



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS EN CEPAS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis AISLADAS DESDE EQUINOS, OVINOS
Y CAPRINOS.

OMAR ALEJANDRO ABARCA GONZÁLEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

PROFESOR GUÍA: PEDRO ÁBALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS EN CEPAS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis AISLADAS DESDE EQUINOS, OVINOS
Y CAPRINOS.

OMAR ALEJANDRO ABARCA GONZÁLEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PEDRO ÁBALOS PINEDA
PROFESOR CONSEJERO: PATRICIO RETAMAL
PROFESOR CONSEJERO: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

SANTIAGO, CHILE
2011

DEDICATORIA.

Con cariño a mis padres y amigos que me apoyaron.

AGRADECIMIENTOS.

A Dr. Pedro Ábalos, por su comprensión, disposición y buen sentido del humor entregado.

A Dr. Patricio Retamal por su buena disposición y voluntad.

A Dr. Andrónico Neira, por su rápida ejecución y voluntad de trabajo, además de facilitar el uso de equipos.

A Dr. Marco Galleguillos, por apoyar con equipos de trabajo y conocimiento.

A Dra. Pilar Oviedo por facilitar el trabajo con equipos y comprensión como Secretaria de Estudios.

A los funcionarios Carlos, don Humberto y don Pato por su disposición y asistencia con material de laboratorio.

A mi familia, a Constanza por su apoyo incondicional y a amigos Diego, Oscar, Juanfri, Sebastián, Cristián gracias por el apoyo.

MEMORIA DE TÍTULO

“DETERMINACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS EN CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* AISLADAS DESDE EQUINOS, OVINOS Y CAPRINOS”.

“DETERMINATION OF EXOPOLYSACCHARIDES IN STRAINS OF *Corynebacterium pseudotuberculosis* ISOLATED FROM EQUINE, OVINE AND CAPRINE”.

Omar A. Abarca González *

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,

Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN.

Se ha observado que cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* provenientes de diferentes especies animales tienen características fenotípicas y genotípicas particulares. *C. pseudotuberculosis* en medios líquidos, se desarrolla formando grumos, esto se debe a que el microorganismo se organiza en agregados bacterianos embebidos en una matriz de exopolisacáridos. El objetivo de este trabajo fue determinar diferencias en la capacidad de producción de exopolisacáridos entre cepas de *C. pseudotuberculosis* provenientes de equinos, ovinos y caprinos. Se estudiaron 4 cepas de cada especie, las que fueron cultivadas para cuantificar su producción de exopolisacáridos mediante el método fenol-ácido sulfúrico. Se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre cepas provenientes de equinos, ovinos y caprinos. Sin embargo, la variabilidad en producción de exopolisacárido de las cepas de *C. pseudotuberculosis* estudiadas, independientemente de la especie animal de origen, sugiere que se realicen investigaciones posteriores para identificar las causas de esa variabilidad.

Palabras claves: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, método fenol-ácido sulfúrico, exopolisacáridos.

ABSTRACT.

It has been observed that strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from different animal species have phenotypic and genotypic particular characteristics. *C. pseudotuberculosis* in liquid culture media develops into lumps; this is mainly because the organism organizes in bacterial aggregates embedded in a matrix of exopolysaccharides. The objective of this work was to determine differences in the exopolysaccharides production capability between strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses, sheep and goats. We studied 4 strains of each specie, which were cultivated for the quantification of exopolysaccharides by the phenol-sulfuric acid method. It was determined that there were no statistically significant differences ($p>0,05$) between strains from horses, sheep and goats. However, the variability in exopolysaccharides production determined among the *C. pseudotuberculosis* strains studied, suggest further research to identify the cause of this variability.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, phenol-sulfuric acid method, exopolysaccharides.

INTRODUCCIÓN.

La linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad infectocontagiosa que disminuye el rendimiento animal, produciendo lesiones abscedativas crónicas, tanto en tejido subcutáneo como en los nódulos linfáticos y órganos internos (Belchior *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007). Esta es producida por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacteria que infecta a diversas especies animales, siendo los ovinos y caprinos los más afectados, aunque también se encuentra en equinos, bovinos, ciervos, camellos, camélidos sudamericanos y hasta en seres humanos (Baird y Fontaine, 2007; Belchior *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007).

C. pseudotuberculosis tiene una distribución mundial y se presenta en la mayoría de las áreas dedicadas a la producción ovina (Baird y Fontaine, 2007). Produce pérdidas económicas debido a la disminución en la producción de lana, carne y leche, disminuye la eficiencia reproductiva y genera decomisos de carcasas en mataderos (Dorella *et al.*, 2006).

El género *Corynebacterium* pertenece al supra-género de los *Actinomycetaceae*, el cual incluye a los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. Estudios filogenéticos indican que los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* se hallan íntimamente relacionados conformando el grupo denominado CMNR, los cuales presentan características comunes en componentes de su pared celular. *C. pseudotuberculosis* presenta en su pared elementos únicos en su género y tiene un alto contenido de lípidos de los cuales el más notable es el ácido micólico. También contiene ácido meso-diaminopimélico, sacáridos como arabinosa, galactosa, y algunos tipos de manosa (Belchior *et al.*, 2006; Dorella *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007). Esta bacteria es un anaerobio facultativo, tiene un crecimiento óptimo a una temperatura de 37 °C y a un pH de 7,0 a 7,2. Al sembrarse en un medio sólido forma colonias de color crema a anaranjado, secas y opacas, de consistencia friable (Baird y Fontaine, 2007; Dorella *et al.*, 2006). En agar sangre presenta un halo tenue de beta hemólisis a las 24-48 h de incubación (Baird y Fontaine, 2007). En medios líquidos se desarrollan como un depósito granular con una película en la superficie, produciendo un sedimento blanco (Dorella *et al.*, 2006).

La pared celular contiene exopolisacáridos, que forman la matriz de una biopelícula. Las biopelículas corresponden a “comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo” (Lasa *et al.*, 2005), organización que les permite a las bacterias sobrevivir en un ambiente hostil y colonizar nuevos nichos (Lasa *et al.*, 2005). Estos exopolisacáridos, en conjunto con los lípidos de la pared celular, inciden en las características de las colonias y del desarrollo en medios líquidos

mencionados anteriormente.

Se ha descrito que el microorganismo causante de LAC tiene la capacidad de sobrevivir por varias semanas en el ambiente, debido a su producción de exopolisacáridos organizados en biopelículas, lo que permite que la enfermedad se mantenga en la población animal, infectando a nuevos animales susceptibles por medio de la contaminación de heridas producidas por el manejo o escoriaciones de la piel (Ábalos, 2011; Cheuquepán *et al.*, 2008; Lasa *et al.*, 2005).

Una vez ingresada la bacteria a través de las lesiones, se disemina por vasos linfáticos y es fagocitada por macrófagos. La compleja pared celular la protege dentro del macrófago y alcanza en éste los nódulos linfáticos regionales (Ábalos, 2011). Como resultado, las infecciones crónicas pueden persistir durante toda la vida del animal, aunque raramente provocan la muerte (Baird y Fontaine, 2007). Glicolípidos y ácido micólico, presentes en su pared, participan en la generación de procesos piógenos, caseificados y abscedativos que caracterizan la enfermedad en las diferentes especies (Pinochet, 1992). Paralelamente la bacteria comienza a producir, en determinadas condiciones ambientales, mayor cantidad de exopolisacáridos para formar la matriz de la biopelícula. Estudios realizados han mostrado que la matriz de exopolisacáridos que forman la biopelícula presentan canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, incluyendo las zonas más profundas (Lasa *et al.*, 2005).

El uso de antimicrobianos para el tratamiento de las lesiones, no es recomendado, pues generalmente no logran llegar a las concentraciones adecuadas en los tejidos afectados debido a las lesiones abscedativas. A esto se suma la capacidad que presentan las biopelículas de presentar heterogeneidad metabólica creando múltiples micronichos, existiendo zonas sin nutrientes las que pueden resultar en una fase estacionaria o dormancia dentro de los agregados bacterianos (Hall-Stoodley y Stoodley, 2009), factor que se debe considerar en la resistencia a antibióticos y efectividad del tratamiento.

Se distinguen dos biovars de *C. pseudotuberculosis* en base a su capacidad de producir la enzima nitrato reductasa: *equi* y *ovis*, siendo el biovar *equi* con capacidad de reducir nitratos a nitritos y el biovar *ovis* careciendo de dicha capacidad. Las cepas aisladas de pequeños rumiantes son nitrato-nitrito negativo, por el contrario, aquellas poseedoras de esta característica son frecuentemente aisladas en equinos y ambos biotipos han sido aislados de bovinos (Baird y Fontaine, 2007; Belchior *et al.*, 2006).

Se ha determinado que existen diferencias entre cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas

desde equinos, ovinos y caprinos, donde se encontraron diferencias genotípicas en base a la secuencia del gen *rpoB* (Retamal *et al.*, 2011). Algunos autores (Baird y Fontaine, 2007; Belchior *et al.*, 2006; Dorella *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007) sugieren diferencias fenotípicas en cuanto a su reducción de nitrato a nitrito. Barrientos *et al.* (2008) encontraron diferencias fenotípicas entre cepas ovinas. Adicionalmente, en colonias equinas se ha observado un mayor tamaño y diferencias en la magnitud de aglomeraciones en medios líquidos¹. La presencia de exopolisacáridos en la pared celular de esta bacteria podría explicar estas diferencias, fenómeno poco descrito para este microorganismo en la literatura. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar diferencias *in vitro* en la producción de exopolisacáridos entre cepas de *C. pseudotuberculosis* provenientes de equinos, ovinos y caprinos.

¹ **ÁBALOS, P.** 2011. [Comunicación Personal]. U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Cepas bacterianas.

Se utilizaron doce cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, provenientes de ovinos (n=4), caprinos (n=4) y equinos (n=4). Estas cepas fueron previamente identificadas por pruebas bioquímicas y confirmadas por PCR y secuenciación del ADN. Antes de este trabajo estuvieron almacenadas a -80°C en un sistema Microbank®.

2. Reactivación de las cepas.

Cada cepa se sembró en agar Trypticase de Soya (TS) enriquecido con 5% de sangre ovina, y se incubaron por 48-72 h a 37 °C, para obtener colonias, las que presentaron un halo tenue de beta hemólisis a las 24-48 h de incubación (Baird y Fontaine, 2007). Una vez crecidas, se seleccionó de cada cepa una colonia característica de *C. pseudotuberculosis*, para ser transferida a tubos con agar TS semitendido, siendo incubadas nuevamente en la estufa por 48-72 h a 37 °C, verificando después del tiempo señalado el crecimiento bacteriano para luego almacenar el tubo en refrigeración entre 2 a 6 °C.

3. Cultivo bacteriano.

Una vez crecidas las cepas, éstas se cultivaron en medio líquido TS, verificando físicamente su viabilidad dentro del tubo. De cada cepa se traspasó 100 µL a un volumen de 100 mL de medio líquido TS, contenido en matraces los cuales fueron puestos en un agitador orbital a 120 rpm, para lograr oxigenación y una mezcla homogénea del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, e incubados simultáneamente a 37°C por 72 h.

4. Extracción y cuantificación de exopolisacárido.

Para la extracción de los azúcares se utilizó el método fenol-ácido sulfúrico modificando el protocolo de Michel *et al.* (2009). Brevemente, se centrifugó el contenido del matraz de cada cepa en tubos Falcon® estériles, previamente pesados, a 8.000 xg, recuperando 10 mL de medio, que fueron filtrados por Millipore 0,2 µm y reservados. El resto de medio se eliminó y se conservó el sedimento de bacterias obteniendo su peso por diferencia del peso inicial del tubo. Sobrenadante y sedimento fueron guardados para cuantificar el exopolisacárido.

- Sobrenadante:

A 0,5 mL de sobrenadante se le adicionó 0,5 mL de solución fenol 5% y luego se agitó en vortex por 1 min, para luego agregar 2,5 mL de ácido sulfúrico 95% y continuar agitándose en vortex por 1 min. Luego de este procedimiento la solución resultante se tornó de un color amarillo-naranja según la concentración de exopolisacárido (Dubois *et al.*, 1956).

- Sedimento:

El sedimento, en cambio, fue tratado con una solución de EDTA y Tween 20®, como detergente, disueltos en agua destilada, con el objeto de solubilizar el exopolisacárido presente en la pared de las bacterias (Michel *et al.*, 2009), para luego tomar 0,5 mL de ésta solución y someterla al mismo procedimiento descrito para el sobrenadante.

Ambos preparados se dejaron reposar a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente incubados a baño María a 30 °C por 15 min para luego leer la absorbancia de ambos preparados en espectrofotómetro UV-visible a 488 nm. Para el análisis del sobrenadante se utilizó como blanco caldo de cultivo TS, sometido al tratamiento colorimétrico, para determinar el exopolisacárido base. Para el sedimento se utilizó la solución de EDTA y Tween 20® disuelta y sometida al tratamiento del método fenol-ácido sulfúrico. Los resultados de absorbancia se analizaron usando una curva estándar de calibración de glucosa (Michel *et al.*, 2009), con un intervalo dinámico de 0 a 400 mg/L. Los resultados de absorbancia fueron luego transformados a miligramos. Una vez obtenidos los miligramos, éstos se llevaron a una base de 1.000 mg de sedimento bacteriano, de esta forma las mediciones entre cepas son equivalentes y normalizadas de manera que los diferentes resultados pueden ser comparables.

5. Bioseguridad.

Debido al potencial riesgo de infección en el ser humano con *C. pseudotuberculosis*, se consideraron normas de bioseguridad para el nivel de riesgo biológico tipo 2 (CONICYT, 2008).

RESULTADOS.

Se calculó la producción de exopolisacáridos en el sobrenadante y en el lavado de sedimento bacteriano de cada cepa de *C. pseudotuberculosis* (Tabla 1) en base a una curva estándar de calibración a concentraciones conocidas de glucosa (Figura 1).

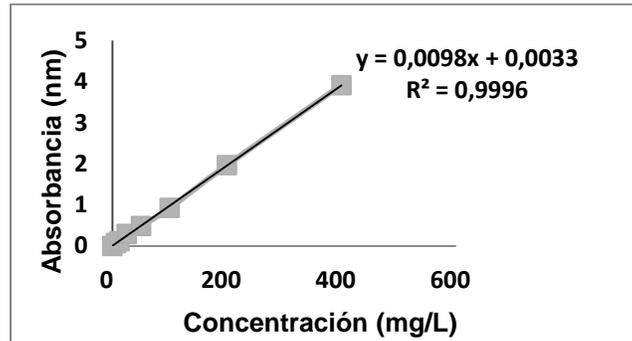


Figura 1. Curva estándar de calibración con concentraciones conocidas de glucosa.

Tabla 1. Cantidad de exopolisacáridos obtenida mediante absorbancia determinada por espectrofotometría UV-visible a 488 nm y basado en los volúmenes reales utilizados para sobrenadante y sedimento de cada cepa de *C. pseudotuberculosis* aisladas de caprinos (C), ovinos (O) y equinos (E).

Cepas	Sobrenadante mg	Sedimento Mg	Total* mg	Restos bacterianos** mg	Base 1.000 mg de sedimento mg
C4	0,489	1,24	1,72	300	5,73
C10	0,244	1,87	2,11	292	7,22
C16	0,289	1,71	1,99	476	4,18
C19	0,222	2,52	2,74	426	6,43
O3	0,189	0,84	1,02	200	5,10
O6	0,533	1,24	1,77	367	4,82
O20	0,355	2,43	2,78	417	6,66
O77	0,389	2,23	2,61	345	7,56
E3	0,833	2,17	3,00	314	9,55
E17	0,322	1,42	1,74	583	2,98
E19	0,533	1,07	1,60	316	5,06
E58	0,555	1,47	2,25	345	6,52

* Cantidad Total= Sobrenadante + sedimento.

** Sedimento después de primera centrifugación.

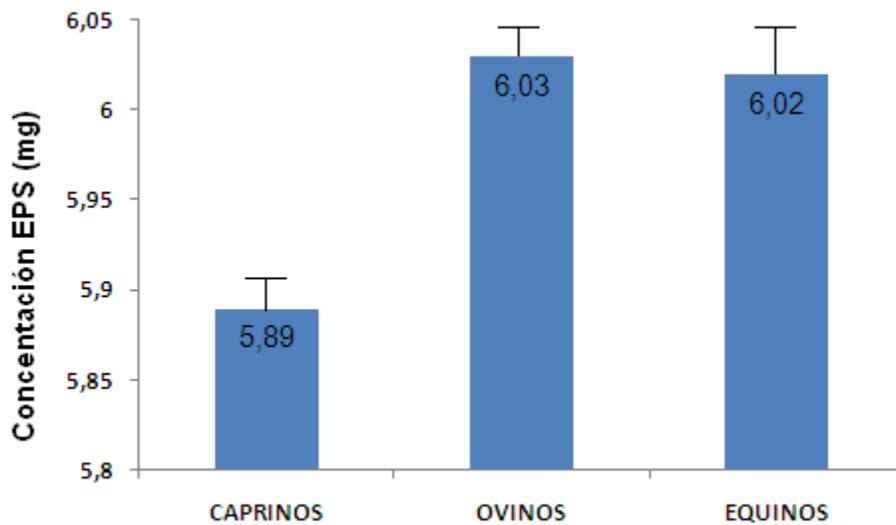


Figura 2. Exopolisacárido promedio en base 1.000 mg obtenido de cepas de *C. pseudotuberculosis* cultivadas en medio líquido, agrupadas según especie animal.

Las diferencias en producción de exopolisacáridos que se observan, de acuerdo al origen de las cepas estudiadas (Figura 2) no son significativas cuando se analizan estos resultados mediante un análisis de varianza ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN.

La organización en biopelículas a partir de exopolisacáridos ha sido demostrada para numerosos patógenos y es una importante estrategia de sobrevivencia microbiana, lo que resulta crucial en muchas infecciones bacterianas crónicas (Hall-Stoodley y Stoodley, 2009). La observación de las cepas de *C. pseudotuberculosis* ha evidenciado diferencias fenotípicas de las colonias de este microorganismo, atribuido fundamentalmente a la producción de exopolisacáridos.

Algunos autores (Barrientos *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2007) han crecido *C. pseudotuberculosis* en medios de cultivo como sangre enriquecida con telurito de potasio, caldo común, caldo de infusión cerebro-corazón (BHI), agar sangre enriquecido con colistina y ácido nalidíxico, agar MacConkey, entre otros. Éste estudio utilizó inicialmente agar TS enriquecido con 5% sangre ovina, seguido de agar TS y finalmente caldo TS como medios de cultivos, observándose un crecimiento normal en cada una de las etapas de desarrollo de las distintas cepas. Además no se evidenció crecimiento de microorganismos indeseados para el estudio bajo las condiciones utilizadas. Al utilizar medios de cultivos sólidos enriquecidos con sangre se favorece la visualización de β - hemólisis en *C. pseudotuberculosis* (Dorella *et al.*, 2006), lo que permite la correcta elección de las colonias en medios sólidos y advertir algunas diferencias en el tamaño, color y conformación de las colonias.

Según Lasa *et al.* (2005) en las etapas del proceso de formación de una biopelícula después de la multiplicación bacteriana se forma una microcolonia, la cual en determinadas condiciones ambientales comienza a secretar exopolisacáridos. Es por ello que todas las cepas fueron analizadas en condiciones similares en cuanto a temperatura y medios de cultivos, para disminuir factores que afecten el desarrollo bacteriano o la productividad de exopolisacáridos entre las cepas bacterianas. En este trabajo, todas las cepas se desarrollaron adecuadamente, aunque se evidenció que algunas obtuvieron un mayor crecimiento. Por esto, el exopolisacárido producido se expresó en base a 1.000 mg de sedimento bacterianos. Fue interesante comprobar que la mayor cantidad de exopolisacárido estaba adherida a los cuerpos bacterianos y no en el sobrenadante del medio de cultivo.

C. pseudotuberculosis se organiza en grumos, esta organización se puede atribuir a exopolisacáridos que secreta el microorganismo en determinadas condiciones (Dorella *et al.*, 2006; Lasa *et al.*, 2005), y para detectar este biopolímero en el medio y en su pared bacteriana se utilizó el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico. Esta técnica de determinación

cuantitativa de exopolisacáridos fue desarrollada inicialmente para determinar microcantidades de azúcares libres y sustancias relacionadas mediante cromatografía. Sin embargo, este método requiere de experiencia, consume tiempo y es sensible a pequeñas variaciones de las condiciones (Dubois *et al.*, 1956). Es por esto que Michel *et al.* (2009) determinaron una técnica alternativa que permite una cuantificación rápida y fácil de exopolisacáridos, en la cual se compara el método fenol-ácido sulfúrico utilizando espectrofotometría y espectroscopia infrarroja transformada de Fourier usando reflexión total atenuada (ATR-FTIR). Para efectos de este estudio ambos métodos de cuantificación son útiles, si bien el método ATR-FTIR es una técnica fiable para los estudios cuantitativos con líquidos, sensible, rápido y sencillo, la naturaleza exacta de los azúcares presentes en exopolisacáridos de las bacterias estudiadas no se conoce, y como la mezcla de azúcares es inevitable en los compuestos secretados por las bacterias, no es posible seleccionar un solo tipo de azúcar que sea representativo de todos los azúcares, ya que podría excluir a una parte de ellos, factor que limita al método ATR-FTIR (Michel *et al.*, 2009). El estudio realizado por Michel *et al.* (2009) consideró bacterias productoras de altas concentraciones de hierro, no siendo el caso de los microorganismos considerados para este estudio, razón por lo cual se modificó el protocolo reportado por Michel *et al.* (2009) en el método fenol-ácido sulfúrico, para cuantificar exopolisacáridos.

Los resultados obtenidos indican que todas las cepas se desarrollaron y pudieron producir exopolisacáridos, sin embargo las diferencias observadas no son estadísticamente significativas entre las distintas cepas respecto de la especie animal de origen, a pesar de que entre todas las cepas sí se ven algunas altamente productoras, y otras que lo hacen en menor cantidad.

Al analizar el sobrenadante, se observó que las cepas equinas tienen una mayor liberación de exopolisacárido al medio, no así las cepas caprinas, donde el exopolisacárido se encuentra en mayor cantidad en el sedimento. Al repetir este experimento y su análisis se corroboraría la concordancia de los resultados, junto a un tamaño muestral mayor para que los datos tengan una mayor validez estadística; en este trabajo no se contó con un mayor número de muestras por su cantidad limitada en el laboratorio, especialmente de las cepas equinas. El tamaño muestral y la heterogeneidad de los datos, influyen directamente en los resultados estadísticos, por lo que se realizó la prueba de Shapiro-Wilks modificado para verificar la distribución normal de los datos y así asumir que se cumple con los supuestos del análisis de varianza (Bustos *et al.*, 2008).

El origen geográfico de las cepas analizadas no fue considerado en este estudio, aunque se establece que existen adaptaciones por parte de las cepas bacterianas al ambiente donde se

desarrollan, debido a que se seleccionan mutaciones que mejoran la adaptación del patógeno a factores ambientales estresantes (Galán *et al.*, 2006). La agitación de los medios de cultivos crea condiciones estresantes, no naturales para las cepas bacterianas, por lo que puede influir en la capacidad de producción de exopolisacáridos hacia el medio (Michel *et al.*, 2009). Estos factores son importantes y podrían influir de alguna forma en los resultados.

C. pseudotuberculosis contiene una gran proporción de lípidos complejos en su pared celular, siendo el ácido micólico considerado como un factor importante en la virulencia de este microorganismo (Dorella *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta la propiedad apolar de los lípidos, se puede sostener que la naturaleza de su pared hidrofóbica podría explicar el crecimiento en grumos de *C. pseudotuberculosis* en medios de cultivos líquidos.

Una vez realizada la determinación de exopolisacáridos en cepas de *C. pseudotuberculosis* provenientes de equinos, ovinos y caprinos se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de cepas analizadas.

Los resultados del análisis mediante espectrofotometría UV-visible a 488 nm y de la cuantificación de exopolisacáridos liberado por las cepas y el correspondiente unido a la pared bacteriana de cada cepa estudiada (*ver Tabla 1*), se observa que el exopolisacárido liberado es menor al adherido a la pared bacteriana.

Existen estudios que plantean diferencias genotípicas y fenotípicas entre cepas de *C. pseudotuberculosis*. Retamal *et al.* (2011) identificaron diferencias en la región hipervariable del gen *rpoB*, además de diferencias fenotípicas observadas tanto en crecimiento como en tamaño de las colonias. Barrientos *et al.* (2008) encontraron diferencias fenotípicas entre cepas de *C. pseudotuberculosis* involucradas en LAC cutánea y visceral en ovinos, por lo que se sugiere la realización de nuevas investigaciones para poder identificar a que se deben estas diferencias y generar mayor conocimiento de la enfermedad, especialmente en el ámbito epidemiológico y en el diagnóstico molecular de la infección.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **ÁBALOS, P.** 2011. Linfadenitis caseosa. **En:** Retamal, P., Ábalos, P., Fredes, F. Enfermedades Animales Producidas por Agentes Biológicos. Ed. Universitaria. Santiago, Chile. pp. 194-197.
2. **BAIRD, G.; FONTAINE, M.** 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. J. Comp. Path. 137: 179-200.
3. **BARRIENTOS, J.; CORTÉS, N.; TÓRTORA, J.; ALBA, F.; DEL RIO, J.; VALDIVIA, G.** 2008. Diferentes biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* están involucrados en la linfadenitis caseosa cutánea y visceral. RECVET. 3(4). [en línea] <<http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n040408/040804.pdf>> [consulta: 16-11-2011].
4. **BELCHIOR, S.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; JODOR, N.; JENSEN, O.** 2006. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Vet. Arg. 23: 258-278.
5. **BUSTOS, A.; RODRIGUEZ, D.; CANTOR, F.** 2008. Andeva para diseño completamente al azar. Rev. Fac. Cs. Bas. 4: 143-148.
6. **CHEUQUEPÁN, F.; RÍOS, M.; ÁBALOS, P.; RETAMAL, P.** 2008. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Una breve actualización. Av. Cs. Vet. 23: 30-34.
7. **COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, (CONICYT).** 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2a. ed. Gobierno de Chile. pp. 136.
8. **DORELLA F.; PACHECO L.; OLIVEIRA S.; MIYOSHI A.; AZEVEDO V.** 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, patogénesis and molecular studies of virulence. Vet. Res. Brasil 37: 201-218.

9. **DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
10. **GALÁN, J.; BAQUERO, M.; MOROSINI, M.; BAQUERO, F.** 2006. Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada. *Asoc. Col. Infect.* 10:22-29.
11. **HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P.** 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11: 1034-1043.
12. **LASA, I.; POZO, J.L. del.; PENADÉS, J.R.; LEIVA, J.** 2005. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. San. Navarra.* 28: 163-175.
13. **MICHEL, C.; BÉNY, C.; DELORME, F.; POIRIER, L.; SPOLAORE, P.; MORIN, D.; D'HUGUES, P.** 2009. New protocol for the rapid quantification of exopolysaccharides in continuous culture systems of acidophilic bioleaching bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 371-378.
14. **PINOCHET L.** 1992. Linfadenitis caseosa. Un problema aún sin solución. *Mon. Med. Vet.Chile.* 14: 21-27.
15. **RETAMAL, P.; RÍOS, M.; CHEUQUEPÁN, F.; ABALOS, P.; PIZARRO-LUCERO, J.; BORIE, C.; GUTIERREZ, J.** 2011. Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis rpoB* gene sequence. *Vet. Microbiol. Chile.* doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.012.
16. **RUIZ, J; BARRERA, M; FRIAS, M.** 2007. Linfadenitis caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. *RECVET.* 2(8). [en línea] <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080807/080707.pdf>> [consulta: 12-05-2011].