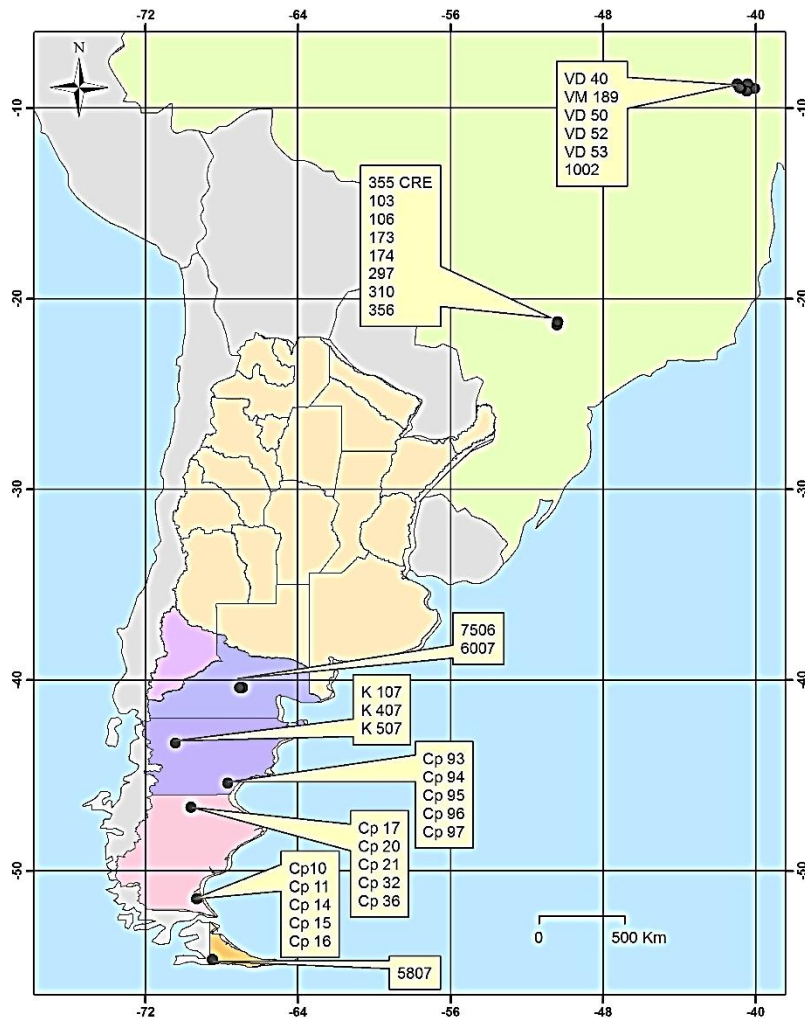
En la tabla 25, se observan las coordenadas geográficas obtenidas y posteriormente utilizadas en la cobertura de puntos para realizar la distribución espacial.

Tabla 25: Coordenadas geográficas del sitio de origen de los aislamientos investigados.

Aislamiento	Lugar de origen	Latitud	Longitud
ARGENTINA			
Cp 10	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz (Zona Río Gallegos al Sur del Río Santa Cruz)	51° 27' 4,22" S	69° 18' 49,59" O
Cp 11	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz (Zona Río Gallegos al Sur del Río Santa Cruz)	51° 27' 4,22" S	69° 18' 49,59" O
Cp 14	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz (Zona Río Gallegos al Sur del Río Santa Cruz)	51° 27' 4,22" S	69° 18' 49,59" O
Cp 15	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz (Zona Río Gallegos al Sur del Río Santa Cruz)	51° 27' 4,22" S	69° 18' 49,59" O
Cp 16	Departamento Güer Aike - provincia de Santa Cruz (Zona Río Gallegos al Sur del Río Santa Cruz)	51° 27' 4,22" S	69° 18' 49,59" O
Cp 17	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz (Estancia Aurora)-	46° 38' 49,76" S	69° 35' 45,13" O
Cp 20	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz (Estancia Aurora)-	46° 38' 49,76" S	69° 35' 45,13" O
Cp 21	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz (Estancia Aurora)-	46° 38' 49,76" S	69° 35' 45,13" O
Cp 32	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz (Estancia Aurora)-	46° 38' 49,76" S	69° 35' 45,13" O
Cp 36	Departamento Deseado - provincia Santa Cruz (Estancia Aurora)-	46° 38' 49,76" S	69° 35' 45,13" O
Cp 93	Departamento Escalante - provincia de Chubut (Estancia Guillermina)	45° 23' 25,68" S	67° 40' 52,05" O
Cp 94	Departamento Escalante - provincia de Chubut (Estancia Guillermina)	45° 23' 25,68" S	67° 40' 52,05" O
Cp 95	Departamento Escalante - provincia de Chubut (Estancia Guillermina)	45° 23' 25,68" S	67° 40' 52,05" O
Cp 96	Departamento Escalante - provincia de Chubut (Estancia Guillermina)	45° 23' 25,68" S	67° 40' 52,05" O
Cp 97	Departamento Escalante - provincia de Chubut (Estancia Guillermina)	45° 23' 25,68" S	67° 40' 52,05" O
5807	Provincia de Tierra del Fuego	54° 38' 23,11" S	68° 28' 52,84" O
6007	Provincia de Río negro	40° 23' 12,79" S	67° 03' 48,30" O
K107	Zona Oeste (Depto. Languiñeo) - provincia de Chubut	43° 17' 41,29" S	70° 25' 11,27" O
K407	Zona Oeste (Depto. Languiñeo) - provincia de Chubut	43° 17' 41,29" S	70° 25' 11,27" O
K507	Zona Oeste (Depto. Languiñeo) - provincia de Chubut	43° 17' 41,29" S	70° 25' 11,27" O
7506	Provincia de Río Negro	40° 23' 12,79" S	67° 03' 48,30" O
BRASIL			
355 CRE	Aracatuba-Estado San Pablo-Brasil	21° 8' 20,65" S	50° 31' 25,05" O
103	Aracatuba - Estado San Pablo-Brasil	21° 8' 20,65" S	50° 31' 25,05" O
106	Aracatuba - Estado San Pablo-Brasil	21° 8' 20,65" S	50° 31' 25,05" O
173	Aracatuba - Estado San Pablo-Brasil	21° 8' 20,65" S	50° 31' 25,05" O
174	Aracatuba - Estado San Pablo-Brasil	21° 8' 20,65" S	50° 31' 25,05" O
297	Aracatuba - Estado San Pablo-Brasil	21° 8' 20,65" S	50° 31' 25,05" O
310	Aracatuba - Estado San Pablo-Brasil	21° 8' 20,65" S	50° 31' 25,05" O
356	Estado de Bahía - Brasil	21° 8' 20,65" S	50° 31' 25,05" O
VD 40	Estado de Bahía - Brasil	8° 59' 33,76" S	39° 153 59,54" O
VD 50	Estado de Bahía - Brasil	8° 59' 33,76" S	39° 153 59,54" O
VD 52	Estado de Bahía - Brasil	8° 59' 33,76" S	39° 153 59,54" O
VD 53	Estado de Bahía - Brasil	8° 59' 33,76" S	39° 153 59,54" O
VM 189	Estado de Bahía - Brasil	8° 59' 33,76" S	39° 153 59,54" O
1002	Estado de Bahía - Brasil	8° 59' 33,76" S	39° 153 59,54" O

En la figura 56, se muestra la distribución espacial de los aislamientos investigados. Se observa que de los puntos ubicados en Brasil, el 17 % de los aislamientos se localizaron en el noreste (estado de Bahía) y el 23 % en el sureste (estado de San Pablo – Aracatuba). En tanto que en Argentina el 60 % de los aislamientos se distribuyeron en la Patagonia Argentina, desde la provincia de Río Negro hasta Tierra del Fuego, mostrando una mayor dispersión.

Figura 56: Distribución espacial de los aislamientos estudiados.



4.6.2. Distribución por descripción.

Se estableció la vinculación entre el espacio geográfico y cada una de las variables utilizadas. La importancia de esta relación se atribuye a que los mapas permitieron visualizar de manera resumida la información obtenida de la procedencia de cada uno de los aislamientos investigados.

En la figura 57 se localizaron los puntos de acuerdo a la especie de animal afectada. Se observa que, los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de ovejas y cabras se distribuyeron en ambos países. Los de origen caprino (20 %) se localizaron puntualmente en el estado de Bahía (Brasil) y en la provincia de Río Negro (Argentina), mientras que los de origen ovino (80 %) predominaron y presentaron una distribución geográfica más dispersa.

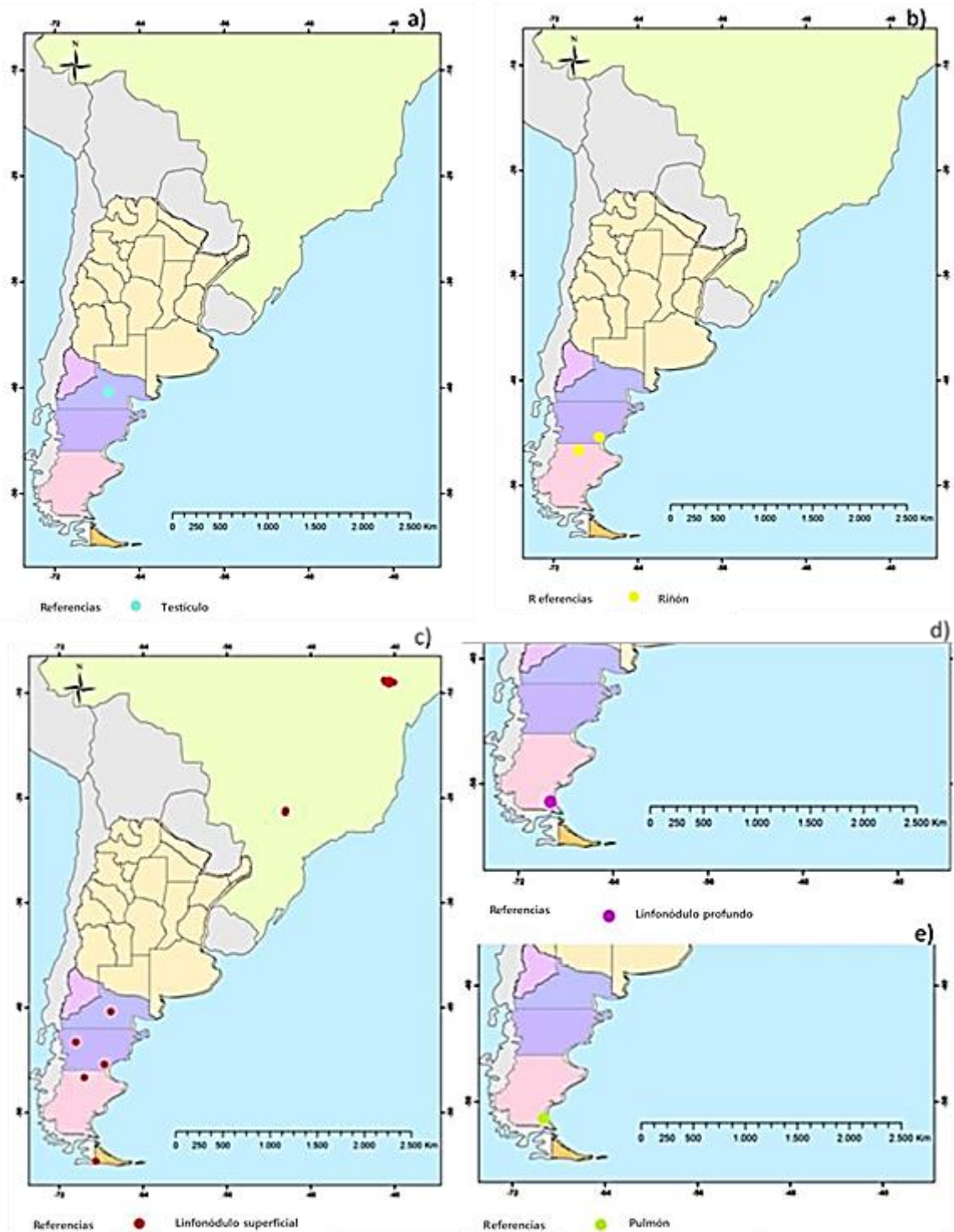
Figura 57: Distribución de aislamientos por especie animal



En la figura 58, se georreferenciaron los aislamientos de acuerdo a los sitios de lesión. Los provenientes de pulmón (9 %), riñón (11 %), testículo (3 %) y linfonódulo profundo (6 %) se localizaron puntualmente en la región patagónica de Argentina, mientras que las

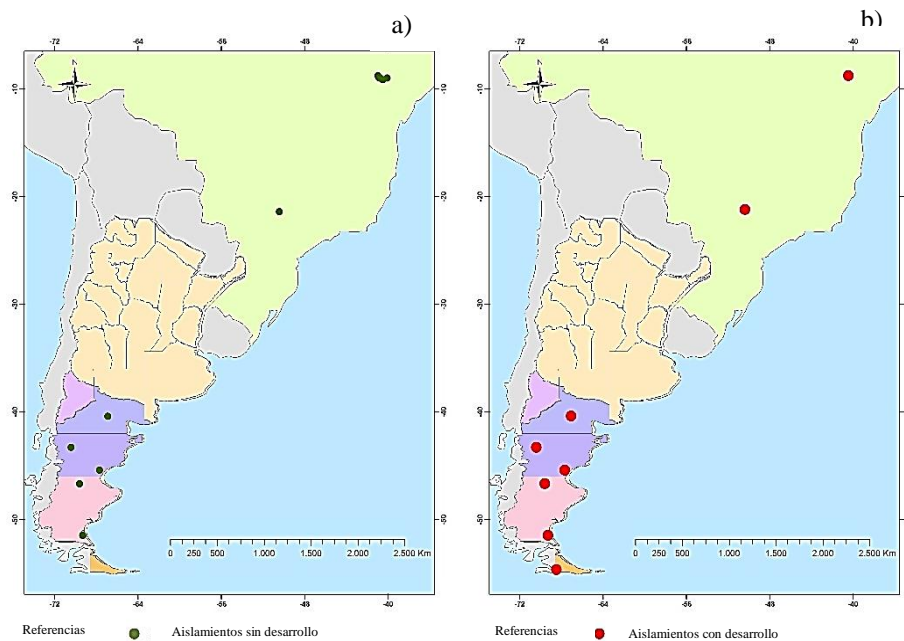
procedentes de linfonódulos superficiales (71 %) presentaron una distribución dispersa en ambos países.

Figura 58: Distribución de aislamientos por sitio de lesión: a) testículo b) riñón c) linfonódulos superficiales d) linfonódulos profundos y e) pulmón.



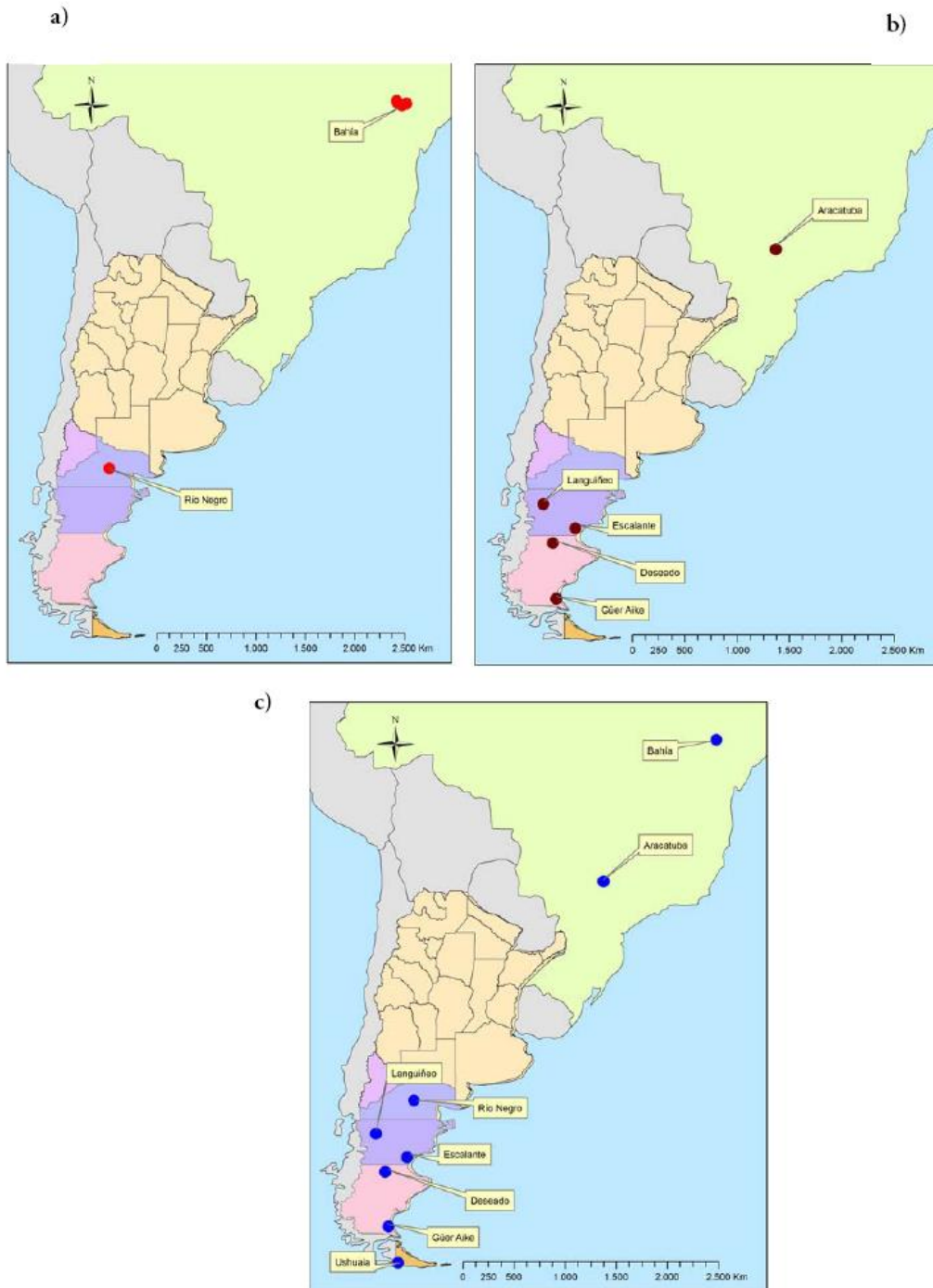
La figura 59 muestra la localización de acuerdo a la sensibilidad antibiótica. El 40 % de los aislamientos sin desarrollo y el 60 % de los aislamientos con desarrollo frente a amicacina se distribuyeron tanto en la región patagónica de Argentina como en Brasil.

Figura 59: Sensibilidad antibiótica a amicacina: a) aislamientos sin desarrollo frente a amicacina b) aislamientos con desarrollo frente a amicacina.



4.6.3. Distribución espacial de los grupos

Como se mencionó anteriormente, del análisis estadístico de agrupamiento surgieron 3 grupos de aislamientos: **grupo A**, que incluyó aislamientos con 100 % de similitud procedentes de cabras y sin desarrollo frente a amicacina; el **grupo B**, aislamientos de ovejas y sin desarrollo frente a amicacina; y **grupo C**, aislamientos de ovejas y cabras con desarrollo frente a amicacina. Estos se ubicaron geográficamente según posición absoluta (coordenadas geográficas de latitud y longitud) como se muestra en la figura 60.

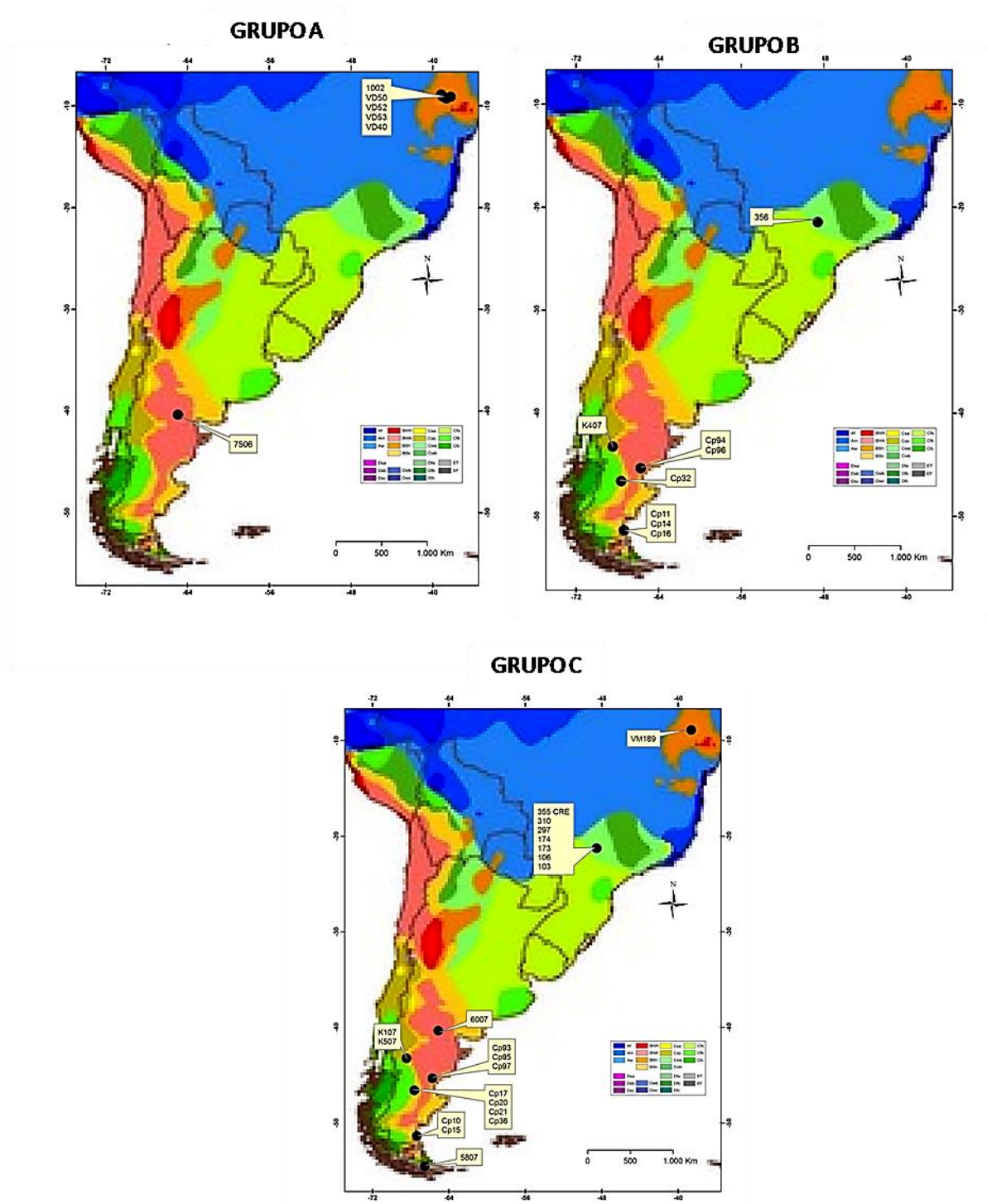
Figura 60: Distribución espacial de grupos: a) grupo A b) grupo B c) grupo C

Según la posición absoluta de los grupos, la distribución espacial mostró una nube de puntos muy dispersa. Por ello, se incorporó otro elemento para el análisis como es la clasificación de los climas según Köppen; esta última incorpora las variables temperatura y precipitaciones.

4.6.4. Distribución de aislamientos relacionada con la clasificación de climas según Köppen.

En la figura 61 se georreferencian los grupos de acuerdo a la distribución de climas.

Figura 61 Distribución de grupos – Georreferenciación de acuerdo a la clasificación de climas según Köppen.



Del análisis surge que, espacialmente, los aislamientos se localizan en zonas que presentan climas secos y templados (tabla 26).

Tabla 26: Características de los tipos de clima según la localización geográfica de los aislamientos.

Climas	Características		
<p>B – Climas Secos: La evaporación excede a la precipitación media anual. No hay remanente de agua.</p>	<p>S. Clima de estepa: Semiárido con precipitación anual de 380 a 760 mm en latitudes bajas.</p>	<p>h. Caluroso y seco: temperatura media anual superior a los 22 °C.</p>	<p>BSh Clima de estepa muy cálido</p> <p>BSk Clima de estepa fresco</p>
	<p>W. Clima desértico: Árido. Precipitación media anual inferior a los 250 mm.</p>	<p>k. Frío y seco: la temperatura media anual no supera los 22 °C.</p>	<p>BWh Clima de desierto muy cálido</p> <p>BWk Clima de desierto fresco</p>
<p>C – Climas templados: El mes más frío tiene una temperatura media inferior a 18°C, superior a -3°C. Poseen verano e invierno.</p>	<p>Cw. Clima lluvioso templado con invierno seco.</p>	<p>a. Con verano caluroso, en mes más cálido por encima de 22 °C.</p>	<p>Cwa Clima templado lluvioso con verano muy cálido y el invierno seco.</p>
	<p>Cf. Clima lluvioso templado húmedo en todas las estaciones.</p>	<p>c. Con verano corto y fresco, menos de cuatro meses por encima de los 10 °C.</p>	<p>Cfc Clima templado lluvioso con verano fresco y corto.</p>

Los aislamientos del grupo A, que se localizaron en el estado de Bahía en Brasil estuvieron distribuidas en un área que presentó las características de un clima seco de estepa, caluroso y árido (**BSh**); mientras que los que se localizaron en la provincia de Río Negro correspondió a una zona con características de clima seco desértico y frío (**BWk**).

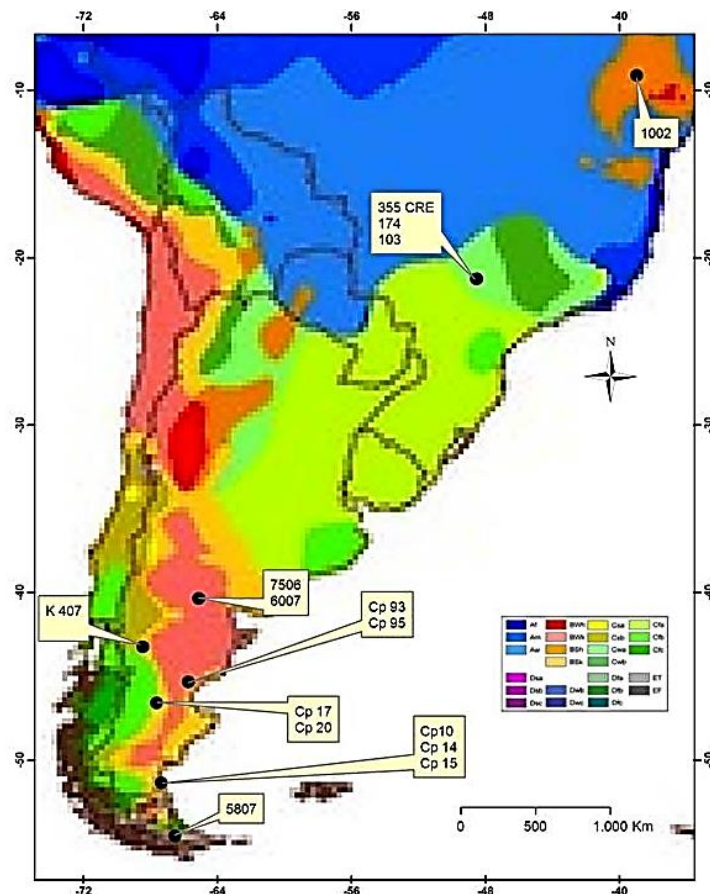
En el grupo B, el aislamiento localizado en el estado de San Pablo en Brasil correspondió a una región con características de un clima templado lluvioso con verano muy cálido y el invierno seco (**Cwa**), mientras que las ubicadas en la provincia de Chubut (departamento Languiño y departamento Escalante), provincia de Santa Cruz (departamento Deseado y Güer Aike) estuvieron distribuidas en una zona que presentó un clima seco de estepa y frío (**BSk**).

En el grupo C, los aislamientos localizados en el estado de San Pablo quedaron distribuidos en una región que presentó las características de un clima templado lluvioso con verano muy cálido y el invierno seco (**Cwa**); mientras que el aislamiento que se situó en el estado de Bahía correspondió a un área con características de un clima seco de

estepa, caluroso y árido (**BSh**). Los aislamientos que se ubicaron en la provincia de Río Negro estuvieron distribuidos en una región que mostró un clima seco desértico y frío (**BWk**) y los situados, en la provincia de Chubut (departamento Languiñeo y departamento Escalante) y provincia de Santa Cruz (departamento Deseado y Güer Aike) correspondieron a un área que presentó clima seco desértico y frío (**BSk**). El aislamiento que se localizó en la provincia de Tierra del Fuego se encontró en una zona con características de un clima templado lluvioso con verano fresco y corto (**Cfc**).

Los 15 aislamientos que se seleccionaron a partir de los grupos A, B, C que surgieron del análisis multivariado, se distribuyeron en Brasil y en la Patagonia Argentina (figura 62). De acuerdo a la clasificación de climas según Köppen surge nuevamente que los aislamientos se localizaron en zonas con clima lluvioso y templado y con clima seco (escasas precipitaciones).

Figura 62: Selección de aislamientos- clasificación de climas según Köppen.



CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Esta investigación se inició debido a que la LC está muy difundida y arraigada en la zona patagónica, siendo un riesgo sanitario para la producción ovina; además hay ausencia de datos regionales respecto de los factores de virulencia de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, de Patagonia Argentina. Es así que, el propósito de este trabajo fue, estudiar las características morfológicas, fisiológicas, metabólicas y de virulencia en aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, aislados de lesiones de LC en pequeños rumiantes, en la región Patagónica y determinar si existía relación entre estos aislamientos locales y de otras regiones con alta prevalencia de LC.

Los aislamientos estudiados en este trabajo fueron provenientes de las dos formas clínicas (cutánea y visceral) en las que se presenta la LC, en pequeños rumiantes, como lo sugieren otros autores (Euzéby, 1999; León-Viscaíno *et al.*, 2002; Ponce de León Filho & Gomes Pereira, 1983; Yeruham *et al.*, 2000). Es así que el 71 % de los aislamientos correspondieron a LC forma cutánea y los restantes se recuperaron de absceso pulmonar, absceso renal, absceso testicular y linfonódulos profundos. Sin embargo Delgado *et al.* (2015) reportaron que la forma visceral fue la presentación clínica más prevalente en ovejas.

Las observaciones microscópicas (morfología bacteriana, tinción de Gram) y las pruebas preliminares de los aislamientos estudiados correspondieron al género *Corynebacterium*. En lo que respecta a la morfología de esta bacteria, en este trabajo las imágenes de la microscopía electrónica de barrido mostraron cocobacilos pleomórficos de 1,06 - 1,17 μm de largo por 0,6 μm de ancho y la distribución en empalizada de los cocobacilos así como también agrupados; esto es similar a lo que sugieren otros autores, que reportaron que es un bacilo de 1 -3 μm largo x 0,5 - 0,6 μm ancho (Aleman & Spier, 2001; Corache García Pulido, 2017; Dorella *et al.*, 2006; Estevao Belchior *et al.*, 2007; Fernández Natal, 2009; Graevenitz & Krech, 1992; Solanet *et al.*, 2011; Szwako *et al.*, 2014).

De las dos biovariedades existentes, los aislamientos analizados en este trabajo, no fueron productores de la enzima nitrato reductasa y por ello se clasificaron como *C. pseudotuberculosis* biovariedad *ovis* (Songer *et al.*, 1988).

Microorganismos nitrato positivo (biovar equi) han sido aislados de caballos y vacas; mientras que nitrato negativo (biovar ovis) se encontraron en ovejas, cabras y vacas (Brown & Olander 1987, Songer *et al.*, 1988).

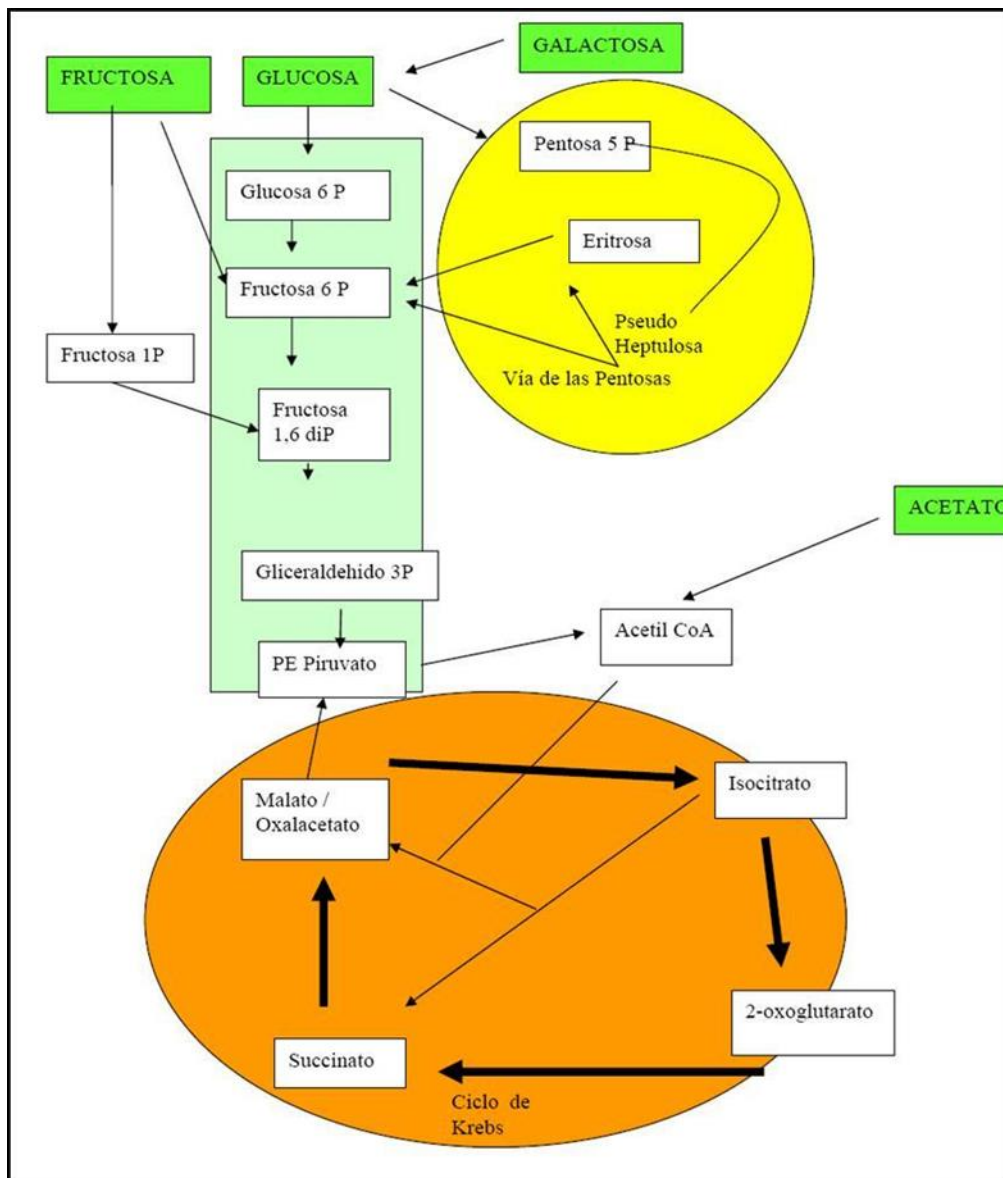
Estudios realizados por Songer *et al.* (1988) identificaron estos dos patrones genotípicos diferentes asociados a la capacidad de reducir nitratos.

Las características bioquímicas obtenidas coincidieron con las informadas por otros autores (Literak *et al.*, 1999; Pepin *et al.*, 1989; Songer *et al.*, 1988). En este trabajo, con respecto a la fermentación de los azúcares el 100 % de los aislamientos de origen caprino y ovino, tanto en la presentación clásica o cutánea como en la visceral y procedentes de ambos países, mostraron el mismo perfil a excepción de la maltosa.

Las bacterias del género *Corynebacterium* utilizan carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono; de este modo la glucosa y el acetato pueden ser empleados para la síntesis de aminoácidos. El acetato es convertido a Acetil CoA, la que a su vez produce aminoácidos y energía, la ruta es apoyada por el ciclo de glioxilato como una ruta anaplerótica. La mayoría de los estudios de las rutas metabólicas en este género han sido realizados principalmente en *C glutamicum*, como se observa en la figura 6 3 (Barrientos Padilla *et al.*, 2008).

Otros autores informaron también variantes fenotípicas en relación a la fermentación de la maltosa en aislamientos de *C. pseudotuberculosis* en ovejas. Entre ellos Barrientos Padilla *et al.* (2008) describen diferentes biotipos que compara de acuerdo a su frecuencia en la presentación visceral o cutánea. Informaron que el biotipo de *C. pseudotuberculosis* Gluc⁺Gal⁺Malt⁺ se halló con mayor frecuencia en la presentación visceral, en tanto que los biotipos Gluc⁻Gal⁻Mal⁻ o Gluc⁻Gal⁻Mal⁺ predominaron en la presentación cutánea.

Según esta clasificación, los aislamientos estudiados en este trabajo correspondieron a los biotipos Glu⁺Gal⁻Mal⁻ o Glu⁺Gal⁻Mal⁺. El 100% de los aislamientos no fueron productores de la enzima βGAL. El 33 % de los aislamientos de origen ovino y provenientes de Argentina presentó el biotipo Glu⁺Gal⁻Mal⁻. Los aislamientos de Argentina restantes al igual que los procedentes de Brasil fermentaron la maltosa, haciendo referencia al biotipo Glu⁺Gal⁻Mal⁺. Este biotipo se observó en la presentación cutánea, mientras que el biotipo Glu⁺Gal⁻Mal⁻ se manifestó en la presentación visceral como también en la cutánea.

Figura 63: Rutas Metabólicas en *Corynebacterium spp.*

Fuente: Barrientos Padilla *et al.*, (2008).

Por otra parte, Connor *et al.* (2000) que realizaron estudios por medio de campos pulsados, mencionan que los aislamientos de ovejas tanto de la presentación visceral como cutánea, son iguales genética y bioquímicamente.

Muckle & Gyles (1982), trabajaron con aislamientos de lesiones de LC en cabras y evidenciaron resultados variables para la utilización de galactosa, al igual que Barrientos Padilla *et al.* (2008) y también de trehalosa. Por otro lado, Barksdale *et al.* (1981) en aislamientos de referencia de *C. pseudotuberculosis* informó resultados variables para la utilización de galactosa, fructosa y almidón.

Asimismo se reportaron resultados variables en la utilización de maltosa en estudios realizados por Hommez *et al.* (1999). Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de leche de vacas con mastitis, fermentaron la glucosa y ribosa, siendo variable la utilización de maltosa y negativa la de sacarosa y glicógeno. Songer *et al.* (1988), informaron que el 97 % de aislamientos biovariedad ovis (n: 69) y 44 % de aislamientos biovariedad equi (n: 25) fermentaron la maltosa. Mientras que los aislamientos que no fermentaron la maltosa, se presentaron mayormente en la biovariedad equi.

Asimismo, Chirino-Zarraga *et al.* (2005) en la identificación de 44 aislamientos de cabra, reportaron resultados semejantes a este trabajo para la fermentación de glucosa, lactosa y xilosa; sin embargo el 100 % de los aislamientos fueron positivos para la fermentación de maltosa a diferencia de lo obtenido en la presente investigación. De igual manera Tejedor-Junco *et al.* (2008) informaron en aislamientos procedentes de abscesos en camello un perfil semejante al de este trabajo, pero con resultados positivo para la fermentación de maltosa.

Al respecto otros autores que han investigado aislamientos provenientes de cabras y ovejas, señalaron resultados positivos para la fermentación de glucosa, maltosa, manosa y almidón y resultados negativos para arabinosa, lactosa, trehalosa, xilosa, inositol y sacarosa (Literak *et al.*, 1999; Mohan *et al.*, 2008).

Barrientos Padilla (2008) atribuye que estos resultados pueden ser interpretados como una posible selección de diferentes biotipos del microorganismo influidos por el medio ambiente tisular en el que se encuentra la bacteria. Este proceso estaría relacionado con los factores auxiliares de virulencia diferenciales para las dos presentaciones, siendo necesario evaluar si se trata de variantes genéticas asociadas a procesos de mutación y selección bacteriana o a diferentes especies.

En cuanto a la caracterización genotípica el gen *rpoB* es el que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa ADN- dependiente, sin embargo hay varias líneas de evidencia que sugieren su relación con la resistencia a rifampicina. Recientemente secuencias de *rpoB*, se utilizan como una herramienta alternativa para la determinación de la filogenia de algunas bacterias entéricas, *Borrelia*, *Mycobacterium* y *Bartonella*. Dorella *et al.* (2006) han utilizado los genes *rpoB* y 16S ARNr para construir un árbol filogenético del género *Corynebacterium*. Este estudio mostró que *C. pseudotuberculosis* está más estrechamente relacionado con *C. ulcerans* que con *C. diphtheriae*. Si bien los tres pertenecen al mismo grupo en la clasificación de corinebacterias (D'Afonseca *et al.*, 2008).

El gen *rpoB* es más grande (3500 pb) que 16S ARNr (1500 pb). Se han encontrado primers para amplificar zonas hipervariables (fragmentos 434-452 pb) en *rpoB*, de manera de amplificar una pequeña parte pero discriminativa en la identificación de especies de *Corynebacterium*, mientras que con 16S ARNr no hay secuencia corta que permita la identificación precisa (Vay & Famiglietti, 2009).

Con respecto a la sensibilidad antibiótica, CLSI y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) publican puntos de corte para la concentración inhibitoria mínima (CIM) para el género *Corynebacterium*. Sin embargo CLSI a diferencia de EUCAST no establece puntos de corte para la técnica de sensibilidad antibiótica por difusión en agar. Siendo esta técnica ampliamente utilizada en la práctica diaria en el laboratorio porque nos permite realizar un seguimiento del perfil antibiótico; de manera de analizar el comportamiento de las resistencias bacterianas a través del tiempo.

Es así que, aplicando los criterios de CLSI para *Staphylococcus* spp., por difusión en agar, el antibiótico amicacina mostró resultados variables y el resto de los antibióticos fueron activos frente al 100 % de los aislamientos, coincidiendo con otros autores (CLSI M100-S, CLSI M100-S17; Estevao Belchior *et al.*, 2007; Funke *et al.*, 1997). Entre los aminoglucósidos ensayados en este trabajo, amicacina no fue activa frente al 62 % de los aislamientos de Argentina y un 50 % frente a los aislamientos de Brasil, a diferencia de gentamicina, kanamicina y estreptomycin que inhibieron el desarrollo de todos, tanto los procedentes de Argentina como los de Brasil. De los β -lactámicos ensayados por difusión en placa, solamente oxacilina fue ineficaz frente al 74 % de los aislamientos de Argentina, mientras el 100 % de los aislamientos procedentes de Brasil no desarrollaron frente a este antibiótico. Además, los resultados de penicilina, eritromicina, gentamicina y ciprofloxacina fueron evaluados según los puntos de corte propuestos por Barberis *et al.* (2018) para *Corynebacterium* spp. La interpretación para penicilina y ciprofloxacina no se modificó, pero sin embargo para eritromicina y gentamicina surgieron aislamientos con actividad intermedia: 17 y 20 %, respectivamente. Macrólidos y lincosamidas en los comienzos de 1980 eran considerados una buena alternativa terapéutica para corinebacterias, pero en los últimos años se ha observado un incremento progresivo en la resistencia a estos antibióticos (Barberis *et al.*, 2018). Los valores obtenidos de gentamicina también se compararon con los puntos de corte de EUCAST (EUCAST - 2018) y se observó que el 43 % del total de los aislamientos (provenientes de Argentina y de Brasil) presentó resistencia a este antibiótico.

Otros autores sin embargo, han reportado mecanismos de resistencia a las tetraciclinas, en el género *Corynebacterium* (Barberis *et al.*, 2018; Funke *et al.*, 1996).

Trabajos realizados con aislamientos de esta especie, de distintos orígenes, mostraron diferentes patrones de sensibilidad a antimicrobianos. Tal es el caso de aislamientos procedentes de ovejas y cabras en Venezuela que fueron informados como resistentes para penicilina y trimetroprima-sulfametoxazol (Delgado *et al.*, 2015).

En dos aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis procedentes de huemules de la región de Aysén (Chile), uno de ellos fue inhibido por estreptomycin mientras que el otro resultó resistente a este antibiótico y a ciprofloxacina (Morales *et al.*, 2017). En la misma biovariedad aislada de camello (*Camelus dromedarius*) los antibióticos ampicilina, eritromicina, penicilina, tetraciclina y estreptomycin resultaron total o parcialmente ineficaces (Hawari, 2008).

La resistencia a antibióticos aminoglucósidos y β -lactámicos ha sido comunicada para las corinebacterias (Barberis *et al.*, 2018; Nesvera *et al.*, 1998; Schröder *et al.*, 2012). Algunos autores sugieren que el biotipo que infecta a ovejas y cabras, sería resistente a los aminoglucósidos debido a mecanismos de impermeabilidad y relacionados con la incapacidad de producir la enzima nitrato reductasa (Judson & Songer, 1991).

Además, para el género *Corynebacterium*, la adquisición y diseminación de resistencia a aminoglucósidos y β -lactámicos fue relacionada a la presencia de integrones. En particular, en *Corynebacterium resistens* DSM 45100 y *Corynebacterium glutamicum* se han identificado integrones plasmídicos clase 1 (Nesvera *et al.*, 1998; Schröder *et al.*, 2012). En los aislamientos, que desarrollaron frente a aminoglucósidos y β -lactámicos, se investigó la presencia de integrones de clase 1. El resultado fue negativo, sugiriendo la ausencia del integrón.

Con respecto a las pruebas de dilución, los métodos epsilométricos resultan una alternativa útil para la determinación de la sensibilidad, especialmente por su sencillez y la facilidad de interpretación. Además, muestran buena correlación de CIM obtenidas por microdilución y dilución en agar para analizar la sensibilidad de corinebacterias (Funke *et al.*, 1997). La determinación de CIM a través de M.I.C.E Evaluator™, es una alternativa a los métodos de microdilución. Trabajos previos demuestran que la CIM obtenidas por esta metodología se correlacionan con las categorías interpretativas de los métodos de dilución y con las de epsilométricos (Rennie *et al.*, 2012; Simpson-Louredo *et al.*, 2014).

Considerando los valores de CIM₉₀, los compuestos más eficaces fueron ciprofloxacina y eritromicina (0,06 y 0,03 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), seguidos por tetraciclina, con valores

menores o iguales a 0,25 µg/mL. El 90 % de los aislamientos fueron inhibidos por concentraciones ≤ 1 µg/mL de cefotaxima y vancomicina. De acuerdo con los valores de CIM₉₀, los aislamientos mostraron sensibilidad intermedia para gentamicina y penicilina.

La penicilina es uno de los antibióticos de primera línea utilizado en el tratamiento de LC actualmente y a pesar de que se notificaron cepas resistentes, aún no está claro el mecanismo de resistencia (Barberis *et al.*, 2018; Delgado *et al.*, 2015; Rhodes *et al.*, 2015).

Por otra parte, el punto de corte de sensibilidad establecido por CLSI para la penicilina fue reducido: de 1 a 0,125 µg/mL, recientemente (CLSI 2016; M45-3rd Edition). Costa *et al.* (1998) en comparación con este trabajo reportaron aislamientos de *C. pseudotuberculosis* inhibidos por concentraciones mayores, para eritromicina (CIM₅₀: $\leq 0,25$ µg/ml - CIM₉₀: $\leq 0,25$ µg/mL) y tetraciclina (CIM₅₀: ≤ 1 µg/mL - CIM₉₀: ≤ 1 µg/mL) y por el contrario por concentraciones menores para gentamicina (CIM₅₀: 1 µg/mL y CIM₉₀: 2 µg/mL).

En esta investigación, utilizando los valores de corte del CLSI M45 (2016) como los de EUCAST (2018), se observó que el 100 % de los aislamientos fue sensible a los antibióticos ensayados dentro del grupo de los glucopéptidos y tetraciclinas como vancomicina y tetraciclina respectivamente.

Si bien la mayoría de los antimicrobianos fueron eficaces frente a *C. pseudotuberculosis in vitro*, sería probable que la mejor actividad *in vivo* se limitase a fármacos con buena solubilidad lipídica y actividad intracelular, como por ejemplo macrólidos y fluoroquinolonas. La eritromicina es un antibiótico eficaz que presenta alta solubilidad en lípidos, buena penetración en los tejidos y actividad en ambientes ácidos característicos de las lesiones granulomatosas de la LC.

En este trabajo los antibióticos pertenecientes a los grupos de cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas fueron los más activos para los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis. Se demostró menor actividad de β -lactámicos y aminoglucósidos. No se registró variabilidad en los perfiles antibióticos en los aislamientos procedentes de diferentes fuentes (Gallardo *et al.*, 2019).

Finalmente al respecto consideramos que dado que *C. pseudotuberculosis* puede afectar a distintas especies animales, es importante conocer el perfil de actividad de antibióticos por la gran variabilidad que presentan las poblaciones bacterianas y las modificaciones que eventualmente se incorporan a los puntos de corte propuestos por las entidades CLSI y EUCAST; además es importante conocer el perfil antibiótico para el tratamiento principalmente para ovinos de reproducción como es el caso de los carneros puros de pedigrí.

En este trabajo también se investigaron factores de virulencia de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*. Es así que el análisis químico de los ácidos grasos celulares, especialmente de aquellos con cadena β -hidroxilada y ramificada de alto peso molecular, los ácidos micólicos, se ha utilizado como una prueba rápida para la sistemática micobacteriana.

El análisis del éster metílico del ácido micólico mediante cromatografía en capa fina (TLC) ha sido empleado por varios laboratorios de todo el mundo como un método rápido para la identificación de bacterias que tienen AM en su pared celular. Los AM se pueden clasificar en varios tipos según la presencia de diferentes grupos funcionales en sus moléculas (tabla 27) (Leite *et al.*, 1998, Minnikin *et al.*, 1975).

TABLA 27: Clasificación de tipos de ácidos micólicos y grupos funcionales presentes.

TIPO	CARACTERÍSTICAS	ESTRUCTURAS DE A
I	No Oxigenado	$\begin{array}{c} -\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH} \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2 \end{array}$
II	Monoinsaturado	$-\text{CH}_3 \text{ (No tiene R)}$
III	Metoximicolato	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{OCH}_3 \end{array}$
IV	Cetomicolato	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{O} \end{array}$
V	Epoximicolato	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}- \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$
VI	Dicarboximicolato	$\text{HO}-\text{CO}- \text{ (No tiene R)}$

Fuente: Serrano *et al.*, 2005

Los AM son ácidos grasos α -ramificados y β -hidroxilados de alto peso molecular (C₇₀-C₉₀) que se encuentran presentes en todas las especies de micobacterias. También están presentes en corinebacterias (longitud de la cadena de carbono de 30-40) y nocardias, pero las cadenas de sus ácidos grasos (AG) no son tan largas como en las micobacterias (longitud de la cadena de carbono de 80-88) (tabla 28). Los AM se encuentran principalmente esterificando al AG y también de forma fluida esterificando trehalosa (TDM), o monomicolatos de trehalosa (MMT). Se conocen dos familias de ácidos micólicos: α -micolatos, sin ningún grupo funcional oxigenado, y los micolatos oxigenados. La α -ramificación de los AM se conserva en todas las familias variando su longitud. Está compuesta por una cadena insaturada cuyo tamaño puede variar entre 20-26 átomos de carbono. La β -ramificación puede variar entre 40-60 átomos de

carbono, presentar una o dos insaturaciones (dobles enlaces o anillos de ciclopropano) y grupos ceto, epoxi, metoxi, o carboxílicos estableciendo así la principal clasificación de los micolatos (Serrano *et al.*, 2005).

Tabla 28: Relación entre la longitud de la cadena hidrocarbonada y los microorganismos.

Microorganismo	Ácidos Micólicos
Corinebacterias	-(C28-C36)
Rhodococcus	-(C42-C48) o -(C60-C66)
Nocardias	-(C50-C56)
Micobacterias	-(C62-C83)

Fuente: Serrano *et al.*, 2005

En la presente investigación para la extracción de ésteres micólicos de AM se aplicaron dos técnicas: la técnica propuesta por Minnikin *et al.* (1975) con modificaciones y Chiani *et al.* (1996) y Zerbini *et al.* (1996) con modificaciones; luego se separaron por cromatografía en capa delgada y se visualizaron mediante tinción con vapores de yodo y ácido fosfomolibdico respectivamente.

Con la primer técnica no se observó una buena definición de los ésteres micólicos de AM resultantes de la extracción por metanólisis ácida y revelado con vapores de yodo; por lo tanto se aplicó la técnica propuesta por Chiani *et al.* (1996) y Zerbini *et al.* (1996), que consiste en una hidrólisis básica, esterificación y revelado con ácido fosfomolibdico.

Los cromatogramas, aplicando metanólisis ácida, solo revelaron la presencia de una mancha característica, en todos los aislamientos de corinebacterias; la misma era comparable con el AM tipo IV: cetomicolato, como lo describe Minnikin *et al.* (1975) y Goodfellow *et al.* 1976.

Sin embargo cuando se aplicó la técnica propuesta por Chiani *et al.* (1996) y Zerbini *et al.* (1996), los patrones de corrida de AM en la cromatografía revelaron la presencia de dos o tres manchas características en todos los aislamientos de corinebacterias comparables con AM tipos: IV, V y VI: cetomicolatos, epoximicolatos y micolatos dicarboxílicos respectivamente. Es así que, en el 53 % de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* locales se detectaron los tres tipos de ácidos micólicos: IV, V, VI; mientras que el 25 % correspondió a aislamientos procedentes de regiones de Brasil endémicas de LC. Los restantes aislamientos locales y de Brasil presentaron los dos tipos de ácidos micólicos: V y VI, IV y VI.

En cuanto a los sistemas de elución, cuando se empleó como solvente de desarrollo: diclorometano se obtuvieron manchas con Rf entre (0,27-0,31), (0,18-0,22) y (0,13-0,15) que corresponderían a AM tipo IV, V y VI respectivamente. Mientras que cuando se utilizó como solvente de desarrollo dietiléter/n-hexano (15:85) (v/v), los ésteres metílicos de AM presentaron un frente de corrida entre (0,27-0,29), (0,21) y (0,12-0,15) que corresponderían a AM tipo IV, V y VI respectivamente.

Los aislamientos de Argentina y de Brasil mostraron el mismo perfil de AM.

En la comparación de las técnicas surge que la metodología propuesta por Minnikin *et al.* (1975) presentó distorsión en la mancha lo que dificultó la lectura de los Rf. Con la técnica de Chiani *et al.* (1996) y Zerbini *et al.* (1996) con modificaciones que utiliza otro sistema de extracción se logró mejor resolución y la separación de tres manchas correspondientes a los AM tipo IV, V, y VI, a diferencia de Minnikin donde se pudo visualizar una sola mancha.

La vía de síntesis de la envoltura celular que incluye la capa de ácido corinomicólico en corinebacterias es compleja y no está totalmente dilucidada. La capa de AM presenta un carácter hidrófobo por lo que funciona como una barrera para la permeabilidad impidiendo el acceso de sustancias e interfiriendo en la sensibilidad a antibióticos, especialmente los antibióticos β -lactámicos. Se ha reportado que no todas las especies patógenas del género *Corynebacterium* poseen AM en la pared bacteriana (Ott, 2018).

Se conoce información sobre la presencia de AM en *C glutamicum*, *C diphteriae* y *C ulcerans*, aunque este dato es escaso para *C. pseudotuberculosis* (Burkovski, 2018).

Se hace necesario resaltar que este trabajo aportó información sobre los AM presentes en aislamientos *C. pseudotuberculosis* locales y de regiones endémicas de LC de Brasil.

Otras investigaciones sobre *C. pseudotuberculosis*, reportaron un efecto letal de lípidos de micomembrana en macrófagos de cabras y murinos como también extractos lipídicos de *C. pseudotuberculosis* tuvieron efectos negativos sobre la actividad glucolítica, la integridad de la membrana y la viabilidad de las células (Ott, 2018).

Dentro de este marco de factores de virulencia, se determinó también la exotoxina de *C. pseudotuberculosis*, una esfingomielinasa (fosfatidilcolina fosfohidrolasa, EC 3.1.4.4), más conocida como fosfolipasa D (Brogden *et al.*, 1990; Brown & Olander, 1987, Kouker & Jaeger, 1987).

La fosfolipasa D no se ha detectado en células mamíferas. Sin embargo, aunque esta enzima es desconocida en otras partes del reino animal, se presenta en la naturaleza en los arácnidos, y también es un componente importante de las toxinas de algunas bacterias,

incluidas *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, *Arcanobacterium haemolyticum* y *Vibrio damsela*.

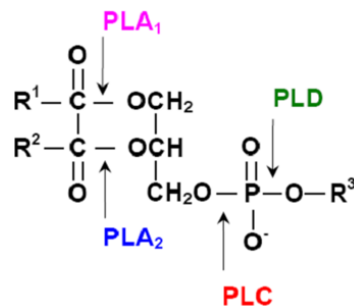
Los primeros estudios *in vitro* de esta exotoxina sugirieron que la responsable de la hidrólisis de fosfolípidos, la inhibición de la hemolisina del *S. aureus* y la interacción sinérgica con la hemolisina de *R. equi*, era una proteína simple con actividad enzimática (Coyle & Lipsky, 1990; Mohan *et al.*, 2001).

Por otra parte, la fosfolipasa D cataliza la escisión de la esfingomielina, un fosfolípido que está presente en la membrana plasmática de las células, donde tiene roles estructurales como funcionales. Los dos productos principales de la actividad de la fosfolipasa D son: ceramida 1-fosfato (C1P) y colina. Mientras que este último es un metabolito biológicamente inerte, C1P es biológicamente activo (Rivera *et al.*, 2015).

Igualmente, se ha demostrado que ésta funciona como un factor permeabilizante (Carne & Onon, 1978, Dorella *et al.*, 2006). El primer sitio de acción de la exotoxina es sobre la membrana celular de los eritrocitos y sobre la membrana endotelial de los vasos sanguíneos, hidrolizando la esfingomielina, provocando la salida de plasma desde pequeños vasos sanguíneos al sitio de infección e incrementando la probabilidad de diseminación a los nódulos linfáticos regionales (Dorella *et al.*, 2006; Onon, 1979). Esta exotoxina se encuentra en el citoplasma y en pequeña cantidad en la pared celular, es excretada al exterior, ya que se recoge en grandes cantidades en el sobrenadante del caldo de cultivo del microorganismo. (Brown & Olander, 1987). Estructuralmente es una glicoproteína (Onon, 1979).

Las fosfolipasas se clasifican como A1, A2, C o D (figura 64), dependiendo del enlace éster que escinden; las fosfolipasas C y D son consideradas fosfodiesterasas.

Figura 64: Centros de acción de las fosfolipasas.



El gen *pld* codifica para la exotoxina denominada fosfolipasa D (FLD), una esfingomielinasa implicada en la virulencia de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* y *A. haemolyticum* (Pacheco *et al.*, 2007). En el 100 % de los aislamientos, de este trabajo, se determinó el gen *pld* por PCR. Aunado a esto, los aislamientos presentaron reacción positiva

para las pruebas de CAMP, CAMP reversa, que evidenciaron la producción de fosfolipasa D. Ambas pruebas son claves para la identificación de *C. pseudotuberculosis*, dado que permiten la expresión del principal factor de virulencia de este microorganismo (Songer, 1997).

La masa molecular aparente obtenida bajo condiciones de desnaturalización del SDS-PAGE, fue de 29,55 kDa y se asemeja a resultados reportados por otros autores para la misma especie bacteriana (Ghoneim *et al.*, 2001). Otros trabajos reportan masa molecular aparente de 33 kDa para toxinas de *Corynebacterium*.

En 1989, Egen *et al.* plantearon que la toxina tenía entre 31,7 kDa. Costa (2002) indica un peso molecular de 31,5 kDa para la exotoxina; Paule *et al.* (2003) y Moura-Costa *et al.* (2008) y, Aquino de Sá (2018) reportaron peso molecular de 31 kDa. Estos hallazgos de la literatura muestran que cada cepa puede presentar diferentes perfiles de SDS-PAGE, lo que indica la ocurrencia de algunas moléculas estructurales específicas y otras coincidentes, además de diferencias en las técnicas empleadas de extracción o de evaluación de la inmunidad (Aquino de Sá, 2018).

Además, en los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* estudiados se registró un 100 % de actividad hemolítica en sangre de oveja, confirmando la producción de fosfolipasa D. El 3 % de los aislamientos no presentaron hemólisis sobre eritrocitos humanos y ninguno tuvo acción sobre eritrocitos de equino, este resultado podría deberse a la composición fosfolípida específica de la membrana eritrocitaria de cada especie de mamífero.

Las hemolisinas son un grupo de enzimas producidas por bacterias que contribuyen a su virulencia provocando la lisis de los glóbulos rojos. Las bacterias producen diversas hemolisinas que se diferencian por la clase de glóbulos rojos que lisan (humanos, de cordero, de conejo, etc.) y el tipo de lisis que provocan. Importantes productores de hemolisinas son los estafilococos, estreptococos y *Clostridium perfringens* (Koneman *et al.*, 2007).

En esta investigación se observó que los aislamientos mostraron un perfil enzimático similar al comunicado por Barksdale *et al.* (1981) y Muckle & Gyles (1982), que trabajaron con cepas de referencia y con cepas provenientes de lesiones de LC en cabras, respectivamente. Chirino-Zarraga *et al.* (2005) en cabras reportaron resultados de aislamientos de *C. pseudotuberculosis* que no hidrolizan caseína pero el 100 % hidrolizó almidón. Otros autores como Dorella *et al.* (2006), señalaron resultado negativo para la hidrólisis de caseína en el 90 % de los aislamientos y Mohan *et al.* (2008), presentaron resultados positivos para la producción de gelatinasas, a diferencia de lo obtenido en este trabajo.

La catalasa, actúa inactivando el peróxido de hidrógeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema mieloperoxidasa dentro de las células fagocíticas después de la ingestión de los microorganismos. Esto le otorgaría capacidad de vida intracelular en macrófagos, al *C. pseudotuberculosis* (Koneman *et al.*, 2007). En este estudio el 100 % de los aislamientos fueron productores de catalasa.

En cuanto a la actividad lipolítica, las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC.3.1.1.3) son producidas por varios microorganismos (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*) ya sean solas o en conjunto con esterases. Las lipasas “auténticas” muestran preferencia por sustratos altamente hidrofóbicos, insolubles y agregados; son específicas para acilgliceroles y otros ésteres con ácidos grasos de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono), siendo la trioleína su sustrato de referencia, mientras que las carboxilesterasas actúan sobre sustratos más solubles y con un grado de hidrofobicidad más variable; actúan específicamente sobre acilgliceroles de cadena corta (< 10 átomos de carbono) y otros ésteres simples, siendo la tributirina su sustrato estándar (Jaeger *et al.*, 1999; Ruiz Ruedas, 2006). No obstante, estos dos tipos de enzimas se pueden diferenciar generalmente sobre la base de otras características, varias de ellas relacionadas directamente con la especificidad de sustrato. Además, las lipasas “auténticas” muestran un mayor número de aminoácidos no polares pequeños localizados en las zonas expuestas al solvente y en la región del centro activo que las carboxilesterasas, así como un rango de sustratos más amplio y estereo especificidad, una mayor estabilidad en solventes orgánicos y un potencial electrostático en el centro activo más básico que las carboxilesterasas (Bornscheuer, 2002; Ruiz Ruedas, 2006). En general las lipasas microbianas son enzimas extracelulares, aunque generalmente se encuentran unidas a la membrana externa de las células por interacciones iónicas; este fenómeno provoca una inhibición de la producción de lipasas. No obstante, en presencia de cationes como el magnesio, las lipasas adsorbidas a la pared celular de los microorganismos pueden ser liberadas al medio extracelular, incrementando así los niveles de enzima obtenidos en el medio de cultivo (Crueger & Crueger, 1993).

El screenig para evaluar la producción de lipasas en placas, se realiza frecuentemente utilizando tributina o Tween 80 como sustrato. Estos sustratos no son convenientes para detectar lipasas verdaderas o auténticas porque también son hidrolizados por esterases. La existencia de lipasas debe ser verificada aplicando otros métodos donde se utilice como sustrato trioleoilglicerol (triolein), que es un sustrato ideal para lipasas. El aceite de oliva es un sustituto económico para el trioleoilglicerol (Kouker & Jaeger, 1987).

En este trabajo el 100 % de los aislamientos presentó actividad carboxilesterasa y no se detectó actividad de lipasa verdadera o auténtica.

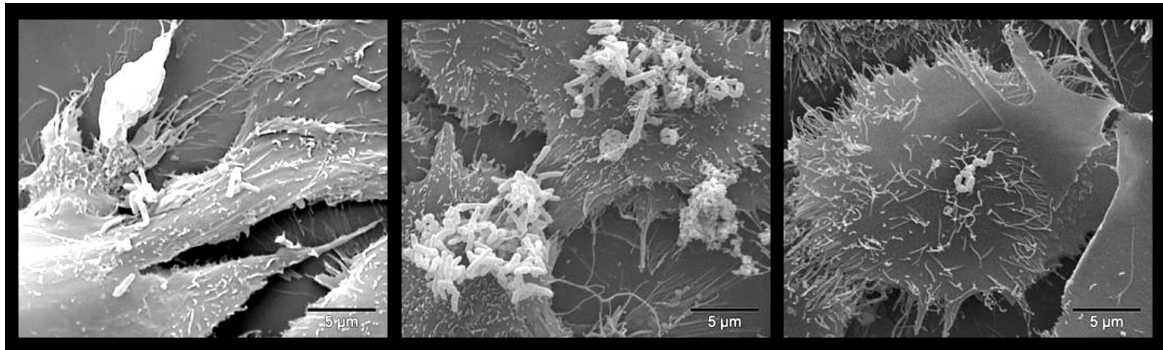
Los resultados de los diferentes ensayos confirman la producción de la fosfolipasas y otras enzimas y sugieren el papel de estas enzimas en los efectos citopáticos que se observaron en los cultivos celulares, en esta investigación.

En tal sentido, estructuras de la superficie celular tales como las fimbrias, otras proteínas, lipopolisacáridos (LPS), sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y flagelos juegan claramente un papel importante en el proceso de adherencia. Polímeros de la superficie celular con sitios no polares tales como fimbrias, otras proteínas y componentes de ciertas bacterias Gram positivas (ácidos micólicos) parecen dominar la adherencia a los sustratos hidrófobos, mientras que las SPE y los lipopolisacáridos son más importantes en la fijación a los materiales hidrofílicos. Los flagelos son importantes en la adherencia también, aunque su papel puede ser vencer fuerzas repulsivas en lugar de actuar como adsorbentes o adhesivos (Donlan, 2002).

Es así que, en este trabajo se aplicó microscopia electrónica de barrido, que permitió evaluar que los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* presentaron adherencia a las líneas celulares MDBK. Al igual que Weibel (2011), las observaciones con microscopia electrónica de barrido indican que la unión bacteriana tenía un efecto directo pero extremadamente localizado sobre la estructura de la membrana, induciendo la formación de pseudópodos de membrana y posterior envoltura de la bacteria. Este proceso de absorción es una reminiscencia del mecanismo de fagocitosis "similar a una cremallera" involucrado en la invasión de *L. monocytogenes*, *Helicobacter pylori* o *C. diphtheriae*. El mecanismo de "cremallera" es caracterizado por la invaginación de la membrana de la célula huésped en el sitio de unión bacteriana y el grado en que la membrana "se cierra" alrededor de toda la superficie de la bacteria. Las proyecciones de la membrana están por lo tanto mediadas por reordenamientos del citoesqueleto en el área de entrada de la bacteria, un proceso generalmente iniciado por moléculas de señalización del huésped. Weibel (2011), trabajó con células fibroblasto de riñón de mono verde africano (BGM), a diferencia de este estudio.

Asimismo otros autores como Ott (2018), que trabajó con tres especies de corinebacterias, entre ellas *C. pseudotuberculosis* y determinó que pueden adherirse a las células epiteliales de una manera específica de acuerdo a la cepa (figura 65). Este autor realizó infección de células Detroit 562 con tres especies diferentes de corinebacterias durante 90 minutos en condiciones de cultivo celular.

Figura 65. Microscopía electrónica de barrido de *C. diphtheriae* ISS4060, *C. ulcerans* BR-AD22 y *C. pseudotuberculosis* FRC41 adheridos a las células Detroit562.



Fuente: Ott, 2018

Por lo tanto los aislamientos analizados de *C. pseudotuberculosis* en este trabajo mostraron la capacidad de adherirse a células no fagocíticas, por mecanismos similares a otras bacterias y permanecer viables hasta 72 h induciendo efectos citopáticos en las células MDBK.

En tal sentido es importante destacar que en este trabajo, el aislamiento 7506 proveniente de absceso testicular de cabra de Argentina fue el que presentó mayores efectos citopáticos; esto podría influir la calidad del esperma por degeneración testicular progresiva, que podría resultar indirectamente de exotoxinas producidas por *C. pseudotuberculosis*; es así que se resalta la necesidad de evaluar y erradicar la LC, ya que puede tener efectos nocivos sobre el éxito reproductivo en pequeñas granjas de cría de rumiantes; como sugieren otros autores (Stewart *et al.*, 2018; Umer *et al.*, 2017).

Umer *et a.* (2017) también reportaron que la LC es muy destructiva y una enfermedad altamente prevalente en áreas de cría de ovejas y cabras en todo el mundo. Causa pérdidas económicas no solo por afectar al animal sino también por la infertilidad que genera en estos pequeños rumiantes. Ellos aislaron *C. pseudotuberculosis* de los órganos reproductores y observaron que se generan cambios en la histología, características seminales, concentración hormonal y niveles de citosinas (IL-1 β e IL-6). Es así que ellos plantean que la LC en pequeños rumiantes sigue siendo un desafío para los científicos. De hecho, conocimiento exacto de la patogénesis de LC con respecto a su efecto sobre los órganos reproductores es aún escasa. Sin embargo, se necesitan más estudios en profundidad para evaluar la asociación entre LC, infertilidad y producción de citocinas en pequeños rumiantes.

Stewart *et al.* (2018) en su trabajo informaron casos de LC en pequeños rumiantes y en relación con las implicaciones de esta enfermedad ponderan la necesidad de erradicar *C.*

pseudotuberculosis en los pequeños criaderos de rumiantes debido a sus consecuencias potencialmente graves para la salud del rebaño y los efectos generalizados en todo el tracto reproductor.

Si bien en este trabajo, el análisis estadístico de los resultados no existe relación entre la capacidad de formación de biopelículas y la sensibilidad antibiótica, y *C. pseudotuberculosis* fue sensible *in vitro* a antibióticos usados comúnmente en el tratamiento de infecciones bacterianas, tales como penicilina, trimetoprima sulfametoxazol, tetraciclinas, eritromicina, cefalosporinas, cloranfenicol y rifampicina; hay que prestar especial atención en este punto porque la sensibilidad antibiótica determinada fue *in vitro* y no *in vivo*. Es así que otros autores (Aleman & Spier, 2001 y Estevao Belchior *et al.*, 2006) han reportado fracasos en las terapias *in vivo*, porque el microorganismo suele estar encapsulado dentro de un nódulo linfático.

Faleiro Naves (2010) indica que la sensibilidad a los agentes antimicrobianos es menor en bacterias asociadas a biopelículas. Esa resistencia dificulta la erradicación de los patógenos por antimicrobianos aunque estos fuesen activos en los ensayos *in vitro*.

En este trabajo todos los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* mostraron la capacidad de producir biopelículas y el mayor porcentaje correspondió a productores moderados (47 %). En aislamientos locales predominaron tanto los productores débiles (36 %) como los moderados (36 %) mientras que el 75 % de aislamientos de Brasil presentaron capacidad productora moderada de biopelículas y no se detectaron productores fuertes. Para evaluar la adhesión de aislamientos de *C. pseudotuberculosis*, se utilizó un método colorimétrico con cristal violeta. En un tiempo de al menos 24 a 48 horas se estimó la adherencia de las células teñidas después de la etapa de lavado, al igual que lo describieron otros autores. El uso de pruebas rápidas ha sido reportado para evaluar la formación de la biopelícula. Estas pruebas han sido validadas en cepas de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. xylosus*, y *S. carnosus*, las cuales tienen habilidad para formar biopelículas en acero inoxidable, poliestireno y vidrio (Navia *et al.*, 2010).

Por otro lado, Nazar (2007) describe que la resistencia que presenta la biopelícula, depende de la agregación de bacterias en comunidades multicelulares, una estrategia puede ser desarrollar terapias que rompan su estructura multicelular. Si la formación de la biopelícula es impedida las defensas del huésped pueden ser capaces de resolver la infección logrando de esta manera, restituir la eficacia de los antibióticos. Terapias potenciales incluyen enzimas que disuelvan los polímeros de la matriz, reacciones químicas que bloqueen la síntesis de la matriz

de la biopelícula y el empleo de análogos de proteínas y péptidos señalizadores que interfieran con la comunicación célula-a-célula, indispensable para la formación de una biopelícula.

Estos aspectos son coincidentes con los señalados por Soto (2013) que sugiere que la biopelícula es el principal mecanismo de persistencia utilizado por *L. monocytogenes*, un ABC-transportador, involucrado en la regulación negativa de la formación de biopelículas por *L. monocytogenes*, identificado como (Lm.G_1771ABC). Una mutante en uno de los componentes de este transportador ABC causa un aumento más fuerte en la capacidad de formar biopelículas. Este transportador puede ser una proteína de salida que exporta moléculas de señalización que activa un patrón de expresión del genoma característico de crecimiento planctónico de *L. monocytogenes* (Soto, 2013)

Por otro lado la contaminación ambiental debida a la dispersión de bacterias a partir de abscesos compatibles con LC es una amenaza real y la desinfección regular de las instalaciones es una medida importante para controlar la patología. Guimarães *et al.* (2011), reportaron que la desinfección de las instalaciones es muy importante porque algunos patógenos, como *C. pseudotuberculosis*, pueden sobrevivir durante largos períodos en el suelo. A través de la contaminación experimental de las instalaciones, se encontró que *C. pseudotuberculosis* puede sobrevivir hasta ocho meses a diversas temperaturas. Esta bacteria se ha aislado después de cinco meses en lugares donde ha habido contaminación con pus. Consideramos que esta supervivencia en condiciones adversas podría deberse a la formación de biopelículas, dado que todos nuestros aislamientos de *C. pseudotuberculosis* presentaron esta capacidad, en mayor o menor grado pero todos fueron formadores.

Al respecto Alvarez *et al.* (2017), reportaron que *C. pseudotuberculosis* sería capaz de sobrevivir a lo largo del tiempo en suelos de la Patagonia extraandina con diferentes aportes de materia orgánica y humedad, independientemente de otras variables, como el pH y la salinidad.

En esta investigación también se georreferenciaron los aislamientos en función de atributos diferenciales como especie animal, sitio de lesión, sensibilidad antibiótica, lugar origen geográfico y características climáticas. La aplicación de SIG ha adquirido en los últimos años importancia en estudios de epidemiología y la salud pública (Ascuntar-Tello & Jaimes, 2015). Además, Ascuntar-Tello & Jaimes (2015) plantean que el uso e implementación de los SIG generan conocimientos de la relación existente entre la distribución de una enfermedad y diversas características del entorno. El análisis basado en la geografía permite hacer diagnósticos de la situación de una patología a partir del punto de vista territorial, dado que se pueden considerar factores regionales como las variables ambientales de la zona, entre otros.

Así, estos sistemas proveen un gran apoyo para la planificación y toma de decisiones de las personas encargadas de formular políticas para la prevención y control de las enfermedades.

La aplicación de SIG permitió el abordaje de los resultados desde una visión interdisciplinaria. La distribución dispersa de los aislamientos condujo a realizar el análisis a partir de la variable clima que permitió encontrar una relación entre los aislamientos provenientes de provincias de la Patagonia Argentina y estados de Brasil.

Se observa que los puntos ubicados en Brasil se localizan en el noreste (estado de Bahía) y sureste (estado de San Pablo – Aracatuba). En tanto que en Argentina, los aislamientos se distribuyeron en la Patagonia Argentina, desde la provincia de Río Negro hasta Tierra del Fuego, mostrando una mayor dispersión. Se observó que, los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de ovejas y cabras se distribuyeron en ambos países. Los de origen caprino se localizaron puntualmente en el estado de Bahía (Brasil) y en la provincia de Río Negro (Argentina), mientras que los de origen ovino predominaron y presentaron una distribución geográfica más dispersa.

Considerando el sitio de lesión, los aislamientos provenientes de riñón, pulmón, testículo y linfonódulo profundo se localizaron puntualmente en la región patagónica (Argentina), mientras que los procedentes de linfonódulos superficiales presentaron una distribución dispersa en ambos países.

Respecto a la sensibilidad antibiótica, los aislamientos con y sin desarrollo frente a amicacina se distribuyeron tanto en la región patagónica de Argentina como en Brasil.

En este trabajo, el 74 % de los aislamientos se localizaron en zonas que presentaron clima seco y el 26 % en zonas con clima templado. Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la base del análisis de climas estarían en relación con la capacidad de sobrevivencia de *C. pseudotuberculosis* en ambientes hostiles y bajo condiciones adversas. Experimentalmente se ha demostrado que *C. pseudotuberculosis* puede sobrevivir hasta 8 meses en muestras de suelo y en fómites de corrales como superficies de madera, paja y heno por 1, 3 y 8 semanas respectivamente; particularmente en condiciones húmedas y frías (Augustine & Renshaw, 1986).

También se realizaron ensayos de supervivencia de los aislamientos, en condiciones de stress ambiental y estas permanecieron viables un período mínimo de 6 meses (Alvarez *et al.*, 2007). Por otro lado se demostró que frente al enfriamiento, se generaría una adaptación en los microorganismos, en la que conservarían cierta actividad metabólica que les permitiría

sobrevivir hasta tanto cese el estado de stress. Se determinó *in vitro* que la cepa de *C. pseudotuberculosis* permaneció viable por al menos 178 días frente al congelamiento. El estudio de la resistencia frente a bajas temperaturas resulta importante debido a que estas condiciones son características de la región patagónica (Alvarez *et al.*, 2010a).

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

En virtud de los resultados obtenidos se concluye que:

-Existe una amplia variabilidad fenotípica entre los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* y presentan capacidades diferenciales en su metabolismo, sensibilidad antibiótica, grados de intensidad del daño celular y de formación de biopelículas. Conocer estas características permitió establecer aspectos diferenciales y hallar una vinculación climática-estacional con respecto a su presentación endémica en las regiones de procedencia de los aislamientos investigados.

-Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* provenientes de ambos países corresponden a la **biovariedad ovis**. Entre los aislamientos de Argentina y Brasil existen variantes bioquímicas para la producción de enzimas α -glucosidasa y fostafatasa alcalina y en la fermentación de la maltosa. Se destacan 2 biotipos, **Glu⁺ Gal⁻ Malt⁻** y **Glu⁺ Gal⁻ Malt⁺**. Siendo este último más frecuente en la presentación cutánea y el primero en ambas formas, cutánea y visceral.

-El 100 % de los aislamientos corresponden a *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis confirmados mediante la secuenciación del gen que codifica para el 16S ARNr, con un muy alto grado de similitud frente a cepas de referencia depositadas en bancos genéticos.

-Una amplia gama de antibióticos utilizados en salud pública y/o veterinaria, ensayados por el método de difusión en agar, *in vitro*, resultan eficaces frente a *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis. Existen entre los aislamientos resultados variables frente a amicacina y oxacilina. Los aislamientos con y sin desarrollo frente a amicacina provienen tanto de la región patagónica Argentina como de los estados de Brasil.

-En este estudio, no se detectaron integrones clase 1 en los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis que desarrollaron frente a aminoglucósidos; por lo tanto es posible que el mecanismo de resistencia este dado por otros elementos genéticos.

-En el método de dilución (CIM) *in vitro*, se demuestra una alta sensibilidad de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis frente a diferentes grupos de antibióticos, pero también menor actividad de β -lactámicos y aminoglucósidos.

-Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis procedentes de diferentes fuentes no registran variabilidad en los perfiles antibióticos.

-A pesar de las diferencias de localización geográfica, sitio de lesión y especie animal, los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis de Argentina y de Brasil muestran el mismo perfil de ácidos micólicos: tipo IV, V y VI, que corresponden a cetomicolatos, epoximicolatos y micolatos dicarboxílicos, respectivamente.

-El 100 % de los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis presentan la fosfolipasa D, confirmada por técnica de PCR (gen *pld*) y revelada en el laboratorio a través de las pruebas bioquímicas de CAMP y CAMP reversa.

-*C. pseudotuberculosis* biovariedad ovis es capaz de adherirse e invadir líneas celulares no fagocíticas, permaneciendo viable hasta 72 h, induciendo diferentes grados de intensidad en los efectos citopáticos estudiados.

-Los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis, estudiados en este trabajo, demuestran virulencia debido a la producción de algunas enzimas (catalasa, caseínasa, carboxilesterasa, amilasa, ureasa, hemolisina), capacidad de adherencia e internalización en líneas celulares no fagocíticas con producción de ECP y formación de biopelículas.

-El análisis a través de SIG resulta útil para identificar a la variable clima permitiendo establecer un vínculo climático-estacional entre aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis provenientes de zonas endémicas de LC de Argentina y de Brasil.

CONCLUSION FINAL.

Con esta investigación y a partir de los resultados obtenidos contribuimos al conocimiento en varios aspectos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis, aislado de regiones endémicas de LC en la Patagonia Argentina y Brasil. Como se describió en este manuscrito, se ratifica que LC es una enfermedad endémica principalmente en majadas de la provincia de Chubut y Santa Cruz, donde la explotación ovina es un recurso económico muy importante por la comercialización de la lana, la carne y el cuero. Como otras enfermedades infecciosas, LC es una de las causas de morbi-mortalidad de ovinos, que genera grandes pérdidas y perjuicios económicos debido a decomisos totales y/o parciales, pérdida de peso, calidad y cantidad de

lana, producción de leche, fertilidad, señalada y destete y descarte de reproductores enfermos de alto mérito genético.

Es así que, profundizar los conocimientos sobre los factores de virulencia (AM, biopelículas FLD y otras enzimas extracelulares) de este agente etiológico, las características de los ecosistemas de la región patagónica y el origen de los aislamientos regionales, permite avanzar en el desarrollo de kits de diagnóstico y vacunas, que contribuyan a la salud veterinaria.

Además, desde la salud pública esta patología también ha de tenerse en cuenta porque se transmite entre animales y desde ellos, por contacto directo, a los humanos, considerándose **una zoonosis ocupacional**. En este huésped la infección se presenta como linfadenitis localizada afectando esporádicamente a trabajadores con actividad en ganadería ovina y/o caprina; es así que, los resultados obtenidos en nuestro trabajo sobre sensibilidad antibiótica de aislamientos regionales, contribuyen en el conocimiento de aspectos clínicos y tratamiento en humanos.

Finalmente, en el marco científico-tecnológico consideramos de suma importancia este tipo de estudios que permiten dar continuidad a líneas de investigación como ésta, referente al **estudio de la pseudotuberculosis en ovinos patagónicos**. Por otro lado, creemos que este tipo de investigaciones tiene como finalidad estimular la formación de recursos humanos, promover acciones con distintos grupos de trabajo (INTA-Balcarce, Centro de Investigación de Zoonosis de Sarmiento, Sociedades rurales, Trabajadores y productores rurales, Comparsas de esquila, etc.) y vínculos de cooperación a través de convenios marcos entre instituciones universitarias nacionales e internacionales, persiguiendo el objetivo de disminuir la propagación y erradicar este tipo enfermedades endémicas y con alta prevalencia en la Argentina.

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-Agresti, A. (1992). A survey of exact inference for contingency tables. *Statistical Science*, (7), 131–177.

-Alcaraz Ariza, F. (2013). Bioclimatología con R. Universidad de Murcia. España.

-Aleman, M. y Spier, S. J. (2001). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In Large Animal Internal Medicine 3rd ed. Smith P.B editor. St Louis: Mosby Co, 1078-1084.

-Aleman, M; Spier, S. J; Wilson, W. D.; Doherr, M. (1996). *Corynebacterium pseudotuberculosis* in horses: 538 cases (1982-1993). *Y. Am. Vet. Med. Assoc*, (209), 804-809.

-Al-Gaabary, M. H.; Osman, S. A.; Oreiby, A. F. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Ruminant Research* (87), 116–121.

-Alvarez, L. y Estevao Belchior, S. (17 – 20 de octubre de 2010a). Estudio de viabilidad frente al congelamiento de un aislamiento *Corynebacterium pseudotuberculosis*. XII Congreso Argentino De Microbiología, VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica – SADEBAC, I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. Resumen publicado en *Rev Arg Microbiol*, 42(supl.1), 43.

-Alvarez, L. A.; Gallardo, A. A.; Abalos, A.; Estevao Belchior, S. (17 – 20 de octubre de 2010b). Efecto de altas temperaturas sobre un aislamiento de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. XII Congreso Argentino de Microbiología, VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica – SADEBAC, I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. Resumen publicado en *Rev Argent Microbiol*, 42(supl. 1), 47.

-Alvarez, L.; Gallardo, A.; Abalos, A.; Jodor, N.; Alvarez, H. M.; Estevao Belchior, S. (10 –

13 de octubre de 2007). Estudio de viabilidad, frente a condiciones de estrés ambiental, de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislada de ovinos de la región patagónica. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, Argentina. Resumen publicado en *Rev Arg Microbiol*, 39(supl. 1), 173.

-Alvarez, L.; William, A.; Castro I.; Valenzuela, F.; Estevo Belchior, S. (2017). Capacidad de supervivencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis en distintos suelos de la provincia de Chubut, Patagonia Argentina. *Rev Arg Microbiol*, 49(1): 105-109.

-Aquino de Sá, M. Da C. (2018). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Aspectos moleculares de cepas produtoras e não produtoras de biofilme e da resposta imune por elas induzida numa infecção experimental em Cabras. Tesis doctoral. Programa de Pós-Graduação em Biotecnología Rede Nordeste de Biotecnología. Universidad de Federal da Bahía- Ponto Focal.

-Aquino de Sá, M.; Veschi, J. L.A.; Santos, G. B.; Amanso E. S., Oliveira, S. A.S.; Mota, R. A.; Veneroni-Gouveia, G. y Costa, M. M. (2013). Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesq. Vet. Bras*, 33(11), 1319-1324.

-Araújo, C. L.; Alves, J.; Lima, A.; Días, L.; Silva, P.; Marque, J., Acevedo, V.; Silva, A.; Folador, A. (2018). The Genus *Corynebacterium* in the Genomic Era. (4), 60-77. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80445>

-Arrigo, J. (1984). Pseudotuberculosis o apostemas de los ovinos. Informe URISA-Instituto Nacional de Tecnología.

-Arsenault, J.; Girard, C.; Dubreuil, P.; Daignault, D.; Galarneau, J-R.; Boisclair, J.; Simard C.; Bélanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med*, (59), 67-81.

-Ascuntar-Tello, J. and Jaimes, F. (2015). Ronda clínica y epidemiológica: sistemas de información geográfica (SIG) en salud. *IATREIA*, 29(1), 97-103.

- Auad, J.; Cerutti, J.; Cooper, L. G.; Camussone, C. M.; Lozano, N. A.; Crespo, F. M.; Lozano, A. (2018). Humoral immune response of pregnant goats to two *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin formulations. *Austral J Vet Sci*, (50), 101-105.
- Auad, J.; Cooper, L.; Cerutti, J.; Marcellino, R.; Neder, V. E.; Calvino, L. F. (2017). Aislamiento y caracterización de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biotipo ovis en Lama glama en Córdoba, Argentina. *Rev Methodo*, 2(2), 72-76. [https://doi.org/10.22529/me.2017.2\(2\)09](https://doi.org/10.22529/me.2017.2(2)09)
- Augustine, S.L. & Renshaw, H.W. (1986). Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic virulent exudate on common barnyard fomites. *J. Vet. Res*, (47), 713-715.
- Baird, G. J. & Fontaine, M. C. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol*, (137), 179-210.
- Barberis, C.; Sandoval, E.; Rodríguez, H.; Ramírez, M. S.; Famiglietti, A.; Almuzara, M., Vay, C. (2018). Comparison between disk diffusion and agar dilution methods to determine *in vitro* susceptibility of *Corynebacterium* spp. clinical isolates and update of their susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist*; (14), 246-252.
- Barksdale, L.; Linder, R.; Sulea, I.; Pollice, M. (1981). Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol*, (13), 335-343.
- Barrientos Padilla, J. S.; Cortés De Arcipreste, N.; Tórtora Pérez, J. L.; Alba Hurtado, F.; Del Río García, J. C.; Valdivia Anda G. (2008). Diferentes biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* están involucrados en la Linfadenitis Caseosa Cutánea y Visceral. *RECVET*, 3(4), 1-27. <https://issuu.com/veterinaria.org/docs/recvet.vol3.n4.2008>.
- Basualdo, J. A.; Coto, C. E.; de Torres, R. A. (2006). *Microbiología Biomédica*. Editorial Atlante. Buenos Aires. Argentina.
- Bayona-Rojas, M.A.; Gutiérrez-Escobar, A. J. (2013). Supervivencia *Helicobacter pylori*.

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient, 16(2), 335-342.

-Bornscheuer T. U. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, (26), 76–81.

-Bosque Sendra, J. (1992). *Sistemas de Información Geográfica*. Madrid, España: Ediciones Rialp, S.A.

-Brogden, K. A.; Ghedid, L.; Cutlip, R. C.; Lehmkuhl, H. D. and Sacks, J. (1990). The effect of mummy1 dipeptide on the immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell vaccines in mice and lambs. *Am. J. Vet. Res*, (51), 200-202.

-Brown, C. C.; Olander, H. J. (1987). Caseous lymphadenitis of goats and sheep: A review. *Vet Bull*, (57), 7445-7448.

-Brown C. C.; Olander H. J.; Zometa, C. y Alves, S. F. (1986). Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis of goats and sheep, using the synergistic hemolysis inhibition test. *Am J Vet Res*, (47), 1461-1463.

-Burkovski A. (2018). The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie Van Leeuwenhoek*, (111), 717–725. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1036-6>

-Cabrera, P. A.; Irabedra, P.; Orlando, D.; Rista, L.; Harán, G.; Viñals, G.; Blanco, M. T.; Alvarez, M.; Elola, S.; Morosoli, D.; Moraña, A.; Bondad, M.; Sambran, Y.; Heinzen, T., Chans, L.; Piñeyro, L.; Perez, D.; Pereyra, I. (2003). National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants ovis aries as an indicator in control programmes in Uruguay. *Acta Trópica*, (85), 281-285.

-Cáceres, M. E.; Etcheverría, A.; Padola, N. L. (2013). Formación de biofilm y expresión de curli en aislamientos VTEC O157:H7 y O145:H. *Rev. Vet. Arg*, 45, (1), 195. XIII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.

- Carne H.R. y Onon, E.O. (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cell of blood vessels. *Nature (London)* (271), 246-248.
- Carrillo Zeledón, G.; Redondo Solano, M.; Arias Echandi, M. L. (2010). Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de queso tierno origen costarricense. *Arch Latinoam Nutr*, 60(2), 175-178.
- Ceri, H.; Olson, M. E.; Stremick, C.; Read, R. R.; Morck, D. and Buret, A. (1999) The Calgary Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J. Clin. Microbiol*, (37), 1771-1776.
- Chávez Esponda, D.; Jiménez Rojas, Y.; Burgos Hernández, T. (2016). Diagnóstico de Pseudotuberculosis en ovinos a partir del estudio hematológico. *Rev. Electrón. Vet*, 17(11), 1-7.
- Chen, X.P.; Ali, L.; Wu, L-Y, Liu, C.; Gang, C. X.; Huang QF, Ruan JH, Bao SY, Rao YP and Yu, D. (2018). Biofilm Formation Plays a Role in the Formation of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Toward Nutrients in Microcosm Experiments. *Front. Microbiol*, 9(367), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00367>.
- Chiani Y.; Mautti P.; Larpin D.; Vanasco B.; Tonarelli G.; Sequerira M.; Zerbini E. (1996). Caracterización de ácidos micólicos bacterianos por cromatografía en capa delgada. CATLAB.
- Chirino-Zarraga, C., Scamelli, A., Rey-Valerion, C. (2005). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Rumin Res*, (65), 170-175.
- Christensen, D. G.; Simpson, W. A.; Bisno, L. A. and Beachey, H. E. (1982). Adherence of Slime-Producing Strain of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infect. Immun*, (37), 318-326.

-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, (2016); M45-3rd Edition. Wayne, PA, EE.UU.3.

-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. (2007). Zone diameter and Minimal Inhibitory Concentration Interpretative Standards for *Staphylococcus* spp.; M100-S17, Vol 27, N°1. Wayne, PA, EE.UU.

-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 26th Edition, (2016). Zone diameter and Minimal Inhibitory Concentration Interpretative Standards for *Staphylococcus* spp.; M100-S. Wayne, PA, EE.UU.

-Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. Intern. *Biodet. & Biodeg*, (51), 277-282.

-Collins, M. D. and Cummins, C. S. (1986). *Genus Corynebacterium*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2: 1266-1276. Edited by P.H.A. Sneayth, N.S Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

-Connor, K. M., Malcolm M. Q., Graham B, and William D. (2000). Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol*, 38(7), 2633-2637.

-Corache García Pulido, M.V.Z. (2017). Evaluación de un inmunógeno para el control de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos. Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad Autónoma del estado de México.

-D'Afonseca, V.; Moraes, P.M.; Dorella, F.A.; Pacheco, L.G.C.; Meyer, R.; Portela, R.W.; Miyoshi*, A. y Azevedo, V. (2008). A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genet. Mol. Res*, 7(1), 252-260.

-D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). Manual de técnicas de histología vegetal. Primera edición. Editorial hemisferio sur S. A. Buenos Aires. Argentina.

-de la Torre, M. L. (2011). Caracterización de ácidos micólicos de la pared celular de micobacterias por cromatografía en capa delgada. Tesis para Especialista en producción animal. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. Balcarce. Argentina.

-Delgado Duno, A.; Zárraga, J.; Chirino-Zárraga, C. I.; Carrero Portillo, L. L. (2015). Caracterización epidemiológica de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Paraguaná, Venezuela. *Rev Med Vet.*; (31), 35-45.

-Dercksen, D. P.; Ter Laak E. A.; Schreuder, B. E. (1996). Eradication programme for caseous lymphadenitis in goats in The Netherlands. *Vet Rec.*; 138(10), 237.

-Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona. [ISBN 84-291-7208-4](#)

-Díaz Caballero, A. J., Vivas Reyes R., Puerta L., Ahumado Monterrosa M., Arévalo Tovar L., Cabrales Salgado R., Herrera A. (2011). Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión. *Av Periodon Implantol*, 23(3),195-201.

-do Carmo, F.B.; Guimarães A.S.; Pauletti, R.B.; Lage, A.P.; Gonçalves, V.S.P.; Meyer, R.; Portela, R.W.D.; Miyoshi, A.; Azevedo, V.; Gouveia, A.M.G.; Heinemann, M.B. (2012). Prevalência de anticorpos contra a linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal, Brasil. *Arq. Inst. Biol*, 79(2), 293-296.

-Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881-890.

-Dorella, A. F.; Pacheco, L. G. C.; Oliveira, S. C.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res*, (37), 201-218.

-Drancourt, M.; Bollet, C.; Carlouz, A.; Martelin, R.; Gayral J-P.; Raoult D. (2000). 16S Ribosomal ADN Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J. Clin. Microbiol*, 38(10), 3623–3630.

-Egen, N. B.; Cuevas, W.; Mcnamara, P. J.; Sammons, D. W.; Humphreys, R.; Songer J. G. (1989). Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am J Vet Res*, (50), 1319-1322.

-Estevao Belchior, S. G.; Abalos, M. A.; Mas, M.; Clapera, E.; Gallardo, A. A.; Alvarez, L.A. (2011). Prevalence of caseous lymphadenitis in sheep in Argentina (Patagonia). *Online J Vet Res*, 15(3), 211-214.

-Estevao Belchior, S. G. y Alvarez, L. A. (2014). Effect of quaternary ammonium compounds and temperature on shearing utensils contaminated by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Online J Vet Res*, 18(7), 587-595.

-Estevao Belchior, S. G.; Gallardo, A. A.; Abalos, M. A.; Alvarez, L. A.; Nuñez, N. C.; Guevara, D.; Jensen, O. (2009). *Corynebacterium pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revisión de casos. *REDVET. Rev. Electrón. Vet*, 10(10), 1-16. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009.html>.

-Estevao Belchior, S.; Gallardo, A.; Abalos, A.; Díaz, Y.; Álvarez, L.; Callejo, R.; Prieto, M.; Jodor, N.; Jensen O. (2007). Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. *Rev Arg Microbiol*, (39), 44-46.

-Estevao Belchior, S.; Gallardo, A.; Abalos, A.; Jodor, N.; Jensen O. (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Rev. Vet. Arg*, (23), 258-278.

-Euzéby, J. P. (1999). *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: Dictionnaire de bacteriologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdic/pseudotuberculosis.html>.

-Faleiro Naves, P. L. (2010). “*Escherichia coli*” y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a

biopelículas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II. Madrid.

-Fernández Natal, M. I. (2009). Identificación y poder patógeno de microorganismos del género “*Corynebacterium*” aislados de muestras clínicas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología I. Madrid.

-Figuroa, J. P., Maier, L.; Burrows, J.; Zurich, L. (2007). Estudio Microbiológico de nódulos linfáticos abscedados en cabras lecheras sometidas principalmente a explotación intensiva en Santiago de Chile. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina: Universidad Santo Tomás.

-Folador, L. E.; Daltro de Carvalho, S. V. P.; Silva, M. W.; Ferreira, S. R.; Silva, A.; Gromiha, M.; Ghosh P.; Barh, D.; Azevedo, V., and Röttger, R. (2016). In silico identification of essential proteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* based on protein-protein interaction networks. BMC Systems Biology. 10:103. [http//10.1186/s12918-016-0346-4](http://10.1186/s12918-016-0346-4).

-Fontecha Umaña, F. (2014). Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

-Funke, G.; Punter, V.; von Graevenitz A. (1996). Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*; (40), 2874–2878.

-Funke, G.; von Graevenitz, A. V, Clarridge, J. E.; BeARNrd, K. A. (1997). Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev.*, 10(1), 125-159.

-Gallardo A., Abalos A., Haro P., Navarro V., Jodor N., Jensen O., Estevao Belchior S. (17 – 21 de octubre de 2004). Aislamiento y caracterización de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, en ovinos de la región patagónica. Libro de resúmenes (CD). Área temática: Microbiología veterinaria – N° de orden J-494. En XVII Congreso Latinoamericano y X Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.

-Gallardo, A.; Azevedo, V.; Estevao Belchior, S. (17 – 20 octubre de 2010). *Corynebacterium*

pseudotuberculosis: perfil enzimático de cepas aisladas de pequeños rumiantes. XII Congreso Argentino De Microbiología, VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica – SADEBAC, I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. Resumen, publicado en *Rev Argent Microbiol*; 42(supl. 1), 46.

-Gallardo A., Azevedo V., Fajardo M. A., Paolicchi F., Estevao Belchior S. (26 - 30 de septiembre de 2016a). Capacidad de formación de biopelículas de aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis. Libro de resúmenes. Área temática: Microbiología veterinaria – N° de orden: MA 0223. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología – XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fe, Argentina.

-Gallardo A., Azevedo V., Massera C., Zaixso† H., Paolicchi F., Estevao Belchior S. (26 - 30 de septiembre de 2016b). Aplicación de Sistemas de Información Geográfica (SIG) en el análisis de aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis de pequeños rumiantes de Argentina y Brasil. Libro de resúmenes. Área temática: Microbiología veterinaria – N° de orden: MA 022XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología – XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fe, Argentina.

-Gallardo A., Toledo R., Azevedo V., Estevao Belchior S. (23 – 26 de septiembre de 2013). Linfadenitis caseosa: evaluación de la concentración inhibitoria mínima de once antibióticos en aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis. XIII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Argentina Resumen publicado en *Rev Argent Microbiol*, 45(supl. 1), 86.

-Gallardo, A. A.; Toledo, R. A.; González Pasayo, R. A.; Azevedo, V.; Robles, C.; Paolicchi F. A.; Estevao Belchior, S. G. (2019). *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis: evaluación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*. *Rev Argent Microbiol*, 51(4), 334-338. <https://doi.org/10.1016/j.ram>. 2018.12.001

-García Martos, P.; Fernández del Barrio, M. T.; Paredes Salido, F. (1997). Microbiología Clínica Aplicada. (3.^a Edición). Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos, S. A.

-Ghoneim, M. A.; Mousa, A. W.; Ibrahim, A. K.; Amin, A. S; Khafagi, A; Selim, S. A. (2001). Role of *Hippobosca equina* as a transmitter of *C. pseudotuberculosis* among buffaloes as revealed by PCR and dot blot hybridization. *J. Egypt Vet. Med. Ass*, (61), 165-176.

-Gómez, J.; Gómez-Lus, M. L.; Bas, P.; Ramos, C.; Cafini, F.; Maestre, J. R.; Prieto, J. (2013). ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos Gram negativos? *Rev Esp Quimioter*; 26(2), 77-102.

-Gómez, M. L.; López M. S.; Orcellet, V. (2015). Presencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en caprinos-ovinos en un establecimiento del departamento San Justo provincia de Córdoba. III Jornada de difusión de la Investigación y Extensión. Esperanza. Santa Fe. Argentina.

-Goodfellow, M.; Collins, M. D. and Minnikin, D. E. (1976). Thin-layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolysates of coryneform and related taxa. *J. Gen. Microbiol*, (96), 351-358.

-Graevenitz, A. V. y Krech, T. (1992). The genus *Corynebacterium*- Medical. In The prokaryotes. Ballows A, Trüper H, Dworkin M, Harder W and Heinz Schleifer K, editors. Handbook on the Biology of Bacteria: ecophysiology, isolation, identification applications. VolIII, Springer-Verlag.

-Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2019–2020. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud; 2019 (WHO/WHE/CPI/2019.20). Licencia: CC BY-NCSA 3.0 IGO.

-Guimarães, A. S., Dorneles, S. M. E.; Andrade, G. I.; Lage, A. P.; Miyoshi, A.; Azevedo, V.; Gouveia, G. A. M.; Heinemann, M. B. (2011). Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using ERIC-PCR. *Vet Microbiol*, (153), 299–306.

-Gutheim, S. (2011). Infección interna por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en equinos: Aspectos relevantes. Tesina para aspirar al Título de Especialista en Medicina Deportiva del equino. Buenos Aires, Argentina.

-Hair, J.F.; Anderson, R.E.; Tatham, R. L. y Black, W.C. (1992). Multivariate data analysis with readings. Macmillan Publishing Company, New York. pp.544.

-Hariharan, H.; Tiwari, K. P.; Kumthekar, S.; Thomas, D.; Hegamin-Younger, C.; Edwards, B. and Sharma, R. N. (2015). Serological detection of caseous lymphadenitis in sheep and goats using a commercial ELISA in Grenada, West Indies. IJVS: Research & Reports, Article ID 473459. <https://doi.org/10.5171/2015.473459>.

-Hassan, S., Guimarães, L. C., de Pádua Pereira, U., Islam, A., Ali, A., Bakhtiar, S. M. , Ribeiro, D., Rodrigues dos Santos, A., de Castro Soares, S, Dorella, F., Pinto, A. C., Cruz Schneider, M. P., Barbosa, M. S., Almeida, S., Abreu, V., Aburjaile, F., Ribeiro Carneiro, A., Teixeira Cerdeira, L., Fiaux K.,...Azevedo V. (2012). Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis strain P54B96 isolated from antelope in South Africa obtained by rapid next generation sequencing technology. *Stand Genomic Sci*, (7), 189-199. <https://doi.org/10.4056/sigs.3066455>.

-Hayat, M. A. (2000). Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications. Cuarta edición. New York: Van Nostrand Reinhold Co.

-Hawari D. A. (2008). *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection (Caseous Lymphadenitis) in Camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. *Am J Anim Vet Sci*; 3(2), 68-72.

-Hébert, G. A. and Hancock, G. A. (1985) Synergistic hemolysis exhibited by species of *Staphylococci*. *J. Clin. Microbiol*, 22(3), 409-415.

-Hommeiz, J.; Devriese, L. A.; Vaneechoutte, M.; Riegel, P.; Butaye, P.; Haesebrouck, F. (1999). Identification of no lipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol*, (37), 954-957.

-Ilhan, Z. (2013). Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. *Revue Méd. Vét*, 164(2), 60-66.

-Isenberg, H. D. (1992). Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol. 1, sección 1.19-

1.20 y sección 5. American Society for Microbiology, Washington, DC.

-Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W. and Hertz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, (53), 315–351.

-Jodor, N.; Haro, P.; Fernández, A.; Gallardo, A.; Abalos, A.; Alvarez, L.; Díaz, Y.; Jensen, O.; Estevao Belchior, S. (2007). Linfadenitis caseosa: susceptibilidad a desinfectantes de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aisladas de ovinos patagónicos. *Vet. Arg.*, 24(232), 93–100.

-Join-Lambert, O. F.; Ouache, M.; Canioni, D.; Beretti, J.L.; Blanche, S.; Berche, P. and Kayal, S. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, (25), 1-3.

-Juárez, A. (2014). Enfermedades de los caprinos en sistemas intensivos y semi-intensivos de la región centro-este de la provincia de Santa Fe, Argentina. II Congreso Nacional de Producción Caprina 1-5.

-Judson, R y Songer, J. G. (1991). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Vet. Microbiol.*, (27), 145-150.

-Khamis, A., Raoult, D. y Scola B. L. (2004). RpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol.*, (42), 3925–3931.

-Khamis, A., Raoult D. y Scola B. L. (2005). Comparison between *rpoB* and 16S ARNr Gene Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol.*, (43), 1934–1936.

-Koneman, E.; Stephen, A.; Williams, J.; Procop, G.; Schrenberger, P.; Washington, W.; Wood, G. (2007). Diagnóstico Microbiológico. Argentina: Editorial Médica Panamericana.

- Kouker, G. y Jaeger Karl, E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol*, (53), 211-213.
- Kumar, J.; Tripathi, B. N.; Kumar, R.; Sonawane, G. G.; Dixit, S. K. (2013). Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. *Trop Anim Health Prod*, (45), 1429-1435.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, (227), 680-685.
- Lasa, I.; del Pozo, L. J.; Penadés J. R.; Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.*, 28(2), 163-175.
- Leardini, N.; Prieto, M.; Martínez, C.; Aguerre, L.; Loaysa, R. (2002). Infecciones por Bacilos Gram Positivos Aeróbicos, Corinebacterias, Bacillus y Actinomycetes. En Curso Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos Malbrán”. Departamento de Bacteriología, Servicio de Bacteriología Especial. Argentina.
- Legendre, P. y L. Legendre. (1998). Numerical ecology. Elsevier, Amsterdam. pp. 853.
- Leite, C. Q. F.; Oliveira de Souza, C. W.; Leite, S. R. A. (1998). Identification of Mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 93(6), 801-805.
- Leonhard, G.; Hoyos, B. D; Porcasi, X.; Hrellac, H.; Spillmann, C. (2014). Uso de SIG y la teledetección para el análisis, control y prevención de enfermedades transmitidas por vectores: Aplicaciones en Chagas. *RAZyEIE*, IX(3), 75.
- León-Viscaíno, L.; Garrido Abellán, F.; González, C. M.; Cubero, P. M. J. (2002). Linfadenitis caseosa: clínica. *Rev. Ovis*, (78), 41-61.
- 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.

-Liu, D. T. L.; Chan, W. M.; Fan, D. S.P.; Lam, D.S. C. (2005). An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Br. J. Ophthalmol*, (89), 245-246.

-Lopes Bastos, B; Días Portela, R.W.; Dorella, F.A.; Ribeiro, D., Seyffert N, Castro, T.L. de P.; Miyoshi, A.; Oliveira Costa, S.; Meyer, R. and Azevedo, V. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunol*, S4(005), 1-15.

-MacFaddin J. M. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (3ª. Edición). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S. A.

-Manual de Bioseguridad en el laboratorio. OMS. Ginebra; 2005.

-Marcellino, R.; Mignaqui, A.; Pappalardo, J. (2018). Diagnóstico molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ovinos de la Patagonia. En libro: *Enfermedades de los ovinos, caprinos, y camélidos sudamericanos*. pp. 3-103. Editado por Carlos Robles. Argentina: primer edición INTA.

-Marcellino, R.; Santana, J. (2016). Caracterización del material caseoso en lesiones de LAC su correlación con el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* en ovinos de Santa Cruz. XXI Reunión Científico Técnica de la AAVDL. Jujuy.

-Mattos-Guaraldí, A. L.; Duarte Formiga, C. L.; Braga Andrade, F. A. (1999). Cell Surface Hydrophobicity of Sucrose Fermenting and Nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* Strains Evaluated by Different Methods. *Current Microbiol*, 38, 37-42.

-Medrano, G.; Hung, A.; Alvarado, A.; Li O. (2003). Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. *Rev Inv Vet Perú*; 14(1), 61-67.

-Minnikin, D.E.; Alshamaony, L.; Goodfellow, M. (1975). Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and Related Taxa by Thin-Layer Chromatographic Analysis of Whole-organism Methanolysates. *J Gen Microbiol*, (88), 200-204.

-Mohan, P.; Jayaprakasan, V.; Punnoose, K. T. and Mini, M. (2001). SDS-PAGE proteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxin (goat). Short Communication. Online *J. Vet Res*, (5), 245-250.

-Mohan, P.; Vathala, M.; Jayaprakasan, V. (2008). Comparative characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in Kerala, India and reference strain. *Small Rumin Res*, (74), 226-230.

-Moldes Teo, J. (1995). Tecnología de los Sistemas de Información. Geográfica. Madrid, España: Editorial RA-MA.

-Morales, N.; Idrige, D.; Bahamonde, A.; Cerda, J.; Araya, C.; Muñoz, R.; Saldias, M. E.; Lecocq, C.; Fresno, M.; Abalos, P.; Retamal, P. (2017). *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Patagonian Huemul (*Hippocamelus bisulcus*). *J Wildl Dis*; (53), 1-4.

-Moura-Costa, L. F., Bahía, R .C., Carminati, R., Vale V. L. C., Paule, B. J. A., Portela, R.W., Freire, S. M., Nascimento, I., Schaer, R., Barreto, L. M. S., Meyer, R. (2008). *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 126(1-2), 131-141.

-Muckle, C. A. and Gyles, C. L. (1982). Characterization of strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Can J Comp Med*, (46), 206:208.

-Mueller, J. P.; Cueto, M. I.; Robles, C. A. (2015). Actualización en Producción Ovina. Memorias del IX Curso San Carlos de Bariloche. 1a ed. Ediciones INTA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

-Navia, D. P.; Villada, H. S.; Mosquera, S. A. (2010). Las biopelículas en la industria de alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias 8(2), 118-128.

- Nazar, C. J. (2007). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, (67), 61-72.
- Nesvera, J.; Hochmannova, J.; Patek, L. M. (1998). An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett*; (169), 391-395.
- Oliveira, M.; Barroco, C.; Mottola, C.; Santos, R.; Lemsaddek, A.; Tavares, L.; Semedo-Lemsaddek, T. (2014). First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *Vet. Res*, (10), 218.
- Olson, E. M.; Ceri, H.; Morck, W. D.; Buret, G. A. Read R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet Res*, (66), 86-92.
- Onon, E. O. (1979). Purification and partial characterization of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. *Biochem. J*, (177), 181–186.
- Orman, B.; Piñeiro, S. A.; Arduino, S.; Galas, M.; Melano, R.; Caffer, M. I.; Sordelli, D. O.; Centron D. (2002). Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*, (46), 3963 -3970.
- Ortiz Arana, G. (2016). Producción de una bacterina para linfadenitis caseosa y la evaluación de su composición a través de electroforesis. Tesis de posgrado. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Ott, L. (2018). Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS Microbiol*, 4(1): 85-103.
- Pacheco, L. G. C.; Pena, R. R.; Castro, T. L P.; Dorella, F.A., Bahía, R. C.; Carminati, R, Frota, M. N. L., Oliveira, S. C., Meyer, R., Alves, F. S. F. Miyoshi, A., Acevedo, V. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J Med Microbiol*, (56),

480-486.

-Pagano, M and Gauvreau, K. (2001). Fundamentos de Bioestadística. 2° Ed. InteARNtional Thomson Editores SA.

-Palmero, S., Smeriglio, A.; Salinas, F.; Gallagher, M.; Gómez, L.; Pasqualón, M.; Gruhn, I., Juarez, A., Pividori N., Quiroga, C., Zoratti, O., Canal, A., Russi, N. (2013). Presentación de un caso de linfadenitis caseosa en caprinos de la Región Centro de Santa Fe. XIV Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. Jornada Latinoamericana. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario.

-Paton, M. W.; Rose, I. R.; Hart, R. A.; Sutherland, S. S.; Mercy, A. R.; Ellis, T. M.; Dhaliwal, J. A. (1994). New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust. Vet J*, (71), 47-49.

-Paule B. J. A., Azevedo V., Regis L. F., Carminati R., Bahía R., *et al.* (2003). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet Immunol Immunopathol*, (96), 129-139.

-Peel, M. M.; Palmer, G. G.; Stacpoole, A. M. and Kerr, T. G. (1997). Human lymphadenitis due *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis*, (24), 185-191.

-Pepin, M.; Bisrame, A.; Marly, J. (1989). *Corynebacterium pseudotuberculosis*; biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. *Ann Rech Vet*, (20), 111-115.

-Pinto Gomide, A. C.; Gomesde Sá, P.; Queiroz Cavalcante, A. L.; Sousa, T. J.; Rodrigues Gomesa, L. G.; Ramos, R. T J; Azevedo, V.; Silva, A.; Ribeiro Carneiro Folador. (2018). Heat shock stress: Profile of differential expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi. *Gene*, (645), 124–130.

- Ponce de León Filho, P. e Gomes Pereira, L. J. (1983). Utilitárias informacoes sobre linfadenite caseosa de caprinos e ovinos e seu control. Serie de Producao e Sanidade Animal; 1.
- Primera, L.; Zambrano, J.; Boggiano, E.; Vera, M.; Carrero, L.; Chirino-Zárraga, C. (2016). Linfadenitis caseosa en rebaños ovinos de la península de Paraguaná, municipio Falcón, estado Falcón, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ, 26(1): 5-12. Disp.: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95944832003>.
- Ramadan, H. H. (2006). Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, (14), 183-186.
- Ramadan, H. H.; Sanclement, J. A. y Thomas, J. G. (2005). Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg*, (132), 414-417.
- Ranjitha, P. (2009). Purification and Characterization of the Lipase from Marine *Vibrio fischeri*. *Int J Biol*, (1), 48-56.
- Renaud, F. N.; Le Coustumier, A.; Wlhem, N.; Aubel, D.; Riegel, P.; Bollet, C.; Freney, J. (2007). *Corynebacterium hansenii* sp. Nov., An H-Glycosidase–Negative Bacterium Related to *Corynebacterium xerosis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, (57), 1113-1116.
- Rennie, R. P.; Turnbull, L.; Brosnikoff, C.; Cloke, J. (2012). First comprehensive evaluation of the M.I.C. Evaluator device compared to Etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species. *J Clin Microbiol*; (50), 1153–1157.
- Rhodes, D. M.; Magdesian, K. G.; Byrne, B. A.; Kass, P. H.; Edman, J., and Spier, S. J. (2015). Minimum inhibitory concentrations of equine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates (1996-2012). *J Vet Intern Med*; (29), 327-32.
- Riet-Correa, F. (2007). Doenças de ruminantes e eqüideos. 3a ed. Santa Mariá: Pallotti.

-Rivera, I. G.; Ordoñez, M., Presa, N.; Gomez-Larrauri, A.; Simón, J.; Trueba, M. y Gomez-Muñoz, A. (2015). Sphingomyelinase D/Ceramide 1-Phosphate in Cell Survival and Inflammation. *Toxins*, (7), 1457-1466. [http: 10.3390/toxins7051457](http://10.3390/toxins7051457).

-Robles, C.; F. Olaechea. (2001). Salud y enfermedades de las majadas. (11), 223-242. En: Ganadería sustentable en la Patagonia Austral. Borrelli, P y G. Oliva Ed. INTA Reg. Pat. Sur. 269 pp.

-Rocha Gracia, R del C.; Lozano Zarain, P.; Martínez Laguna, Y. (2004). Mecanismo de patogenicidad e Interacción parasito-hospedero. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Dirección de Fomento Editorial. Puebla, Pue. México.

-Römling, U.; Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Int Med*, (272), 541–561.

-Ruiz Ruedas, C. (2006). Microbial lipases with interest in biotechnology and infectious diseases: isolates, characterization and inhibition by natural substances. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona – Departamento de Microbiología. España.

-Ruiz, L.; Barrera Valle, M.; Frias M. (2007). Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. *Rev Electr Clin Vet*, 2(8), 1-22.

-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.

-Sanchez-Vizueté, P.; Orgaz, B.; Aymerich, S.; LeCoq, D.; Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multi species biofilms. *Front. Microbiol*, (6), 705. [http:10.3389/fmicb.2015.00705](http://10.3389/fmicb.2015.00705).

-Sanclement, J. A.; Webster, P.; Thomas, J.; Ramadan, H. H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, (115), 578-582.

-Sanderson, A. R.; Leid, J. G.; Hunsaker, D. (2006). Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, (116), 1121-1126.

-Schröder, J.; Maus, I.; Meyer, K.; Wördemann, S.; Blom, J.; Jaenicke, S.; Schneider, J.; Trost, E.; Tauch, A. (2012). Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics*; (13), 1-19.

-Serrano, J. A; Sandoval, H. A; Trujillo. (2005). Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos. Primera edición. Mérida Venezuela. Editorial Venezolana C. A.

-Silva, A.; Ramos, J. T. R.; Carneiro R. A.; Pinto, A. C.; Soares, S. D. C.; Rodrigues, S. A.; Silva, A. S., Guimarães, L. C., Aburjaile, F. F., Vieira Barbosa, E. G., Fernanda Alves Dorella, A. F., Rocha, S. F., Lopes, S. T., Kawasaki, R., Sá Gomes, P., da Rocha, C. N., Teixeira, C. L., Barbosa, M. S., Schneider, C. M. P., Miyoshi, A...Azevedo V. (2012). Complete Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Cp31, Isolated from an Egyptian Buffalo. *J. Bacteriol*, 194(23), 6663-6664.

-Simpson-Louredo L., Ramos J. N., Peixoto R. S., Santos L. S., Antunes C. A., Ladeira E. M., Santos C. S., Vieira V. V., Bôas M. H., Jr Hirata, R., Mattos-Guaraldi, A. L. (2014). *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. *Antonie van Leeuwenhoek.*; 105(2), 343–352. 10.1007/s10482-013-0080-5.

-Soares, S. C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., Carneiro, A., Ali, A., Santos, A. R., Pinto, A. C., Diniz, C., Barbosa, E. G. V., Dorella, F. A., Aburjaile, F., Rocha, F. S., Nascimento, K. K. F., Guimarães, L. C., Almeida, S., Hassan, S. S., Bakhtiar, S. M., Pereira, U. P., Abreu, V. A. C., Schneider, M. P. C., Miyoshi, A., Tauch, A., Vasco Azevedo. (2013). The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar ovis and equi Strains. *PLoS ONE*, 8(1), 1-14.

-Solonet, J.; Malena, R.; Estein, S.; Estevao Belchior, S.; Paolicchi F. A. (2011). Desarrollo de

una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en carneros vacunados o infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Rev Arg Microbiol*; (43), 9-17.

-Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol*, (5), 156-61.

-Songer, J. G.; Beckenbach, K.; Marshall, M. M.; Olson, G. B. and Kelly L. (1988). Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am J Vet Res*, (49), 223-226.

-Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), 223–229.

-Souza, M.F.; Carvalho, A.Q.; Garino Junior, F; Riet-Correa, F. (2011). Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. *Pesqui Vet Bras*, 31(3), 224-230.

-Steerforth, D.; Marutsov, P. (2017). Ulcerative lymphangitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Bulgarian Holstein dairy cows. *Vet Rec Case Rep*, (5), 1-6.

-Stepanovic´ S., Cirkovic I., Ranin L. and M. Svabic´-Vlahovic´. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*, (38): 428–432.

-Stewart, J. L.; Vieson, M. D.; Shipley C. F. (2018). *Corynebacterium pseudotuberculosis* as a pathogen of the reproductive tract of male small ruminants: case study and review. *Clin Ther*, 10(2), 107-117.

-Strahler, A. (1989). “Geografía física” Universidad de Columbia. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. España. 235-252.

-Szwako, A.; Ortíz, N.; López, D. (2014). Prevalencia de linfadenitis caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) en caprinos de establecimientos lecheros del

departamento central - Paraguay, año 2012. *Compend. Cienc. Vet*; 04(01): 24–29.

-Tejedor-Junco, M. T.; Lupiola, P.; Schulz, U.; Gutierrez, C. (2008). Isolation of nitrate reductase positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* from dromedary camels. *Trop Anim Health Prod*, (40), 165-167.

-ter Braak, C. J. F. Ordination. In: Jongman, R. H. G.; Braak, C. J. F.; Tongeren, O. F. R. V. (Ed.). (1995). *Data analysis in community and landscape ecology*. Cambridge: University Press Cambridge. pp. 91-173.

-The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST breakpoints. 2018. *Corynebacterium* spp.

-Umer, M.; Abba, Y.; Abdullah, F. F. J.; Saleh, W. M. M.; Haron, A. W.; Saharee A. A.; Ariff, A. B., Baiee F. H. A., Hambali, I. U. and Sharif, A. (2017). Caseous lymphadenitis in small ruminants: An overview on reproductive implications. *In J Vet An*, 2(2), 23-31.

-Valdivia Zevallos, J. (2015). *Vida intracelular de Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. España.

-van Tongeren, O.F.R. Cluster analysis. In: (R.H.G. Jongman, C. J. F. Braak and Tongeren O.F.R., eds). (1995). *Data analysis in community and landscape ecology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 174-212.

-Vay, C. y Famiglietti, M. (2009). Bacilos Gram Positivos Aerobios: Identificación e Impacto Clínico. En Curso. Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital de Clínicas José de San Martín. Argentina.

-Villanueva Durand, D. A. (2015). Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos procedentes de mercados del Cercado de Lima. Tesis de posgrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

-Voigt, A. y Kleine, F. D. (1975). Infección por corinebacterias. En Zoonosis (Descripción sinóptica orientativa). Editorial Acribia, Zaragoza, España pp. 161-162.

-Weibel, J. C. (2011). Cell invasion and intracellular survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. University of Zurich, Vetsuisse Faculty.

-Weinstock, D. M y Brown A. (2002). E. *Rhodococcus equi*: An emerging pathogen. *Clin Infect Dis*, (34), 1379–1385.

-Williamson, L. H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, (17), 359-371.

-Yeruham, I.; Braverman, Y.; Shpigel, N. Y.; Chizov-Ginzburg, A.; Saran, A. and Winkler M. (1996). Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies I. *Vet Quart*, (18), 87-89.

-Yeruham, I.; Friedman, S.; Elad, D. and Perl, S. (2000). Association between milk production, somatic cell count and bacterial dermatoses in three dairy cattle herds. *Aust Vet J*, (78), 250-253.

-Zerbini, E.; Cardoso, M.; Sequeira, M.; Taher, H.; Santi M.; Larpin, D.; Latini, O.; G. Tonarelli. (1996). Caracterización de ácidos grasos y productos de degradación de ácidos micólicos en especies micobacterianas de mayor incidencia en Argentina. *Rev Argent Microbiol*, (29), 184-194.