



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE CEPAS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* AISLADAS DESDE CAPRINOS Y EQUINOS EN CHILE

MARCO ANTONIO RÍOS CANALES

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PATRICIO RETAMAL MERINO
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO ABALOS.....
PROFESOR CONSEJERO: LEONARDO SÁENZ.....

**SANTIAGO, CHILE
2010**

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
Historia	5
Etiología.....	5
Pruebas bioquímicas.....	6
Taxonomía	7
Factores de virulencia.....	9
Patogénesis	11
Potencial Zoonótico	16
Epidemiología	16
Diagnóstico.....	18
Tratamiento, Control y Erradicación	22
Vacunación.....	24
Genes utilizados en diagnóstico y desarrollo de vacunas.....	25
Pérdidas Económicas.....	18
Situación Nacional.....	26
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES	50
PROYECCIONES	51
AGRADECIMIENTOS	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	59

RESUMEN

El agente biológico *Corynebacterium pseudotuberculosis* es un patógeno animal cosmopolita que genera infecciones supurativas crónicas en diversas especies, siendo la linfadenitis caseosa (LAC) en pequeños rumiantes el cuadro de mayor importancia, pero también se encuentra causando lesiones absedativas en otras especies, como los equinos.

En Chile este patógeno se encuentra presente, sin embargo ninguna de las enfermedades que produce son de notificación obligatoria, ya que son cuadros de tipo debilitante, que no provocan mortalidad y las pérdidas económicas asociadas son difíciles de evaluar. Esto se relaciona con un desconocimiento de las características que presenta este agente, lo que trae consigo la falta de un diagnóstico adecuado y medidas de control para las enfermedades que este produce.

En esta memoria se estudiaron las características fenotípicas, mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas, y genotípicas, utilizando la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y la secuenciación de un fragmento del gen *rpoB*; de un total de 20 aislados nacionales de *C. pseudotuberculosis* obtenidas a partir de lesiones absedativas de caprinos y equinos.

Se evidenció la existencia de diferencias entre los aislados equinos y caprinos en sus características fenotípicas, en la prueba de reducción de nitratos, todas las cepas caprinas fueron negativas y todas las cepas equinas positivas. También se observaron diferencias genotípicas en la secuencia del gen *rpoB* entre los aislados caprinos y equinos.

La técnica de PCR simple como diagnóstico rápido, a partir de muestras clínicas; bajo las condiciones de este estudio, fue capaz de detectar solo el 15% de las cepas obtenidas por aislamiento bacteriológico. Sin embargo, la técnica de PCR múltiple a partir de cultivos puros, fue capaz de detectar a todas las cepas identificadas por aislamiento bacteriológico y pruebas bioquímicas, y en un menor tiempo que estas pruebas. Por lo tanto esta técnica implementada en el presente estudio se muestra como una eficiente alternativa para el diagnóstico de las enfermedades causadas por *C. pseudotuberculosis*.

ABSTRACT

The biologic agent *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cosmopolitan animal pathogen. It causes chronic suppurative infections on several species, being the caseous lymphadenitis (CL) of small ruminants the most important disease, but it can also be found causing absedative lesions in other species, like the horses.

In Chile this pathogen is present, however none of the diseases caused by this agent are of compulsory notification, because it causes debilitating diseases, which don't produce mortality and associated economic losses are difficult to assess. This is related with a lack of knowledge about the characteristics of this agent, which entails the lack of proper diagnosis and control for the diseases it causes.

In this work we studied the phenotypic characteristics, through microbiological and biochemical test, and genotypic characteristics, using the polymerase chain reaction (PCR) and sequencing a *rpoB* gene fragment; of a total of 20 national isolates of *C. pseudotuberculosis* obtained from absedative lesions of goats and horses.

The existence of differences between horse and goat isolates in its phenotypic characteristics were evidenced, since the nitrate reduction test all the goat strains were negative and all equine strains were positive. Genotypic differences were also observed in the *rpoB* gene sequence among isolates obtained from goats and horses.

The simple PCR assay from clinical samples for rapid diagnosis, under the conditions of this study was able to detect only 15% of the strains diagnosed by bacterial isolation. However, multiplex PCR assay from pure cultures was capable of detecting all bacterial strains isolated and identified by biochemical tests, and in less time than those test. This technique implemented on the present study is shown as an efficient alternative for the diagnosis of *C. pseudotuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

Corynebacterium pseudotuberculosis es una bacteria intracelular facultativa, que genera infecciones supurativas de curso crónico que afectan a ovinos, caprinos, bovinos, equinos e incluso al ser humano (Baird y Fontaine, 2007).

El cuadro más corrientemente descrito producido por este patógeno es la linfadenitis caseosa (LAC), también llamada pseudotuberculosis, apostema de los ovinos o enfermedad de Preisz-Nocard. Es una enfermedad de distribución mundial, prevalente en países que se ocupan de la ganadería de pequeños rumiantes. No causa mortandad, pero sí pérdidas económicas por disminución en la productividad de carne y lana. En equinos se asocia al cuadro de linfangitis ulcerativa de las extremidades, también a la formación de abscesos a nivel de los músculos pectorales u otras localizaciones externas (Dorella *et al.*, 2006a; Baird y Fontaine, 2007).

La enfermedad, una vez establecida, resulta difícil de erradicar; debido a las limitantes en el diagnóstico, así como también por la pobre respuesta al tratamiento con antibióticos (Pacheco *et al.*, 2007).

El diagnóstico que se realiza comúnmente es por examen clínico-patológico de las lesiones siendo generalmente de carácter presuntivo y de eficiencia bastante limitada en términos de detección de infectados. El diagnóstico de laboratorio para la identificación más específica de este patógeno consiste en aislamiento (a partir de muestras obtenidas de lesiones sospechosas), para posteriormente evaluar sus características de cultivo y la respuesta a determinadas pruebas bioquímicas (Dorella *et al.*, 2006a), más recientemente se ha introducido la utilización de métodos de biología molecular como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para un diagnóstico más simple y rápido (Cetinkaya *et al.*, 2002).

Este trabajo pretende describir características las que presenta este agente en nuestro país mediante el aislamiento de cepas de *C. pseudotuberculosis* obtenidas desde caprinos y equinos, determinando sus características fenotípicas, bioquímicas y moleculares.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Historia

C. pseudotuberculosis fue descrito por primera vez en el año 1888 por el veterinario francés Edmond Isidore Etienne Nocard, quien recuperó la bacteria de un caso de linfangitis bovina. Tres años después en Budapest, Hugo von Preisz la aisló de un absceso renal de una oveja. El microorganismo descrito como similar al bacilo causante de la difteria, se llamó bacilo de Preisz-Nocard. Denominaciones posteriores para esta bacteria fueron: *Bacillus pseudotuberculosis ovis*, *Bacillus pseudotuberculosis* y *Corynebacterium ovis*. Finalmente en 1948 se lo nombra oficialmente como *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Dorella *et al.*, 2006a).

La etimología de la palabra "corynebacterium" es de origen griego y hace referencia a la morfología y agrupación de la bacteria (Koriné: garrote o mazo y Bacterion: bastoncillo), y "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 (Belchior *et al.*, 2006).

Etiología

El patógeno intracelular facultativo *C. pseudotuberculosis* se clasifica como perteneciente al género *Corynebacterium*, familia *Actinomycetae del dominio de las Eubacterias*. Este género está conformado por un grupo heterogéneo de especies que incluye patógenos animales y humanos, así como bacterias ambientales (Khamis *et al.*, 2004). Son bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados (Collins y Cummins, 1986) cuya pared celular está conformada por: peptidoglicanos, representados por el ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP); azúcares tales como arabinosa y

galactosa; y ácidos grasos de cadena corta, llamados ácidos micólicos, siendo estos el elemento más característico de la pared celular (Dorella *et al.*, 2006a).

Esta bacteria es de morfología variable observándose desde formas cocoides hasta formas bacilares bien definidas. Su rango de tamaño va desde los 0,5 μm a 0,6 μm por 1,0 μm a 3,0 μm (Dorella *et al.*, 2006a). La tinción Gram positiva, puede ser irregular y presentar gránulos metacromáticos (Hirsh y Biberstein, 2004). Es una bacteria acapsulada, inmóvil y presenta fimbria. Se observan al frotis con una organización típica de "Letras Chinas" (Belchior *et al.*, 2006; Baird y Fontaine, 2007).

Al cultivarse en medio sólido inicialmente crece disperso en la superficie del agar, para luego organizarse en colonias pequeñas de color crema anaranjado, de aspecto seco y opaco, dentro de las 48 a 72 h de incubación. Las condiciones óptimas para su desarrollo son 37°C de temperatura y pH de 7,0 a 7,2 (Dorella *et al.*, 2006a). El cultivo microbiano se ve favorecido mediante la adición de suero o sangre entera al medio de cultivo. En medio líquido se desarrollan como un depósito granular con una película en la superficie. Esta tendencia de formar agregados se relaciona con la presencia de ácidos micólicos en la parte externa de la pared celular (Baird y Fontaine, 2007).

En agar sangre se aprecia hemólisis variable, pudiendo presentarse un halo tenue de β hemólisis. Sin embargo, se observan grandes zonas de hemólisis cuando actúa en forma sinérgica con *Rhodococcus equi* (Yeruham *et al.*, 1997).

Pruebas bioquímicas

En relación a las pruebas de fermentación de hidratos de carbono, se describe variabilidad en la capacidad de utilización de azúcares entre aislados de *C. pseudotuberculosis*. Lo más frecuentemente observado es la fermentación de glucosa,

galactosa fructosa, maltosa y manosa. Cabe destacar que no se genera gas como producto de estas reacciones (Collins y Cummins, 1986; Dorella *et al.*, 2006a).

Desde los primeros trabajos de *C. pseudotuberculosis*, se observó que los aislados de diferentes especies de mamíferos mostraban diferencias en su capacidad de reducir nitratos (producción de la enzima nitrato reductasa). Esta diferencia en algunas cepas de utilizar nitrato (NO_3^-) como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia generando nitritos (NO_2^-) como producto final (Dorella *et al.*, 2006a), permitió la clasificación en dos biovars, con distinta distribución por especie; biovar *ovis* o biotipo 1 para cepas no reductoras de nitratos, aisladas de ovinos y caprinos, y biovar *equi* o biotipo 2 para cepas reductoras de nitratos, aisladas de bovinos y equinos (Baird y Fontaine, 2007). Estos biovars difieren tanto en propiedades bioquímicas y serología como en características epidemiológicas (Hirsh y Biberstein, 2004).

Taxonomía

Como especie bacteriana *C. pseudotuberculosis* fue clasificado originalmente a partir de las similitudes entre aislados, basándose en características morfológicas y propiedades bioquímicas (Dorella *et al.*, 2006a). La aparición de técnicas para evaluar el grado de similitud del DNA u homología genética han permitido determinar de mejor manera el grado de parentesco de diferentes especies de Corynebacterias y cepas (Ruiz *et al.*, 2007). Algunos aspectos de importancia en la clasificación de este patógeno son:

1. Caracterización biovars *equi* y *ovis*.

La capacidad de producir la enzima nitrato reductasa permitió diferenciar los biovars *equi* y *ovis*. El posterior análisis filogenético en base a la secuencia que codifica para la subunidad ribosomal 16S de RNA (16S rDNA) permitió concluir que los biovars *equi* y *ovis* no corresponden a subespecies debido a su alta similitud genética (Dorella *et al.*, 2006a).

2. Relación con *Corynebacterium ulcerans* y *Corynebacterium diphtheriae*:

Corynebacterium ulcerans es considerado un microorganismo comensal en bovinos y equinos aunque también se asocia con cuadros de mastitis en bovinos (Dessau *et al.*, 1995; De Zoysa *et al.*, 2005). *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* son las únicas especies del género *Corynebacterium* capaces de producir la exotoxina fosfolipasa D (FLD). Esta toxina se encuentra presente en casi todas las cepas de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, diferenciándose de *C. diphtheriae*, el agente causal de la difteria en humanos, donde la toxina diftérica se encuentra presente solamente en la mitad de los aislados de esta bacteria. Se describe que algunas cepas de *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis* también pueden producir la toxina diftérica (Baird y Fontaine, 2007; D'Afonseca *et al.*, 2008). Dorella y col (2006b) estudiando la secuencia nucleotídica de los genes *rpoB* y 16S rDNA para construir un árbol filogenético, determinaron que *C. pseudotuberculosis* es filogenéticamente más cercana a *C. ulcerans* que a *C. diphtheriae*, sugiriendo que *C. diphtheriae* divergió de ambos en algún momento.

3. Grupo CNMR (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*):

Basándose en la constitución de su pared celular y de sus ácidos nucleicos (alto contenido de G+C), los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* se asociaron en un grupo denominado "CMNR" (Ruiz *et al.*, 2007). El análisis de los ácidos micólicos, al ser constituyentes importantes de la pared celular, ayudó mucho a aclarar la taxonomía del grupo "CNMR", ya que el largo de cadena de los ácidos grasos, la cantidad de grupos funcionales e insaturaciones varían de acuerdo al género y, en menor medida, entre especies (Baird y Fontaine, 2007). Posteriormente estudios filogenéticos de la secuencia de 16S rDNA, confirmaron la existencia de una relación muy próxima entre estos géneros (Ruiz *et al.*, 2007).

Factores de virulencia

No se han descrito cepas avirulentas de *C. pseudotuberculosis* (Dorella *et al.*, 2006a), habiéndose identificado varios mecanismos patogénicos, los principales factores de virulencia son:

1. Fosfolipasa D (FLD):

Las fosfolipasas corresponden a un grupo variado de enzimas capaces de hidrolizar uno o más enlaces éster en glicerofosfolípidos. Se clasifican con las letras A-D de acuerdo al tipo de enlace éster específico sobre el cual actúa. En las células eucariontes las enzimas fosfolipasas juegan un rol importante en la transducción de señales, la mantención de la estructura de membrana y como parte de la respuesta inflamatoria celular (Ruiz *et al.*, 2007; Belchior *et al.*, 2006). Debido a que las membranas celulares de los tejidos están compuestas de proteínas y lípidos, constituyen un blanco de ataque importante para las bacterias patógenas (Ruiz *et al.*, 2007).

La FLD actúa específicamente catalizando la reacción de hidrólisis de la esfingomiélna, fosfolípido constitutivo importante de las membranas celulares, en fosfato de ceramida y colina (Dorella *et al.*, 2006a). Estudios en relación a la actividad biológica y la estructura molecular de la FLD de *C. pseudotuberculosis* han mostrado que existen similitudes con las esfingomiélinasas presentes en el veneno de las arañas del género *Loxosceles* (D'Afonseca *et al.*, 2008).

Estructuralmente la FLD es una glicoproteína con una composición aminoacídica similar a la del colágeno y un peso molecular de 31,5 kDa (Belchior *et al.*, 2006). Esta toxina está presente en casi todas las cepas de *C. pseudotuberculosis* siendo antigénicamente idéntica entre ellas. Se encuentra almacenada en el citoplasma y en menor proporción en la pared celular, siendo excretada al exterior como una exotoxina (D'Afonseca *et al.*, 2008).

Dentro de las actividades biológicas que se describen para FLD se encuentran: dermonecrosis (Carne., 1940), efecto sinérgico en la eritrolisis en presencia de un factor extracelular producido por *Rhododcoccus equi* y la inhibición de la eritrolisis producida por la β hemolisina de *Staphilococcus aureus* (Barksdale *et al.*, 1981; Centinkaya *et al.*, 2002); estos dos últimos efectos son utilizados como pruebas de laboratorio para la identificación de *C. pseudotuberculosis*.

Esta 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 (Belchior *et al.*, 2006).

2. Ácidos micólicos:

La pared celular de *C. pseudotuberculosis* presenta elementos únicos en su género, caracterizándose por un alto contenido de lípidos de los cuales el más notable es el ácido micólico o también llamado ácido corinomicólico. Este contiene cadenas de ácidos grasos cortas, entre 20 y 36 átomos de carbono, del tipo saturadas y monoinsaturadas (Baird y Fontaine, 2007). Constituyen una cubierta lipídica, con características de cera, en la superficie de la pared celular. Esta cubierta tiene propiedades citotóxicas bien descritas, las que juegan un rol de importancia en la patogenia (Belchior *et al.*, 2006). Es así como la inyección experimental en ratones de ácidos micólicos extraídos desde *C. pseudotuberculosis* genera aumento de volumen localizado, con congestión y un área central de necrosis hemorrágica (Ruiz *et al.*, 2007). Los ácidos micólicos también inducen cambios degenerativos y muerte en leucocitos fagocíticos, sin embargo, a diferencia del efecto letal de la inyección de moléculas similares extraídas desde micobacterias, el efecto citotóxico de los ácidos micólicos de *C. pseudotuberculosis* se encuentra confinado al sitio de inyección (Baird & Fontaine, 2007).

Algunos autores sugieren que la cubierta de ácidos micólicos permite a *C. pseudotuberculosis* sobrevivir por largos periodos en el ambiente, una característica

común con otros miembros de la familia de los Actinomicetos (Belchior *et al.*, 2006; Baird y Fontaine, 2007).

3. Otros factores:

Se ha considerado como otro factor de virulencia 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 (Baird y Fontaine, 2007).

Patogénesis

C. pseudotuberculosis ingresa por abrasiones o heridas superficiales en la piel, donde son fagocitados por macrófagos que migran al sitio de invasión; en la mayoría de los casos la infección es controlada en esta etapa (Belchior *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007). Si esto no ocurre, las bacterias se diseminan a los nódulos linfáticos subcutáneos o submucosos locales. Debido a que este microorganismo posee la capacidad de mantenerse viable y multiplicarse dentro de los macrófagos, es considerado un parásito intracelular facultativo (Ruiz *et al.*, 2007).

En etapas tempranas se observa infiltración con neutrófilos y daño endotelial. Los metabolitos tóxicos y la exotoxina FLD destruyen a los leucocitos de forma lenta pero continua, dando lugar a la formación de abscesos, la lesión característica (Hirsh y Biberstein, 2004; Ruiz *et al.*, 2007). Las bacterias no controladas por la pared del absceso entran a los capilares y forman colonias que ocluyen los vasos generando isquemia, que junto a las toxinas, eliminan las células del tejido sano, aumentando la masa necrótica. Si escapan bacterias viables se disemina la enfermedad a través de los vasos linfáticos y penetra en otros linfonodos, y eventualmente, en los vasos sanguíneos, llegando a diferentes órganos donde se repite la formación de abscesos.

El tejido conectivo de los abscesos puede romperse y descargar pus y bacilos al exterior (Baird y Fontaine, 2007), por otra parte, la distribución, progreso y apariencia de los abscesos difiere entre especies y según la vía de ingreso del agente, sin embargo, es una característica común el compromiso de tejido linfático (Hirsh y Biberstein, 2004; Ruiz *et al.*, 2007).

En relación al efecto de la exotoxina FLD en la patogenia, este sería la hidrólisis de la esfingomielina de las membranas de las células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos, lo que genera desestabilización de sus membranas, lisis celular e incremento de la permeabilidad vascular, con la consecuente formación de edema. De esta manera facilita la colonización y diseminación regional y sistémica de *C. pseudotuberculosis* en el hospedador (Belchior *et al.*, 2006; Baird y Fontaine, 2007).

La FLD también ayudaría a la bacteria en el sitio de la infección mediante otros mecanismos como la inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos hacia el sitio de infección, generando como consecuencia una menor probabilidad de fagocitosis en las etapas tempranas de la infección (Ruiz *et al.*, 2007). En algunos aspectos este efecto estaría en desacuerdo con otras teorías, que proponen que en las etapas tempranas de infección la bacteria parasitaria células fagocíticas multiplicándose en su interior. Además, otros autores han indicado que FLD podría jugar un papel en el escape de la bacteria desde el interior del macrófago. Es posible que este rol esté relacionado a la acción de la FLD sobre las capas internas de fosfolípidos de la membrana celular del macrófago (Baird y Fontaine, 2007; D'Afonseca *et al.*, 2008). La infección aguda con *C. pseudotuberculosis* está caracterizada por lesiones supeditadas a la acción de la exotoxina sobre el eritrocito (Dorella *et al.*, 2006a).

La cubierta de ácidos micólicos de *C. pseudotuberculosis* le otorga al microorganismo protección mecánica y posiblemente bioquímica, permitiéndole resistir la digestión por enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas, resistiendo la fagocitosis y permaneciendo dentro del macrófago como parásito intracelular facultativo. Esta

capacidad es probablemente esencial para la migración del organismo desde el punto de ingreso hacia al sitio de desarrollo de la lesión (Williamson, 2001; Ruiz *et al.*, 2007). Además, los lípidos de la pared celular constituyen un factor piogénico, relacionado con la infiltración masiva con leucocitos polimorfonucleares, que transportan las bacterias a los nódulos linfáticos, y con el efecto citotóxico que destruye a los fagocitos, por lo tanto la generación de abscesos. En infecciones experimentales en ratones, se demostró una relación directa entre la cantidad de lípidos de pared celular producidos por distintos aislados de *C. pseudotuberculosis* y su habilidad de producir abscesos crónicos (Belchior *et al.*, 2006; Baird y Fontaine, 2007).

Manifestaciones Clínicas

C. pseudotuberculosis ha sido aislado de abscesos y otros procesos supurativos en diversas especies de mamíferos (Pacheco *et al.*, 2006). Se acepta como agente etiológico de patologías principalmente en pequeños rumiantes y menos frecuentemente en equinos y bovinos (Centinkaya *et al.*, 2002; Yeruham *et al.*, 2004).

En pequeños rumiantes se describen cuadros clínicos bien diferenciados; el más frecuente es la linfadenitis caseosa (LAC), caracterizado por la supuración y necrosis progresiva de linfonodos subcutáneos, con la formación de focos caseosos que posteriormente se abscedan (Hirsh y Biberstein, 2004). Existe también una forma visceral con desarrollo de abscesos en órganos vitales como pulmones, hígado y riñones (Belchior *et al.*, 2006); y formas de baja frecuencia de presentación como poliartritis en corderos, toxemia neonatal, endometritis, y mastitis (más frecuente en las cabras), epididimitis y orquitis (Ruiz *et al.*, 2007).

El período de incubación es muy variable y prolongado. Se ha observado, tanto en cabras como en ovejas, un lapso de varios meses (4 - 6 meses) e incluso años, desde el momento de la infección hasta el desarrollo de abscesos (Belchior *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007). La enfermedad se instaura de modo insidioso y adopta un curso crónico,

generalmente la bacteria tiende a confinarse a los nódulos linfáticos, evolucionando hacia la recuperación cuando el pus escapa al exterior. Las formas viscerales con nódulos necróticos internos bien encapsulados son compatibles con un desarrollo vital aparentemente normal (Belchior *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007), en las formas más graves hay un deterioro en la condición orgánica del animal observándose signos clínicos, tales como disminución del peso corporal, retardo en el tiempo de maduración sexual e incluso abortos. En raras ocasiones causa mortalidad y esta se asocia al desarrollo de grandes abscesos pleuropulmonares (Ruiz *et al.*, 2007). Las características clínicas incluyen, anemia, leucocitosis con neutrofilia, altos valores de fibrinógeno y hipoproteinemia o hiperproteinemia por aumento de globulinas (Belchior *et al.*, 2006; Pinheiro Junior *et al.*, 2006).

El cuadro de LAC en caprinos y ovinos es muy similar, siendo el mismo biovar de *C. pseudotuberculosis* el responsable de la enfermedad (Dorella *et al.*, 2006a). Las principales diferencias, se relacionan con la distribución de las lesiones, pues en caprino se afectan en la mayoría de los casos los linfonodos superficiales de cuello y cabeza, principalmente parotídeos y mandibulares; en cambio en ovinos, las lesiones en cabeza y cuello son relativamente raras, siendo los linfonodos del torso, prescapulares y precrales los más afectados (Belchior *et al.*, 2006; Baird y Fontaine, 2007; Ruiz *et al.*, 2007). También en caprinos las formas viscerales son menos frecuentes que en ovinos (Belchior *et al.*, 2006; Baird y Fontaine, 2007).

En equinos, *C. pseudotuberculosis* es reconocido como el agente etiológico de tres cuadros: abscesos pectorales subcutáneos profundos, linfangitis ulcerativa, foliculitis y furunculosis contagiosa (Aiello y Mays, 2000; Hirsh y Biberstein, 2004; Gädicke *et al.*, 2008).

La manifestación más severa y más frecuente de la infección por *C. pseudotuberculosis* en equinos, es abscesos subcutáneos profundos también llamados "pigeon fever" o falsas paperas, presentándose sobre el 90 % de los casos (Belchior *et al.*, 2006). Normalmente se encuentran en los músculos del pecho y hombros y en la

región abdominal caudal (Baird y Fontaine, 2007). En relación a la signología clínica puede observarse tumefacción, dolor y cojeras dependiendo de la ubicación y el tamaño de los abscesos (Hirsh y Biberstein, 2004). La mayoría de los caballos no demuestra manifestaciones sistémicas de la enfermedad; sin embargo, en algunos casos se presenta fiebre, depresión, inapetencia y leucocitosis con neutrofilia (Aiello y Mays, 2000; Gädicke *et al.*, 2008). Los abscesos pueden alcanzar gran tamaño antes de romperse y resuelven lentamente (Hirsh y Biberstein, 2004). En algunos caballos se presentan abscesos internos por diseminación secundaria de los abscesos superficiales hacia peritoneo, mesenterio, hígado, bazo, riñones, útero, diafragma y pulmones; con signología como pérdida de peso, cólico, ataxia o septicemia, pudiendo en estos casos causar abortos y mortalidad (Hirsh y Biberstein., 2004; Baird y Fontaine, 2007).

La linfangitis ulcerativa, es una presentación actualmente muy escasa. Corresponde a vasculitis linfática de las extremidades similar a una celulitis severa (Belchior *et al.*, 2006). La infección ingresa aparentemente a través de heridas, a menudo de los miembros posteriores, diseminándose por vasos linfáticos aferentes, generando tumefacción y el desarrollo de abscesos en su recorrido hacia la región inguinal. Estos abscesos son lesiones subcutáneas nodulares que al romperse descargan un exudado purulento sin olor, formando úlceras necróticas. El progreso de la lesiones es lento pudiendo persistir por meses, volviéndose una condición crónica como series de úlceras desarrollándose y resolviendo. Ocasionalmente se ven afectadas áreas distintas a las extremidades (Aiello y Mays, 2000; Hirsh y Biberstein, 2004).

La foliculitis y furunculosis (acné contagioso equino, viruela equina Canadiense y dermatitis pustular contagiosa equina) es un cuadro de menor importancia clínica, probablemente representa una infección secundaria de *C. pseudotuberculosis* a una seborrea o dermatitis preexistente. Las lesiones tienden a formarse en zonas de contacto con arneses y otros aperos. Nuevamente la lesión característica es un pequeño nódulo que crece hasta formar una pústula, que al romperse descarga material purulento. Estas lesiones tienden a resolver espontáneamente y ocasionalmente pueden generarse úlceras en el sitio de la infección (Baird y Fontaine, 2007).

Potencial Zoonótico

Actualmente la infección por *C. pseudotuberculosis* es reconocida como una enfermedad zoonótica emergente. En general, las infecciones en humanos son raras y usualmente se presentan como LAC adquirida por exposición ocupacional (Centinkaya *et al.*, 2002; Belchior *et al.*, 2006). En un gran número de casos, la transmisión se produce a través de lesiones cutáneas al contacto directo con ovinos, caprinos o ambientes contaminados (Belchior *et al.*, 2009), se describe también como factor de riesgo el consumo de leche cruda proveniente de animales afectados (Peel *et al.*, 1997).

La infección en humano tiende a ser crónica, observándose generalmente una linfadenitis granulomatosa supurativa, que afecta linfonodos axilares, inguinales o cervicales. También se describen cuadros atípicos con reportes de neumonía eosinofílica (Keslin *et al.*, 1979) e infección ocular (Liu *et al.*, 2005). La signología clínica observada es similar a la que se presenta en un cuadro gripal, variando desde cuadros asintomáticos a signos tales como: fiebre, anorexia, fatiga, pérdida de peso, mialgias y artralgias (Belchior *et al.*, 2009). Pese a que el tratamiento inicial a este cuadro es la administración de antibióticos parenterales, la mayoría de los casos requiere la escisión quirúrgica del linfonodo afectado (Baird y Fontaine, 2007).

Epidemiología

En caprinos las principales rutas de infección son por contacto directo a través de la mucosa oral y a través de heridas en la piel de la cabeza y el rostro, lo que corresponde con la ubicación de los abscesos (Baird y Fontaine, 2007). Los factores de riesgo se asocian a aspectos de comportamiento como el acicalamiento mutuo y peleas a cabezazos. Se debe considerar también que la mayoría de las cabras no son esquiladas, siendo este el principal factor de riesgo para ingreso del agente en ovinos (Pinochet, 1992; Kuria *et al.*, 2001; Belchior *et al.*, 2006). El ingreso de animales con infección subclínica a un rebaño sano juega un rol muy importante en la introducción de la

enfermedad a un rebaño (Centikaya *et al.*, 2002). La importancia de la transmisión por medio de artrópodos como vectores sólo se ha estudiado en garrapatas y no serían una vía importante de diseminación (Ruiz *et al.*, 2007).

La prevalencia de la infección aumenta con la edad, siendo los porcentajes de aislamiento mayores en cabras adultas de más de 1 año (Hirsh y Biberstein, 2004). Se discute si la infección es capaz de ser transmitida verticalmente (Ruiz *et al.*, 2007).

En equinos el mecanismo de infección no está bien estudiado, probablemente la transmisión es por contacto directo entre caballos o fómites como aperos y equipo de limpieza contaminados (Aiello y Mays, 2000; Hirsh y Biberstein, 2004), permitiendo así el ingreso de la bacteria a través de escoriaciones y grietas en el tegumento (Gädicke *et al.*, 2008). La frecuencia de infección por *C. pseudotuberculosis* aumenta generalmente en los meses de calor de años de alta pluviosidad; este aumento se explicaría porque los inviernos lluviosos favorecen el desarrollo de insectos en el verano y otoño, y existe evidencia de transporte activo de esta bacteria por parte de parásitos como *Habronema* spp y mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) que actuarían como vectores (Pinochet, 1992; Gädicke *et al.*, 2008). La humedad y falta de condiciones higiénicas predispone a los animales al cuadro de linfangitis ulcerativa, sin embargo, la enfermedad también puede ocurrir bajo excelentes condiciones de manejo (Aiello y Mays, 2000; Hirsh y Biberstein, 2004). No se reporta que la edad sea un factor predisponente en esta enfermedad, sin embargo la infección raramente se encuentra en animales menores de un año. Por otra parte estudios plantean que no existiría predisposición por raza, sexo y tipo de trabajo del animal (Gädicke *et al.*, 2008).

Un aspecto de importancia en la ocurrencia de infección, que explica en parte la naturaleza endémica de la enfermedad, es la contaminación ambiental con material producto de la ruptura de abscesos (Ruiz *et al.*, 2007).

C. pseudotuberculosis es considerado un habitante accidental de suelos (Hirsh y Biberstein, 2004). Aunque no es capaz de multiplicarse en el ambiente, puede persistir por

largo tiempo en este (Baird y Fontaine, 2007). La bacteria puede permanecer viable por 6 meses o más en suelos contaminados experimentalmente con pus, así como condiciones ambientales de bajas temperaturas, humedad y la presencia de fómites, como superficies de madera, aumentan al sobrevivencia del organismo (Williamson, 2001).

Temperaturas sobre 60°C son capaces de eliminar a *C. pseudotuberculosis* (Hirsh y Biberstein, 2004). La bacteria parece ser sensible a los desinfectantes químicos más comunes, sin embargo, se debe considerar que el patógeno normalmente se encuentra dentro de una matriz de detritus purulentos, que dificultarían la llegada del desinfectante al agente (Baird y Fontaine, 2007; Ruiz *et al.*, 2007).

Pérdidas Económicas.

La LAC en pequeños rumiantes se encuentra distribuida en todo el mundo. Su prevalencia actual se considera subestimada, debido a que en muchos países no es una enfermedad de notificación obligatoria (Cetinkaya *et al.*, 2002). Por esta misma razón las pérdidas económicas que produce muchas veces han sido mal evaluadas, ya que al ser una enfermedad debilitante no provoca una alta mortalidad y la signología clínica en muchos casos no resulta evidente, sin embargo, las pérdidas económicas de la linfadenitis caseosa son variadas, asociándose a disminución de la eficiencia reproductiva, menor ganancia de peso, decomiso de carnes afectadas, costos asociados a atención veterinaria, el consumo de medicamentos y la eliminación de animales en planes de control (Ruiz *et al.*, 2007).

Diagnóstico

1. Clínico:

El criterio diagnóstico para la infección por este agente es la presunción clínica confirmada con el aislamiento e identificación de *C. pseudotuberculosis* (Baird y Fontaine, 2007).

Típicamente el diagnóstico de la infección se realiza mediante el examen clínico patológico de los animales (Centinkaya *et al.*, 2002). La naturaleza del material purulento al interior de estos varía bastante según la antigüedad de la lesión, que macroscópicamente puede tener desde una apariencia cremosa en abscesos recientes hasta muy seca fácilmente disgregable en abscesos más antiguos (Hirsh y Biberstein, 2004). Los abscesos en caprinos no tienen la morfología característica que presentan los ovinos de láminas concéntricas fibrosas separadas por material caseoso, similares a una cebolla (Baird y Fontaine, 2007) sino que al interior de la cápsula del absceso presentan un contenido de consistencia pastosa uniforme más bien seca, esto debido al tipo de enzimas fagocíticas caprinas, altamente licuefactivas (Belchior *et al.*, 2006).

2. Bacteriológico:

Para realizar el diagnóstico etiológico se debe hacer aislamiento de la bacteria. Las muestras para cultivo, incluyen aspirado de abscesos, exudado purulento tomado con tórula y biopsias (Aiello y Mays, 2000). Mediante la observación al microscopio de frotis de material purulento pueden observarse formas cocobacilares, ya que en la mayoría de los casos las lesiones contienen solo *C. pseudotuberculosis* (Hirsh y Biberstein, 2004). Posteriormente la identificación de *C. pseudotuberculosis* se realiza mediante pruebas bioquímicas (Centinkaya *et al.*, 2002; Dorella *et al.*, 2006a; Dorella *et al.*, 2006b; D'Afonseca *et al.*, 2008). Esto permite diferenciar esta bacteria de otros patógenos (Pacheco *et al.*, 2007). Es así como en caprinos, abscesos y linfadenitis supurativa pueden ser causados por varios otros organismos piogénicos, como *Arcanobacter (Actinomyces) pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida* y ocasionalmente anaerobios como *Fusobacterium necrophorum* (Aiello y Mays, 2000). En equinos, los diagnósticos diferenciales incluyen pioderma, abscesos y linfangitis causados por otras bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Streptococcus spp*, o *Dermatophilus spp* (Aiello y Mays, 2000).

C. pseudotuberculosis puede ser identificado mediante su perfil enzimático y su habilidad de utilizar diversas fuentes de carbohidratos (Baird y Fontaine, 2007). Además de la utilización de substratos, existen pruebas de identificación que evalúan la capacidad hemolítica, como las pruebas de CAMP y CAMP reversa. La prueba de CAMP se basa en la hemólisis sinérgica que se desarrolla por interacción entre la FLD de *C. pseudotuberculosis* y el factor equi de *Rhodococcus equi*, generándose zonas de aumento de hemólisis, al ser cultivados ambos agentes en un medio sólido que contenga sangre (Barksdale *et al.*, 1981). La prueba de CAMP reversa o inhibición de CAMP se fundamenta en el efecto inhibitorio que ejerce la FLD de *C. pseudotuberculosis* sobre la hemólisis producida por la lisina β estafilocócica (Baird y Fontaine, 2007).

La variabilidad fenotípica que tienen algunas cepas de *C. pseudotuberculosis* determinan diferencias en los resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para su identificación, lo que dificulta el diagnóstico de la infección (Centinkaya *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2007). Si bien el aislamiento e identificación de *C. pseudotuberculosis* es el método más indicado para realizar el diagnóstico etiológico, en muchos casos no es ventajoso o posible de realizar. La punción de abscesos es una fuente de contaminación ambiental, siendo un riesgo de transmisión hacia otros animales. En otros casos las lesiones externas crónicas tienden a la fibrosis dificultando la recuperación del agente desde el interior del absceso (Baird y Fontaine, 2007).

3. Serológico:

Se han desarrollado varias pruebas serológicas para resolver el problema de la identificación clínica de la LAC. La mayoría detecta anticuerpos contra la toxina FLD, incluyendo la prueba de fijación del complemento, prueba de la inhibición de hemólisis sinérgica, prueba de microaglutinación, neutralización de la toxina y prueba de ELISA. (Pacheco *et al.*, 2007) Un resultado positivo en la prueba debe ser interpretado como exposición a la toxina y puede indicar infección activa. Animales infectados pueden dar

resultados falsos negativos, probablemente debido a que la infección se encuentra bien encapsulada al interior de los abscesos, o si los individuos se encuentran severamente debilitados (Aiello y Mays, 2000). 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 (Belchior *et al.*, 2006). Los títulos de anticuerpos calostrales usualmente desaparecen entre los 3 a 6 meses de edad, así que las pruebas serológicas de caprinos menores a 6 meses deben ser interpretadas con precaución. Los animales vacunados darán resultados positivos y no deben ser incluidos en un programa de diagnóstico serológico. Los caprinos tienden a mostrar mayores títulos que los ovinos (Aiello y Mays, 2000). El inconveniente que han mostrado las pruebas serológicas, ha sido su baja eficiencia diagnóstica y su incapacidad de discriminar entre animales previamente expuestos de aquellos que mantienen el estado de portador (Dorella *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2007)

4. Molecular:

Se ha sugerido que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simplificaría la identificación de esta especie bacteriana (Centinkaya *et al.*, 2002). El PCR basado en la secuencia 16S rDNA desarrollado por Centinkaya *et al.* (2002) resultó ser útil para estimar la prevalencia de LAC en los animales estudiados, pero presentó algunas limitaciones. En primer lugar depende del cultivo bacteriano y en segundo lugar no resultó ser lo suficientemente específico para distinguir entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, ya que el 16S rDNA es un gen altamente conservado entre las especies del género (Khamis *et al.*, 2005). Para superar esta limitante Pacheco *et al.* (2007) reportaron el uso de un ensayo de PCR múltiple para la detección de *C. pseudotuberculosis* desde cultivos puros y desde muestras clínicas. Como blancos de amplificación se incluyeron las secuencias 16S rDNA, *pld* y *rpoB*, obteniendo un método de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficacia en la identificación de la bacteria.

Tratamiento, Control y Erradicación

En relación al tratamiento de la enfermedad, existen una serie de factores que dificultan la eliminación del agente desde rebaños o individuos infectados (Ruiz *et al.*, 2007) El principal factor es la ineficacia de la terapia antimicrobiana (Pacheco *et al.*, 2006), ya que en la mayoría de los casos los antibióticos son incapaces de penetrar a través de la gruesa cápsula de los abscesos manteniendo de esta forma bacterias viables y protegidas en su interior (Dorella *et al.*, 2006a; Ruiz *et al.*, 2007). Se debe considerar también la variabilidad en la sensibilidad de diferentes cepas del microorganismo a antimicrobianos (Ruiz *et al.*, 2007). En términos generales, se describe que la bacteria es sensible a penicilinas, eritromicina, cloranfenicol, lincomicina, tetraciclina, enrofloxacino y sulfamida con trimetoprim; siendo resistente a aminoglicosidos (Hirsh y Biberstein, 2004). Otros tratamientos, como el vaciamiento quirúrgico de los abscesos, no son efectivos, puesto que se describen frecuentes recidivas (Aiello y Mays, 2000) y es un factor de riesgo en la diseminación del agente por medio de la contaminación ambiental (Ruiz *et al.*, 2007). Por lo tanto cualquier drenaje debe ser hecho de tal manera que el material purulento pueda ser recolectado y solo se recomienda en el caso de ejemplares de alto valor (Aiello y Mays, 2000).

En el caso de los caprinos, considerando los factores anteriormente descritos, las medidas de prevención y control sobre los rebaños se presentan como la mejor alternativa (Aiello y Mays, 2000). Existe consenso que la mejor estrategia para controlar la enfermedad es la vacunación de los rebaños sanos, junto con la identificación y remoción de los animales infectados y la reducción de la exposición a fómites potencialmente contaminados (Dorella *et al.*, 2006a; Aiello y Mays, 2000); Sin embargo, esta estrategia se ve mermada por las limitaciones en las técnicas de diagnóstico (Pacheco *et al.*, 2006). La erradicación de LAC es difícil debido a la rápida diseminación de la enfermedad una vez introducida en un rebaño (Centinkaya *et al.*, 2002). Si se realiza un estricto programa de control es posible disminuir la prevalencia de la enfermedad; pudiendo efectuarse la erradicación de la enfermedad cuando esta alcanza niveles bajos, entonces se debe dejar de vacunar y eliminar a todos los animales seropositivos no vacunados. La prevención de

la entrada de la enfermedad en un rebaño limpio se basa en monitoreo serológico y aislamiento de los animales que ingresen al rebaño. Los animales seropositivos o no vacunados no deben ser aceptados en el rebaño (Aiello y Mays, 2000).

Para la linfangitis y abscesos en equinos está indicado tratamiento de soporte. En estadios tempranos los aumentos de volumen son tratados con calor local o linimentos. En el caso de los abscesos, se puede realizar el drenaje y posterior lavado con soluciones yodadas, si estos son de gran tamaño se recomienda la extracción quirúrgica del linfonódo afectado (Aiello y Mays, 2000). Se realiza antibioticoterapia con penicilina o combinaciones de sulfa trimetoprim por períodos prolongados para prevenir o tratar la diseminación de la enfermedad. Si el tratamiento es exitoso, la inflamación disminuye en días o semanas. En casos severos o sin tratamiento las lesiones pueden volverse crónicas, generándose fibrosis e induración de los miembros (Aiello y Mays, 2000). La prevención y control se basa exclusivamente en buenas medidas de sanitización, control de moscas y evitar la contaminación ambiental innecesaria desde animales enfermos. Adecuada sanitización, eliminación de camas contaminadas y la desinfección puede disminuir la incidencia de nuevos casos. El apropiado manejo de heridas también es importante para prevenir la infección (Sellon y Long, 2007).

Vacunación

Las vacunas que se producen actualmente para el control de LAC generalmente utilizan fosfolipasa D debido a que es el principal antígeno protectorio.

Entre las vacunas disponibles para la inmunización de ovinos y caprinos se encuentra la vacuna USDA (National Animal Disease Center, Ames, IA USA), que contiene pared celular de *C. pseudotuberculosis* no viable y la vacuna GlanvaCTM6 (CSL Limited, New Zealand), que es una vacuna múltiple que incluye antígenos de *C. pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvei*. Se incluye en las vacunas FLD inactivada ya que este es el principal antígeno protectorio (Belchior *et al.*, 2006). Las campañas de vacunación incluyen una primera vacunación a las 8 y a las 12 semanas de vida, luego de que la inmunidad calostrual ha terminado su efecto, esta puede ser mejorada al administrar un "booster" a las cabras preñadas 1 mes previo al parto. Y se debe administrar una dosis cada 6 meses, para mantener una inmunidad efectiva (Belchior *et al.*, 2006; Aiello y Mays, 2000) La vacuna se aplica en la zona alta del cuello, cercana a la oreja, y puede causar la formación de un granuloma estéril en el sitio de inyección que puede persistir por semanas o meses (Belchior *et al.*, 2006). La vacuna actúa disminuyendo la incidencia y prevalencia de LAC dentro del rebaño, pero no previenen todas las nuevas infecciones ni curan a los animales ya infectados (Aiello y Mays, 2000).

En equinos no existen vacunas disponibles comercialmente, se ha utilizado una vacuna bacterina toxoide experimental, que actuaría previniendo la diseminación pero no la infección, generando una respuesta protectoria. Sin embargo, no ha sido efectiva en ensayos de campo (Aiello y Mays, 2000; Ruiz *et al.*, 2007). La imposibilidad de reproducir experimentalmente la enfermedad como se ve en caballos en áreas endémicas y la naturaleza esporádica de la enfermedad complica la investigación en este ámbito (Sellon y Long, 2007).

Genes utilizados en diagnóstico y desarrollo de vacunas

Con los avances en el campo de la genómica, muchos genes de *C. pseudotuberculosis* han sido caracterizados, la mayoría relacionados a factores de virulencia (D'Afonseca *et al.*, 2008). Aun no se han podido identificar todos los genes involucrados, ya que el genoma de la bacteria no ha sido secuenciado completamente, tampoco se han encontrado plasmidios en los aislados de *C. pseudotuberculosis*, descartando este mecanismo de transmisión de factores de virulencia (Dorella *et al.*, 2006a). Algunos de los genes más estudiados son:

1. *pld*:

Corresponde al gen que codifica para la exotoxina. Hogdson *et al* (1992) utilizaron una cepa de *C. pseudotuberculosis* al cual se le suprimió el gen de la fosfolipasa D (*pld*) demostrando que la aplicación subcutánea en dosis única con esta cepa atenuada *Toximinus*, fue protectora para ovinos desafiados a cepas silvestres (D'Afonseca *et al.*, 2008) Además, se ha utilizado como blanco de amplificación en ensayos de PCR múltiple para discriminar entre aislados de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans* (Pacheco *et al.*, 2007).

2. *rpoB*:

Corresponde a la subunidad β de la RNA polimerasa y su secuencia codificante se ha utilizado para estudios filogenéticos de algunos géneros bacterianos (Dorella *et al.*, 2006b, D'Afonseca *et al.*, 2008). A través de su secuencia también se han identificado especies de *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2004).

3. 16S rDNA:

Como secuencia codificante del RNA ribosomal 16S, se ha utilizado en ensayos previos tanto para el diagnóstico como para el análisis filogenético del género *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2004).

Situación Nacional

Existen antecedentes de ocurrencia de LAC en ovinos desde los años 30 (Pinochet, 1992). En los últimos años se ha reconfirmado la enfermedad en ovinos con prevalencias altas en la Región de Aysen (Tadich *et al.*, 2005). En caprinos, las lesiones de LAC son corrientes de encontrar, ya sea en forma clínica o en mataderos de todo el país¹. En las regiones de Atacama y Coquimbo la enfermedad se presenta con muy baja frecuencia, debido a sus condiciones áridas (Pinochet, 1992).

En equinos se ha aislado cada vez más frecuentemente *C. pseudotuberculosis* en abscesos pectorales². De acuerdo al boletín veterinario oficial publicado por el SAG durante los años 1999-2004, las denuncias por este tipo de infección son escasas (52 casos diagnosticados de una población expuesta de 153 equinos) que se concentraron en la zona centro sur (Galleguillos *et al.*, 2005).

Con los antecedentes anteriormente expuestos acerca de la importancia de *C. pseudotuberculosis* y la falta de estudios en nuestro país, se plantea la necesidad de caracterizar aislados nacionales de este agente.

¹ * Comunicación personal, Drs. Juan Lazo, Richard Arancibia, Rigofredo Veneros y Marcela Gómez

² Comunicación personal Dr. Pedro Abalos, Junio 2008

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- i. Existen diferencias fenotípicas y genotípicas entre los aislados caprinos y equinos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

OBJETIVO GENERAL

Describir las características fenotípicas y moleculares, de aislados nacionales de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtenidos desde caprinos y equinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Aislar e identificar cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a partir de lesiones abscedativas de caprinos y equinos.
- ii. Determinar características fenotípicas de los aislados obtenidos mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas diferenciales.
- iii. Determinar características genotípicas de los aislados mediante PCR y secuenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

El tamaño de la muestra que se estimó obtener fue de 10 cepas de *C. pseudotuberculosis* (5 cepas obtenidas desde caprinos y 5 desde equinos). La fórmula utilizada para determinar la cantidad de abscesos a muestrear se encuentra en el Anexo 1 (Thrusfield, 1990).

El muestreo se realizó en la Región Metropolitana, entre Septiembre de 2008 hasta Mayo de 2010, donde se obtuvo el material purulento de un total de 43 abscesos, provenientes de 24 caprinos y 19 equinos, utilizando para la recolección tómulas estériles inmersas en medio de transporte (T' en T'®), medio Cary-Blair).

Aislamiento bacteriológico y determinación de características fenotípicas

Las muestras se sembraron desde las tómulas en placas Petri con agar común adicionando un 5% de sangre ovina, siendo incubadas en condiciones aeróbicas durante 48 hs a 37° C.

Desde las placas que presentaron crecimiento de colonias sospechosas de *C. pseudotuberculosis* y que al examen microscópico se observaron cocobacilos Gram positivos, mantenidos como cultivos puros en tubos de agar tripticasa-soya tendido, a partir de los cuales se realizaron las pruebas indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1.- Pruebas bioquímicas y de hemólisis establecidas como criterio diagnóstico de *C .pseudotuberculosis*.

Pruebas bioquímicas	Resultados	Referencias
Fermentación de ³ : Glucosa Lactosa Trealosa Salicina	 + - - -	Dorella <i>et al.</i> , 2006a . Collins y Cummins, 1986.
Catalasa Licuefacción de Gelatina Reducción de Nitratos ⁴	 + - - / +	
Pruebas de hemólisis		
CAMP ⁵ CAMP-reversa ⁵	 + +	Barksdale <i>et al.</i> , 1981. Centinkaya <i>et al.</i> , 2002.

³ Fermentación sin producción de gas en medio Durham.

⁴ Se consideraron negativas las cepas pertenecientes al biovar *ovis* y positivas las del biovar *equi* (Dorella *et al.*, 2006a).

⁵ Pruebas de detección de Fosfolipasa D: *prueba de CAMP* o hemólisis sinérgica con *Rhodococcus equi* y CAMP reversa o hemólisis antagónica con *Staphylococcus aureus*.

Determinación de características genéticas

PCR simple y múltiple.

Se realizaron dos tipos de ensayos de PCR:

PCR simple como diagnóstico directo, a partir de las tómulas con material purulento, usando los partidores que amplifican un segmento del 16S rDNA (16S-R y 16S-R).

PCR múltiple como diagnóstico confirmatorio, a partir de cultivos puros de *C. pseudotuberculosis* obtenidos por medio del aislamiento bacteriológico. Los blancos de amplificación fueron *pld* (PLD-F y PLD-R3), 16S rDNA (16S-R y 16S-R) y *rpoB* (C2700F y C3130R).

En el Anexo 2 se detalla información acerca de los oligonucleótidos utilizados como partidores para ambos tipos de PCR.

Procesamiento de la muestra.

Se realizaron protocolos distintos de procesamiento para la obtención de DNA según el tipo de muestra utilizada, es decir tómulas con material purulento (muestras clínicas) y cultivos bacterianos puros.

Muestras clínicas: La tórula con material purulento, fue depositada en un tubo de centrífuga que contenía un volumen de 1mL de agua destilada. Se centrifugó por 10 min a 10.000g, retirándose el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 500 µL de agua bidestilada estéril repitiendo el procedimiento. Se agregó luego de este paso un volumen de 500 µL de agua bidestilada estéril. Las muestras se incubaron a 100 °C durante 15 min y se centrifugaron por 5 min a 6.000g. Finalmente se tomó el sobrenadante y se depositó en un tubo de centrífuga limpio.

Cultivos bacterianos puros: se extrajo el DNA desde un inóculo bacteriano crecido a fase estacionaria en caldo tripticasa soya. Se traspasó una alícuota de 100 µL de cada cepa a microtubos que contenían un volumen equivalente a 500 µL de perlas de

zirconia/silica (0,1 y 0,5 mm) y 500 µL de DNAzol (Invitrogen ®). Se sometieron a agitación en el equipo Mini Bead Beater (Cole Palmer®) a 4800 rpm por 2 min, 2 veces. Luego se centrifugó por 5 min a 10.000g, traspasándose el sobrenadante a un tubo limpio, adicionando 250 µL de etanol absoluto, mezclándolo por inversión y dejándolo a T° ambiente por 5 min. Se centrifugó a 10.000g por 10 min. El sobrenadante fue eliminado, lavando 2 veces el pellet con 500 µL de etanol al 75 % y se centrifugó a 10.000g por 5 min. Se secó el precipitado a temperatura ambiente por 15 min agregando 100 µL de agua destilada. La concentración final de ADN se midió en un espectrofotómetro con filtro 260 nm. El ADN extraído se mantuvo almacenado a -20°C.

Condiciones de amplificación: La mezcla de la reacción y los tiempos de amplificación se realizaron para ambos tipos de PCR según el protocolo descrito por Pacheco *et al.* (2007) con algunas modificaciones. El ensayo de PCR simple se realizó en un volumen final de 12,5 µL y el PCR múltiple en un volumen final de 20 µL, con 1,5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen ®), 1X PCR buffer (Invitrogen ®), 15 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 2 µM de cada partidor y 10 ng DNA templado. Como control positivo se utilizó DNA extraído desde cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas previamente en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias la U. de Chile y evaluadas por las pruebas bioquímicas nombradas anteriormente. De control negativo se utilizó una muestra de absceso de equino con diagnóstico clínico de Gurma y aislamiento bacteriológico de *Streptococcus equi*.

Como control de pureza de los reactivos de PCR se usó agua bidestilada estéril en el lugar de la muestra.

Ciclos de la reacción: Denaturación inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 40 seg y 70°C por 1 min; extensión final a 72°C por 7 min.

Los amplificados se visualizaron mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Para la observación de los geles se utilizó un transiluminador UV.

Amplificación y secuenciación del gen *rpoB*

El PCR para la secuenciación se realizó a partir de DNA obtenido desde las cepas que dieron resultados positivos al PCR múltiple, utilizándose una región del gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa *rpoB* como secuencia blanco en la reacción de amplificación, esta secuencia en estudios previos ha demostrado mayor polimorfismo que el 16S rDNA entre distintos aislados de *C. pseudotuberculosis* (Khamis *et al.*, 2004). El segmento amplificado contiene una zona muy variable entre cepas, pero los partidores alinean en un sector conservado.

En la reacción de PCR se utilizaron los partidores específicos para *rpoB* (C2700F y C3130R), manteniéndose los parámetros descritos previamente para el resto de los reactivos. Los amplificados de 446 pares de bases fueron purificados desde el gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel (Promega®) y la secuenciación automática fue realizada por Macrogen DNA Sequencing Inc. (Seúl, Corea) utilizando los partidores descritos C2700F y C3130R.

Análisis de resultados de secuenciación: Para detectar diferencias nucleotídicas entre las secuencias *rpoB* de los distintos aislados se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias utilizando el programa Vector NTI 8®, que usa el algoritmo Clustal W. Este programa es capaz de identificar sitios de polimorfismo y de cuantificar las diferencias entre distintas secuencias.

Análisis estadístico

Se realizó una comparación de los resultados obtenidos mediante el aislamiento bacteriológico y el ensayo de PCR simple a partir de muestras clínicas. La significancia de las diferencias se determinó mediante la prueba estadística de McNemar y la concordancia entre ambas mediante el estadístico Kappa.

RESULTADOS

1.-Diagnóstico de infección por *C. pseudotuberculosis*.

Se recolectó el material purulento de un total de 43 abscesos, provenientes de 24 caprinos y 19 equinos de la Región Metropolitana. En el caso de los caprinos las lesiones se ubicaban principalmente en linfonodos submandibulares muestreándose 10 abscesos (42%), también se encontraron afectados 3 linfonodos precurales (12,5%), 2 prescapulares (8%), 2 cervicales (8 %) y 2 retromamarios (8%), se muestrearon 3 abscesos de glándula mamaria (12,5%), y una muestra de leche en un caso de mastitis (4%). En equinos se muestrearon 8 abscesos pectorales (42%), 4 de abdomen ventral (21%), 3 de linfonodos submandibulares (15,7%), dos abscesos prepuciales (10,5%), uno cervical (5,2%) y uno en el muslo (5,2%).

Un animal fue considerado infectado cuando se logró realizar el aislamiento bacteriano y a aquellos que sólo dieron PCR positivo desde tórula (Tabla 2).

Tabla 2.- Porcentaje de infección de *C. pseudotuberculosis* en lesiones abscedativas de caprinos y equinos.

Animales muestreados	Infectados	No infectados	Total	Infección (%)
Caprinos	15	9	24	60
Equinos	7	14	19	36.8

1.2.-Cepas aisladas de *C. pseudotuberculosis*

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se clasificaron de acuerdo a la especie animal de origen (Tabla 3).

Tabla 3.- Aislados de *C. pseudotuberculosis* obtenidos en este estudio.

	Identificación	N° total de aislados
Aislados Caprinos	CT-1, CT-2, CT-3, CT-4, CT-7, CT-8, CT-11, CT-12, CT-13, CT-14, CT-15, CT-16, CT-17, CT-18, CT-19	15
Aislados Equinos	ET-1, ET-3, ET-8, ET-17, ET-19	5

2.-Determinación de características fenotípicas mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas.

Todos los aislados de *C. pseudotuberculosis* estudiados presentaron características a la observación de placas con cultivo de colonias pequeñas, secas de color claro y al examen microscópico se observaron formas cocobacilares gram positivas.

En las Tablas 4 y 5 se muestran los resultados de las pruebas realizadas en los aislados caprinos y equinos respectivamente.

Los resultados de las pruebas bioquímicas son similares entre aislados, observándose diferencias en la fermentación de trealosa donde el 26% de las cepas caprinas y el 20 % de las cepas equinas mostraron respuestas positivas.

Todas las cepas caprinas fueron incapaces de reducir nitratos clasificándose como biovar *ovis* y todas las cepas equinas fueron nitrato reductoras clasificándose como biovar *equi*.

Tabla 4.- Resultados de pruebas bioquímicas y de hemólisis para las cepas caprinas.

Cepa	Glucosa	Lactosa	Trealosa	Salicina	Hidrólisis Gelatina	Catalasa	Reducción Nitratos	CAMP	CAMP-R
C-1	+	-	+	-	-	+	-	+	+
C-2	+	-	-	-	-	+	-	+	+
C-3	+	-	-	-	-	+	-	+	+
C-4	+	-	-	-	-	+	-	+	+
CT-7	+	-	+	-	-	+	-	+	+
CT-8	+	-	-	-	-	+	-	+	+
CT-11	+	-	-	-	-	+	-	+	+
CT-12	+	-	-	-	-	+	-	+	+
CT-13	+	-	-	-	-	+	-	+	+
CT-14	+	-	-	-	-	+	-	+	+
CT-15	+	-	+	-	-	+	-	+	+
CT-16	+	-	+	-	-	+	-	+	+
CT-17	+	-	-	-	-	+	-	+	+
CT-18	+	-	-	-	-	+	-	+	+
CT-19	+	-	-	-	-	+	-	+	+

Tabla 5.- Resultados de pruebas bioquímicas y de hemólisis para las cepas equinas.

Cepa	Glucosa	Lactosa	Trealosa	Salicina	Hidrólisis Gelatina	Catalasa	Reducción Nitratos	CAMP	CAMP-R
ET-1	+	-	-	-	-	+	+	+	+
ET-3	+	-	-	-	-	+	+	+	+
ET-8	+	-	-	-	-	+	+	+	+
ET-17	+	-	+	-	-	+	+	+	+

3.-Descripción características genéticas

3.1-PCR simple desde muestras clínicas.

El objetivo de utilizar la prueba de PCR simple fue intentar realizar un el diagnóstico directo del agente infeccioso en muestras patológicas. La comparación con el aislamiento bacteriológico en ambas especies estudiadas se encuentra en las tablas 6 y 7.

Tabla 6.- Comparación de resultados de la detección *C. pseudotuberculosis* utilizando el PCR simple en muestras clínicas y el aislamiento bacteriológico en caprinos.

Caprinos	Muestra con aislamiento	Muestra sin aislamiento	Total
PCR +	2	0	2
PCR -	13	9	22
Total	15	9	24

$$\chi^2 = 11,0769231$$

$$kappa = 0,103$$

Tabla 7.- Comparación de resultados de la detección *C. pseudotuberculosis* utilizando el PCR simple en muestras clínicas y el aislamiento bacteriológico en equinos.

Equinos	Muestra con aislamiento	Muestra sin aislamiento	Total
PCR +	1	2	3
PCR -	4	12	16
Total	5	14	19

$$\chi^2 = 0$$

$$kappa = 0,275$$

En el análisis estadístico la prueba de Mc Nemar (utilizando 1 G.L.) demostró que en caprinos que existen diferencias significativas en la capacidad de detección entre el aislamiento bacteriológico y el PCR simple en muestras clínicas ($\chi^2=11,076$), en equinos en cambio no existieron diferencias en la capacidad de detección de ambas pruebas

($\chi^2=0$). En la evaluación de la concordancia entre ambas, en caprinos la concordancia fue leve ($kappa=0,105$) y en equinos aceptable ($kappa=0,275$), de acuerdo a la tabla de valoración propuesta por Landis y Koch (1977).

3.1-PCR múltiple desde cultivos puros.

Todas las cepas aisladas tanto equinas como caprinas amplificaron las tres secuencias *pld*, 16S rDNA y *rpoB*, obteniéndose amplicones de 202, 816 y 446 pares de bases respectivamente (Figura 1).

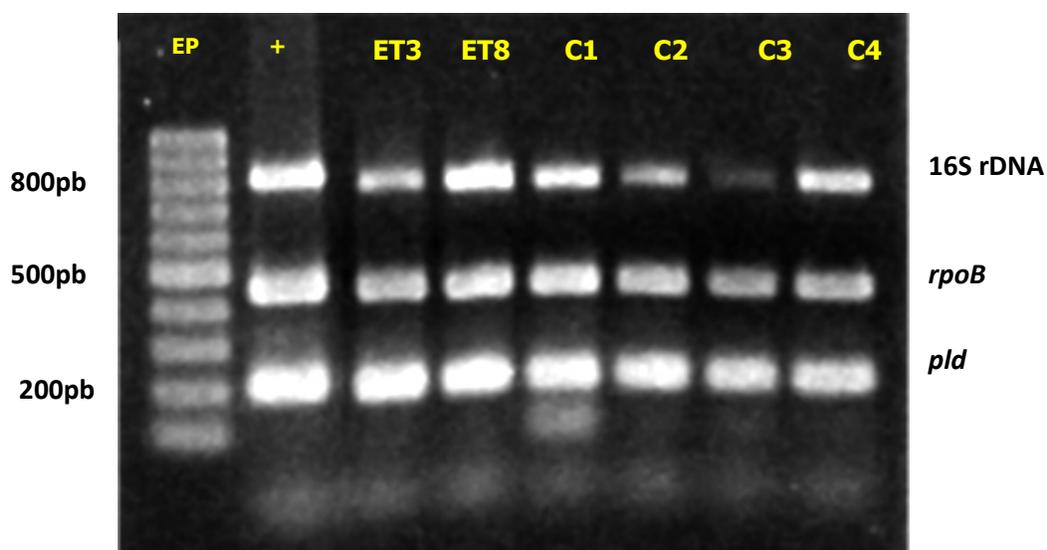


Figura 1.- Imagen de amplificados de las secuencias 16S rDNA, *rpoB* y *pld* (gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio). Corridas que muestran la reacción del DNA obtenido de los siguientes aislados + (control positivo cepa equina de *C. pseudotuberculosis*) **ET3, ET8** (aislados equinos de *C. pseudotuberculosis*), **C1-C4** (aislados caprinos de *C. pseudotuberculosis*), **EP** (estándar de peso 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®))

3.3- Secuenciación del gen *rpoB*

De todas las cepas de las cuales se secuenció el gen *rpoB*, las secuencias obtenidas resultaron idénticas para todos los aislados pertenecientes a la misma especie animal, existiendo diferencias entre las secuencias de cepas caprinas y equinas en 3 sitios del gen (Figura 2).

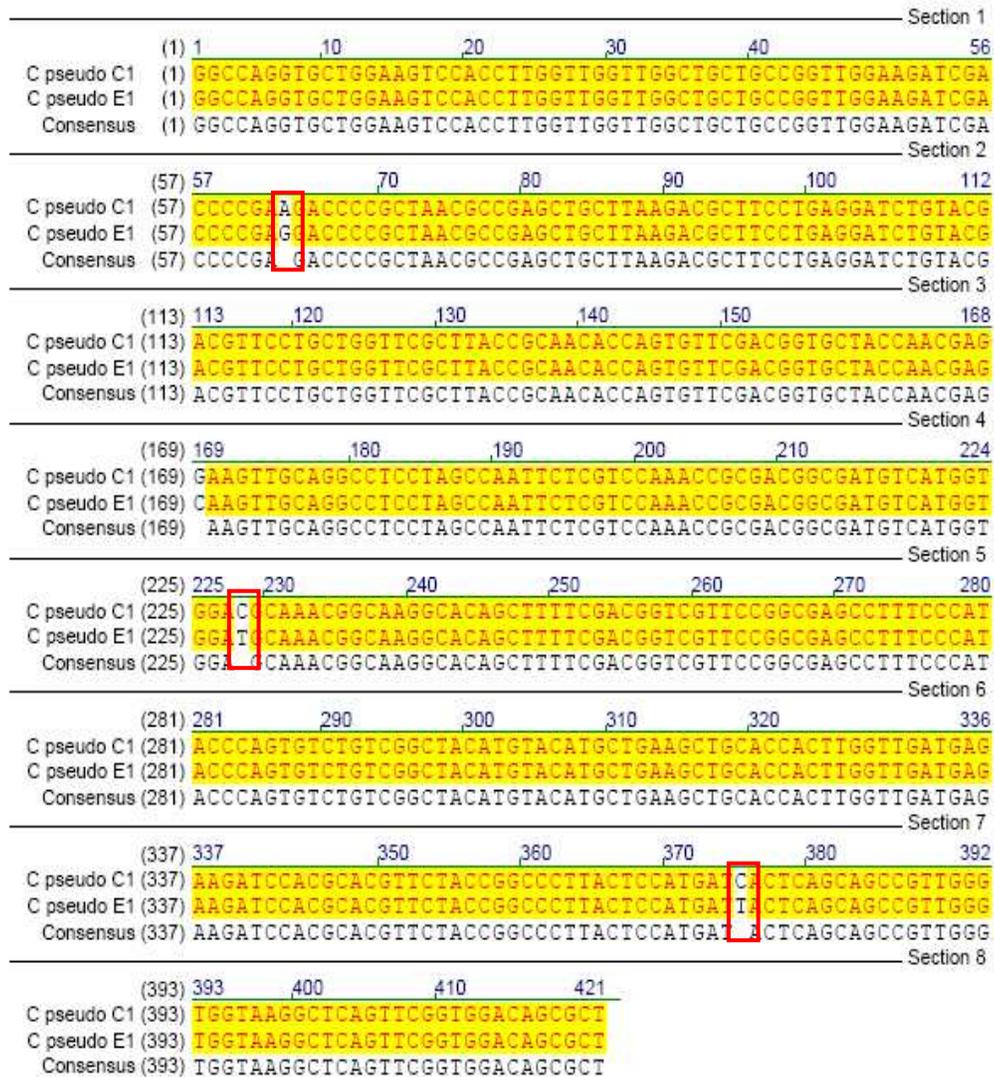


Figura 2.-Alineamiento de la secuencia del gen *rpoB* comparando cepas caprinas (C. pseudo C1) y equinas (C. pseudo E1) y la secuencia consenso (Consensus). Se resaltan las diferencias en los sitios 63, 228 y 375.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue obtener antecedentes acerca de las características fenotípicas y genotípicas de aislados caprinos y equinos. Se debe destacar que no existe mucha información al respecto, enfocándose la mayoría de los estudios en la especie ovina. Por lo tanto, la importancia de este estudio radica en aportar a la caracterización de las cepas existentes en nuestro país que se encuentran afectando a estas dos especies.

1.- Diagnóstico de infección por *C. pseudotuberculosis*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que el agente *C. pseudotuberculosis* se encuentra en nuestro país afectando a las especies caprina y equina. La no existencia de estudios prevalenciales nacionales en estas especies dificultaron la estimación del tamaño muestral a estudiar, sin embargo, basándose en reportes de otros países (Yeruham *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2007; Baird y Fontaine, 2007), e información nacional de la especie ovina (Tadich *et al.*, 2005), el número de muestras necesarias para este estudio se estimó considerando una prevalencia de un 50% de *C. pseudotuberculosis* en lesiones sospechosas. Cabe destacar que siendo este estudio de carácter descriptivo acerca de las características del patógeno en nuestro país, el tamaño muestral obtenido no permite establecer prevalencias, sólo tasas de infección en abscesos, que corresponden a 60% en caprinos y 36,8 % en equinos. Estos valores contrastan con lo esperado de acuerdo a los reportes previos ya mencionados (Yeruham *et al.*, 2004; Tadich *et al.*, 2005; Baird y Fontaine, 2007, Ruiz *et al.*, 2007) que indican que en pequeños rumiantes con lesiones sugerentes de LAC, *C. pseudotuberculosis* puede recuperarse con una frecuencia de un 70 a 80% y que este porcentaje es aún mayor en equinos, al considerar los abscesos pectorales. De acuerdo a los factores de riesgo epidemiológicos, se pueden plantear algunas explicaciones respecto a lo observado:

1. Condiciones climáticas y presentación de abscesos en equinos

La presentación de la enfermedad en equinos se considera de carácter estacional (Doherr *et al.*, 1998) ya que la frecuencia de aparición de casos de abscesos pectorales aumenta en los meses de calor de años de alta pluviosidad (Pinochet *et al.*, 1992), estas condiciones climáticas favorecerían el desarrollo de insectos como la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) que actuarían como vectores mecánicos de *C. pseudotuberculosis* (Foley *et al.*, 2004), no así en pequeños rumiantes donde diversos estudios descartan la posibilidad de que los artrópodos vectores sean una vía importante de diseminación (Ruiz *et al.*, 2007).

Tanto el semestre primavera – verano 2008 – 2009 como el semestre primavera – verano 2009 – 2010 fueron anormalmente cálidos y secos en la zona central. En relación a las precipitaciones el año 2008 finalizó con un superávit de precipitaciones 12.2% respecto al normal anual, a diferencia del periodo anterior el año 2009 finalizó con un déficit de precipitación acumulado de -11% (Aceituno, 2008; 2009; 2010). De acuerdo con lo anterior, se esperaba una mayor presentación de casos en equinos en los periodos estivales de las temporadas 2008-2009. Se obtuvieron 12 muestras en el semestre primavera-verano 2008-2009 y tan solo 4 muestras en el periodo 2009-2010, pero el porcentaje de aislamiento de *C. pseudotuberculosis* fue mucho menor en el periodo 2008-2009 (25%) que en el 2009-2010 (50%). Por lo tanto pese a que en el periodo 2008-2009 se presentaron condiciones climáticas que favorecen la presentación de casos esto no se vio reflejado en forma importante en el número de aislamientos obtenidos pero si en una mayor cantidad de lesiones sospechosas. La explicación que atribuimos al mayor porcentaje de aislamiento es que, durante el periodo 2008-2009 debido a las condiciones climáticas debió haber mayor presencia de mosca de los cuernos, este díptero pudo actuar como vector mecánico no solo de *C. pseudotuberculosis*, sino también de otros agentes capaces de generar abscesos como por ejemplo *Staphylococcus aureus* (Owens *et al.*, 1998).

2. Condiciones de manejo

Las instalaciones y condiciones de manejo afectan los patrones de las enfermedades, es así como el confinamiento de animales y la falta de medidas de higiene permite la rápida diseminación del agente, generando ambientes altamente contaminados (Aiello y Mays, 2000). En este estudio la mayoría de los aislados caprinos obtenidos (60%) pertenecen al mismo predio lo que se podría relacionar con las condiciones de manejo, en que no se realizaba ninguna medida de control para esta enfermedad, donde es recomendable como norma básica de control el aislamiento de las cabras afectadas previniendo así la contaminación ambiental (Aiello y Mays, 2000).

El uso que se da a los equinos tanto para trabajo, como para recreación o deporte, se relaciona con un tipo de estabulación muy distinta a la de animales de abasto como lo son los caprinos, haciendo menos frecuente las condiciones de hacinamiento, lo que explica que la enfermedad en equinos haya sido menos diagnosticada, ya que pese a existir cepas patogénicas equinas de *C. pseudotuberculosis* en nuestro país se requiere la presencia de factores de riesgo como malas condiciones higiénicas para su diseminación (Baird y Fontaine, 2007).

1.2.-Cepas aisladas de *C. pseudotuberculosis*

Se obtuvieron un total de 20 cepas de *C. pseudotuberculosis*, 15 obtenidas desde caprinos y 5 desde equinos.

La mayoría de los abscesos desde los cuales se pudo aislar *C. pseudotuberculosis* en caprinos provenían de linfonodos superficiales de cuello y cabeza, sin embargo también se pudo aislar al agente desde leche con exudado en un caso de mastitis. Respecto al cuadro de mastitis por *C. pseudotuberculosis*, es de baja frecuencia de presentación, siendo los caprinos la especie en que se reporta más frecuentemente (Ruiz *et al.*, 2007). Existen antecedentes como el estudio de Pinheiro Junior *et al.* (2006) que realizaron el aislamiento de esta bacteria desde cabras en lactancia que presentaban mastitis clínica y

lesiones caseosas concomitantes en los linfonodos supramamarios. La mastitis clínica por *C. pseudotuberculosis* se presenta con signología de reducción en la producción láctea que puede volverse de una consistencia viscosa purulenta, siendo posible realizar el aislamiento de la bacteria desde muestras de leche (Pinheiro Junior *et al.*, 2006).

De todas las muestras desde las cuales se pudo aislar *C. pseudotuberculosis* en equinos, estas provenían de abscesos pectorales.

Respecto al desarrollo de colonias una vez sembradas las muestras, este fue similar a lo descrito por la literatura en lo que respecta al tiempo requerido para su crecimiento y las características físicas tanto macroscópicas como microscópicas (Dorella *et al.*, 2006a; Baird y Fontaine, 2007), sin embargo, se pudo observar diferencias en las características de las colonias entre los aislados caprinos y equinos, siendo las segundas generalmente de mayor tamaño y apariencia más rugosa, no existiendo reportes previos que describan estas diferencias. Esta observación apoyaría los resultados obtenidos en el presente trabajo que sugieren que los aislados caprinos y equinos poseen características fenotípicas distintas, por lo que se recomienda considerar estas observaciones en futuros estudios de caracterización.

2.- Determinación de características fenotípicas mediante pruebas bioquímicas.

En relación a la fermentación de azúcares, las cepas de ambas especies correspondían con lo descrito por Collins y Cummins (1986) en el Manual Bergey de Bacteriología sistemática. Algunas cepas (CT-1, CT-7, CT-15, CT-16, ET-17) mostraron fermentación de trealosa, lo que de acuerdo a los mismos autores se observa ocasionalmente, al contrario de lo establecido por Centinkaya *et al.* (2002) en que la repuesta negativa a la fermentación de trealosa fue utilizada como uno de los criterios para clasificar a un aislado como *C. pseudotuberculosis*. Además el tipo de fermentación en todas las muestras ocurrió sin producción de gas concordando con la revisión realizada por Dorella *et al.* (2006a).

La prueba de catalasa fue positiva en todas las cepas y la de hidrólisis de gelatina, negativa para todas ellas. Esto estaría de acuerdo con lo indicado por Dorella *et al.* (2006a), sin embargo en el Manual Bergey (Collins y Cummins, 1986) se indica que ocasionalmente habría cepas negativas la prueba de catalasa.

Todas las cepas estudiadas mostraron respuestas positivas para la pruebas de CAMP reversa (inhibición de la toxina estafilocócica β) y CAMP (hemólisis sinérgica con *R. equi*), lo que de acuerdo con Hirsh y Biberstein (2004) es diagnóstico confirmatorio para la identificación de el agente bacteriano en estudio. Esto puede ser cierto ante la sospecha clínica, junto con el aislamiento de colonias con características compatibles con *C. pseudotuberculosis*. Sin embargo debe considerarse lo que Barksdale *et al.* (1981) concluyen respecto a estas pruebas, que tanto *C. pseudotuberculosis* como *C. ulcerans* entregarían resultados positivos, pues estas pruebas evalúan la presencia de la exotoxina fosfolipasa D, y ambas especies son capaces de producirla.

Los resultados obtenidos en este trabajo en relación a la biotipificación de las cepas según su capacidad de reducción de nitratos (Baird y Fontaine, 2007), confirmaron que todas las cepas caprinas pertenecen al biovar *ovis* y todas las cepas equinas pertenecen al biovar *equi*. Sin embargo, existe evidencia de aislamiento de cepas nitrato negativas desde equinos y de bovinos (Connor *et al.*, 2000; Yeruham *et al.*, 2004), lo que sugiere que especificidad por hospedador de cepas pertenecientes a los distintos biovars es variable pudiendo incluso existir transmisión interespecie (Yeruham *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos apoyarían lo que algunos autores han sugerido respecto a que existen diferencias en los factores de virulencia entre las cepas específicas ovino/caprino y equino/bovino, donde el hecho de que la enfermedad en equinos se encuentra ausente en muchos lugares del mundo donde la infección en ovinos es endémica contribuye a este argumento. Sin embargo para poder esclarecer estas diferencias se requerirían infecciones experimentales con cepas equinas y ovinas en paralelo en ambas especies (Baird y Fontaine, 2007).

Varios autores describen como una de las dificultades para la identificación de este agente la gran variabilidad en la respuesta a las pruebas bioquímicas (Pacheco, *et al.*, 2006; Centinkaya, *et al.*, 2002). Sin embargo las cepas obtenidas en este estudio presentaron escasa variabilidad en sus características bioquímicas, creemos podría relacionarse con que todos los aislados pertenecen a un área geográfica limitada, incluso en el caso de los aislados caprinos el 60% fueron obtenidos en el mismo predio. Se debe considerar que las variaciones en la respuesta a las pruebas bioquímicas pueden ser atribuidas tanto al método utilizado para efectuarlas así como también a la variación individual entre cepas (Connor *et al.*, 2000).

En términos generales poder realizar un diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* mediante pruebas bioquímicas se debe considerar que un proceso largo y tedioso, que requiere un gran número de pruebas (Khamis *et al.*, 2004), además se deben identificar y estandarizar las diversas fuentes de variación para poder caracterizar las respuestas a las pruebas bioquímicas. En el caso contrario estas pruebas sólo son una aproximación al diagnóstico debiendo ser confirmado mediante otras pruebas más específicas.

3.-Descripción características genéticas

3.1-PCR simple desde muestras clínicas.

Se realizó en este trabajo un ensayo de PCR simple a partir de muestras clínicas, buscando obtener un protocolo de diagnóstico rápido y específico para *C. pseudotuberculosis*. Al comparar los resultados obtenidos acerca de la capacidad de detección y la concordancia entre el aislamiento bacteriológico y el PCR simple en muestras clínicas, no son concluyentes, por lo tanto no se puede afirmar que la utilización de esta técnica de PCR desde muestras clínicas ofrezca las ventajas de una mayor especificidad en el diagnóstico. A diferencia del estudio realizado por Pacheco *et al.* (2007) donde la técnica de PCR múltiple como diagnóstico rápido de *C. pseudotuberculosis* en aislados obtenidos directamente desde muestras de abscesos fue capaz de detectar eficientemente a la bacteria en un alto porcentaje (94,6%) de las muestras confirmadas

por aislamiento bacteriológico. Algunas de las razones que podrían explicar la diferencia en los resultados entre este estudio y el realizado por Pacheco *et al.* (2007) son:

- Protocolo de extracción de DNA: En el trabajo de Pacheco *et al.* (2007) se utilizó un procesamiento enzimático con Proteinasa K descrito para muestras clínicas de pacientes con tuberculosis (Honoré Bouaklkine *et al.*, 2003). Se debe tener en cuenta que algunas bacterias, particularmente del tipo gram positivas, *Rhodococcus* spp, *Mycobacterium* spp, *Corynebacterium* spp, etc, son extremadamente resistentes a la ruptura de su pared para la obtención de DNA (Moore *et al.*, 2004), por ello la importancia de un adecuado protocolo de extracción de DNA. Esto sería una razón por la cual la extracción por calor utilizada en el presente trabajo no habría sido adecuada, ya que este método que se describe posee baja eficiencia particularmente con organismos gram positivos, recomendándose su uso en suspensiones con números elevados de bacterias gram negativas (Besseti, 2007).
- Dilución del DNA templado: Pacheco *et al.* (2007) realizaron diluciones seriadas del DNA templado (1:2, 1:4 y 1:8), el efecto que tienen estas diferencias en el procesamiento de la muestra es disminuir la presencia de inhibidores en esta. Una de las grandes limitantes en las pruebas de diagnóstico por PCR es la inhibición de la DNA polimerasa (Besseti, 2007). Los inhibidores del PCR generalmente ejercen sus efectos a través de la interacción directa con los ácidos nucleicos o interfieren con las DNA polimerasas termoestables (Besseti, 2007), por lo que concluimos que la causa más probable de la escasa capacidad de detección del ensayo de PCR simple a partir de muestras clínicas implementado en este estudio fue la presencia de inhibidores en el material purulento. Se ha demostrado la existencia de inhibidores de la enzima *Taq* polimerasa en variadas muestras clínicas como sangre, mucus, orina, semen, humor vítreo y material fecal (Kim, 2001).

3.2-PCR múltiple desde cultivos puros.

Con el fin de realizar la amplificación de varias secuencias en una única reacción de PCR se requieren determinadas condiciones en el procesamiento de la muestra, como se menciono en el punto anterior.

El uso de cultivos puros y el protocolo de extracción de DNA de disrupción mecánica en equipo Bead Beater (Cole Palmer®) utilizado en este trabajo permitió obtener un producto más puro y con menor cantidad de inhibidores que aquel obtenido directamente de muestras clínicas y cuyo DNA se extrajo por calor. Las razones se detallan a continuación:

- Uso de cultivos bacterianos puros: Debido a la homogeneidad y riqueza del material las suspensiones bacterianas, son quizás las que ofrecen menos problemas de todas las muestras biológicas que podemos someter a un proceso de extracción de DNA (Moore *et al.*, 2004).
- Degradación celular por métodos físicos: El uso de partículas de cristal con el equipo Bead Beater es particularmente efectivo para disgregar a la mayoría de las bacterias y es el método de elección para la preparación de DNA bacteriano proveniente de matrices problemáticas que dificulten el acceso a las bacterias, como lo son los tejidos calcificados. La gran desventaja de este método es que puede fragmentar el DNA (Moore *et al.*, 2004). Se debe tener en cuenta que realizar pasos adicionales de limpieza del DNA aumenta los costos y el tiempo de trabajo por lo que se debe evaluar si realmente producen diferencias en los resultados obtenidos al ser comparados con otros protocolos.

Esto explicaría que todas (100%) las cepas identificadas como *C. pseudotuberculosis* por medio del aislamiento bacteriológico amplificaron las tres secuencias (*pld*, 16S rDNA y *rpoB*). Los 3 genes utilizados como blancos de amplificación

presentan el inconveniente de ser incapaces de discriminar entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, esta última bacteria se ha aislado en casos de mastitis en bovinos y en otros animales tanto domésticos como silvestres (De Zoysa *et al.*, 2005), aunque no se ha descrito la presencia de esta especie en pequeños rumiantes (Centinkaya *et al.*, 2002), por lo tanto en este caso no representaría un problema en el diagnóstico.

Centinkaya *et al.* (2002) reportaron una amplificación más débil del 16S rDNA en las cepas del biovar equi respecto al biovar ovis, sin embargo, Pacheco *et al.* (2007) proponen que este criterio no sería suficiente como para poder diferenciar ambos biovars. En el presente estudio no se observaron diferencias consistentes en el patrón de amplificación de ninguna de las secuencias para los biovars *equi* y *ovis*. Estas diferencias con el trabajo de Centinkaya *et al.* (2002) se explicarían a través de los parámetros de amplificación utilizados en el programa del termociclador, los cuales durante el desarrollo de este trabajo debieron ser optimizados con el fin de obtener la amplificación de las tres bandas de todas las cepas de *C. pseudotuberculosis*. Los parámetros ajustados fueron los siguientes (Anexo 3):

- Aumento de la temperatura en la fase de "annealing": la temperatura de "annealing" es crítica en el éxito de la reacción de PCR, la cual se ajusta dependiendo de los partidores utilizados. Una temperatura menor a la óptima puede generar que los partidores no se unan al DNA templado o se unan de forma aleatoria generando una respuesta pobre o productos inespecíficos (Pestana *et al.*, 2010). Como se observa en el Anexo 3 al ir aumentando la temperatura de "annealing" se observa de mejor manera los perfiles de amplificación del DNA.
- Aumento de la temperatura en la fase de extensión: Durante la fase de extensión la tasa de síntesis de DNA por la *Taq* DNA polimerasa es máxima a 72°C (Pestana *et al.*, 2010). Esta es la razón por la cual se modificó la temperatura hasta llegar a los 72°C (Anexo 3).
- Aumento del número de ciclos: Teóricamente la cantidad de producto del PCR aumenta al doble en cada ciclo de la reacción, pero en realidad luego de cierto

número de ciclos la eficiencia de la amplificación disminuye (efecto "plateau"). El número de ciclos necesario para obtener la cantidad suficiente de producto del PCR depende en un porcentaje importante de la concentración de DNA templado, muy pocos ciclos producirán un escaso producto de PCR, en cambio un exceso de ciclos aumentan las uniones inespecíficas (Pestana *et al.*, 2010). Al aumentar en 3 ciclos el protocolo de este estudio la cantidad de producto obtenido debió haberse incrementado ocho veces, lo que también explicaría la visualización de las 3 bandas en todas las cepas y que aun no se habría producido un efecto "plateau" (Anexo 3).

Al ser modificados los parámetros recién mencionados al mismo tiempo en cada nuevo protocolo, no se puede decir cuál de ellos tuvo un efecto más importante en los resultados obtenidos, por lo que se requeriría nuevos estudios que modificaran cada parámetro por separado para evaluar la importancia de estos efectos, ya que esto escapa a los objetivos del presente trabajo.

3.3.-Amplificación y secuenciación del gen *rpoB*

La información genotípica más precisa se determina mediante la secuenciación de bases nucleotídicas de los segmentos amplificados (Dorella *et al.*, 2006b). El gen 16S rDNA, es el gen de elección en la mayoría de los estudios taxonómicos bacterianos y ha sido utilizado para la identificación de especies pertenecientes al género *Corynebacterium* (Centinkaya *et al.* 2002; Khamis *et al.*, 2005), ya que es altamente conservado. Sin embargo, su bajo polimorfismo no permite realizar estudios filogenéticos confiables de diferenciación entre especies y de cepas dentro de una misma especie (Khamis *et al.*, 2004). En contraste, el gen *rpoB* al ser significativamente más polimórfico es de utilidad en esta clase de estudios taxonómicos. Las diferencias observadas en el alineamiento de secuencias del gen *rpoB* realizado en este estudio permiten afirmar que existen diferencias genéticas entre cepas equinas y caprinas en los aislados nacionales. La secuencia estudiada del gen *rpoB* mostro diferencias de 0,7% entre las cepas equinas y caprinas obtenidas en este estudio. El fragmento amplificado del gen *rpoB* (446 pares de bases)

corresponde a un área de alto grado de polimorfismo en cuyos extremos se encuentran regiones conservadas y fue identificado por Khamis *et al.* (2004) como una secuencia que permite una adecuada identificación de especies del género *Corynebacterium*.

Khamis *et al.* (2004) describen que el grado de similitud más alto de esta secuencia parcial del gen *rpoB* entre dos especies del género *Corynebacterium* fue 95,9%; Basándose en esta información los aislados caprinos y equinos de nuestro estudio presentan un porcentaje de similitud de 99,3%, por lo tanto pertenecerían a la misma especie, sin embargo no podemos concluir si corresponden a subespecies, como sugiere Dorella *et al.* (2006a), ya que se requiere evaluar la similitud de un mayor número de cepas de para validar los porcentajes de corte que definen a las subespecies.

CONCLUSIONES

- i. Los resultados obtenidos en este estudio confirman que existen diferencias fenotípicas y genotípicas entre los aislados caprinos y equinos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por lo tanto se acepta la hipótesis de trabajo.
- ii. En lo que respecta a la identificación de cepas de *C. pseudotuberculosis* a partir de muestras clínicas (lesiones abscedativas), el diagnóstico bacteriológico posee una mayor capacidad de detección que el PCR simple, ya que solo el 15% de los aislados fue positivo al PCR simple.
- iii. Existen diferencias fenotípicas entre aislados caprinos y equinos, tanto en el mayor tamaño de las colonias equinas, así como la respuesta negativa de los aislados caprinos y la respuesta positiva de los aislados equinos en la prueba de reducción de nitratos, esto último permite la clasificación de los mismos en biovares *ovis* y *equi* respectivamente.
- iv. Las secuencias de los genes *pld*, 16S rDNA y *rpoB*, identificadas por PCR múltiple, se encontraron presentes en todos los aislados obtenidos en este estudio, demostrando la utilidad de la técnica de PCR múltiple desde cultivos puros para el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis*.
- v. Existen diferencias genotípicas entre los aislados caprinos y equinos de *C. pseudotuberculosis*, lo que queda demostrado mediante la comparación de las secuencias obtenidas del gen *rpoB*.

PROYECCIONES

Los que consideramos son los aportes más relevantes del presente estudio:

- i. Haber aportado antecedentes acerca de las características que presentan los aislados nacionales de *C. pseudotuberculosis* en nuestro país. Consideramos que se deben seguir realizando estudios abarcando un mayor número de aislados pertenecientes a distintas regiones.
- ii. Haber desarrollado un eficiente protocolo de trabajo para el diagnóstico de la infección por PCR múltiple a partir de cultivos puros, que no se había descrito previamente en Chile. Este se presenta como una buena alternativa al diagnóstico microbiológico, ya que permite obtener resultados en al menos 60 horas desde el cultivo de la muestra sospechosa, mientras que la identificación por pruebas bioquímicas se requieren un mínimo de 96 horas para realizar la lectura de estas (Figura 3). Es altamente recomendable la implementación de esta prueba como diagnóstico de rutina ante la presencia de abscesos crónicos en pequeños rumiantes y equinos.

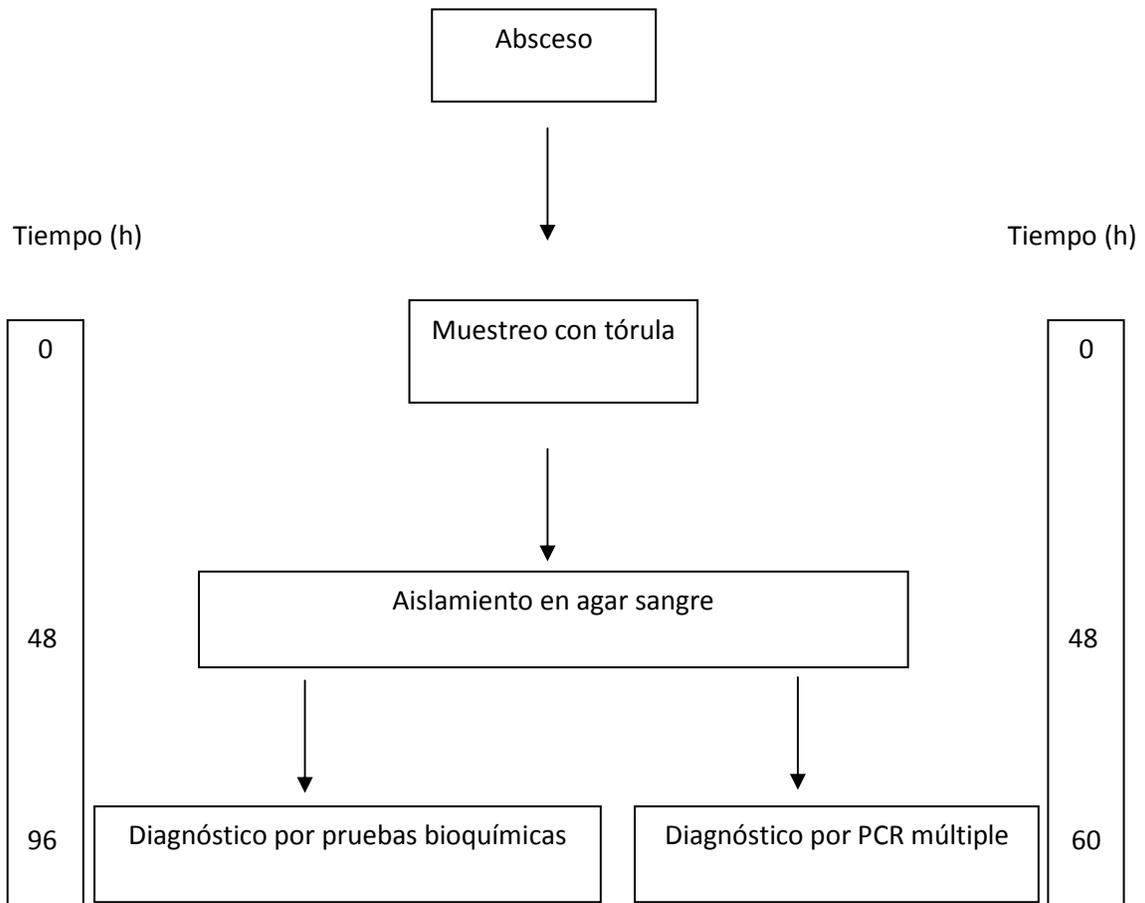


Figura 3. Etapas para el diagnóstico confirmatorio de *C. pseudotuberculosis* y sus respectivos tiempos de desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Por su contribución al desarrollo del presente trabajo quisiera agradecer a :

Drs. Patricio Retamal y Pedro Ábalos, por haberme hecho participe del desarrollo de este proyecto, por la toda confianza depositada, por haber estado siempre presentes dispuestos a trabajar junto a nosotros.

Dr. Richard Arancibia, Dr. Juan Lazo, Dr. Sergio Carvajal y Dr. Enrique Pinto por su colaboración en la recolección y envío de las lesiones sospechosas en caprinos y equinos.

Dra. Consuelo Borie, Dr Sergio Pizarro y Leonardo Saéñz por su buena disposición a facilitar equipo e instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

Sr. Carlos Campos, Sr Humberto Antilef, Sr. Patricio Toledo y Sra. Patricia Nuñez, funcionarios del Departamento de Medicina Preventiva.

Sr. Felipe Cheuquepán, por haber sido un gran compañero de memoria de título, sin duda constituimos un verdadero equipo de trabajo.

Srta. Catherine Dougnac, por su apoyo invaluable y por creer mí.

BIBLIOGRAFÍA

AIELLO, S.E.; MAYS, A. 2000. El Manual Merck de Veterinaria. Editorial Océano. 5ta Ed. en Español. España. pp.179-210.

ACEITUNO, P. Boletín climático 1998; 2008-2009; 2009-2010 [en línea]. Dpto. de Geofísica, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas Universidad de Chile. <<http://met.dgf.uchile.cl/clima/index.html>> [consulta: 7 julio 2010]

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M.C. 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. J. Comp. Path., 137: 179-200.

BARKSDALE, L.; LINDER, R.; SULEA, I. T.; 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

BELCHIOR, S. E.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; JODOR, N.; JENSEN, O.G. 2006. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Rev. Vet. Argent., 23: 258-278.

BELCHIOR, S. E.; GALLARDO, A.; ABALOS, M. A.; ALVAREZ, L. A.; NUÑEZ, N. C.; GUEVARA, D. ; JENSEN, O. 2009. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revisión de casos. REDVET, 10 (10). [disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009>].

BESSETTI, J. 2007. PCR inhibition. An introduction to PCR inhibitors. Prof. DNA, 10 (2):9-10.

CARNE, H.R. 1940. The toxin of *Corynebacterium ovis*. J. Pathol. Bacteriol., 51:199-212.

CETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VANECHOUTTE, M. 2002. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheeps and goats by PCR. *Vet. Microbiol.*, 88: 75-83.

COLLINS, M. D.; CUMMINS, C. S. Genus *Corynebacterium*. En: Lehmann and Neumann. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Editorial Williams & Wilkins. En ingles. Baltimore. USA. pp. 1266–1276.

CONNOR, K. M.; QUIRIE, M. M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. 2000. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulse-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (7): 2633-2637.

D´AFONSECA, V.; MORAES, P. M.; DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. 2008. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genet. Mol. Res.*, 7:252-260.

DESSAU, R.B. ; BRANDT- CHRISTENSEN, M.; JENSEN, O.J.; TØNNESEN, P. 1995. Pulmonary nodules due to *Corynebacterium ulcerans*. *Eur Respir J.*, 8: 651–653.

DE ZOYSA, A.; HAWKEY, P. M.; ENGLER, K.; GEORGE, R.; MANN, G.; REILLY, W.; TAYLOR, D.; EFSTRATIOU, A. 2005. Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 4377-4381.

DOHERR, M. G.; CARPENTER, T. E.; HANSON, K. W.; WILSON, W. D.; GARDNER, I. A. 1998. Risk factors associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in California horses. *Prev. Vet. Med.*, 35: 229-239.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. 2006a. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.*, 37:201-218.

DORELLA, F. A.; FACHIN, M. S.; BILLAUT, A.; DIAS, N. E.; SORAVITO, C.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. 2006b. Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* artificial chromosome library through genomic survey sequencing. Genet. Mol. Res., 5:653-663.

FOLEY, J. E.; SPIER, S. J.; MIHALYI, J.; DRAZENOVICH, N.; LEUTENEGGER, C. M. 2004. Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. Am. J. Vet. Res., 65 (2):1734–1737.

GÄDICKE, P.; AZÓCAR, G.; OCAÑA, M. 2008. Descripción de casos de absceso pectoral crónico y análisis de algunas variables asociadas a su presentación en equinos de la Provincia de Ñuble, Chile. Arch. Med. Vet., 40: 39-44.

GALLEGUILLOS, H.; RIVERA, A.; HERRERA, A.; ESPEJO, L.; MÉNDEZ, P. 2005. La atención de denuncias de enfermedades animales durante el período 1999-2004. Boletín Veterinario Oficial. Servicio Agrícola y Ganadero, División de Protección Pecuaria, 3:1-27.

HIRSH, D. C; BIBERSTEIN, E. L. 2004. *Corynebacterium*. En: Hirsh, D. C.; Maclachlan N. J.; Walker R. L. Veterinary microbiology. 2º ed. Iowa, USA. Blackwell Publishing. pp 175-180.

HODGSON, A. L.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; ROTHEL, J. S.; RADFORD, J. S. 1992. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. Infect. Immun., 60(7): 2900-2905.

HONORÉ-BOUAKLINE, S.; VINCENSINI, J.; GIACUZZO, V.; LAGRANGE, P. H.; HEREMAN, J.L. 2003. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. J. Clin. Microbiol., 41: 2323-2329.

KESLIN, M. H.; MCCOY, E. L.; MCCUSKER, J. J.; LUTCH, J. S. 1979. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A new cause of infectious and eosinophilic pneumonia. Am. J. Med., 67:228-231.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. 2004. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. J. Clin. Microbiol., 42: 3925-31.

KIM, C.H. 2001. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. J. Dairy Sci. 84, 74–83.

KURIA, J. K. N.; MBUTHIA, P. G.; KANG´ETHE, E. K.; WAHOME, R. G. 2001. Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. Vet. Res. Commun., 25(2): 89-97.

LANDIS, J; KOCH, G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, 33:159-74.

LIU, D. T. L.; CHAN, W. M.; FAN, D. S. P.; LAM, D. S. C. 2005. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. British J Ophthalmol., 89:245-246.

MOORE, E.; ARNSCHEIDT, A.; KRÜGER, A.; STRÖMPL, C.; MAU, M. 2004. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. Mol. Microbiol. Ecol. M., 101 (2):3-18.

OWENS, W.E.; OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.E.; RAY, C.H.; NICKERSON, S.C. 1998. Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. Am. J. Vet. Res., 59(9):1122-1124.

PACHECO, L. G.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L.; DORELLA, F. A.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; FROTA, N. M. OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; ALVES, F. S.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. 2007. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. J. Clin. Microbiol., 56: 480-6.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M.; KERR, T. G. 1997 Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. Clin. Infect. Dis., 24:185-191.

PESTANA, E. A.; BELAK, S.; DIALLO, A.; CROWTHER, J. R.; VILJOEN, G. J. 2010. Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics- Real Time PCR Applications. Editorial Springer. en Inglés. Dordrecht, Holanda. pp. 9-22

PINOCHET, L. 1992. Linfadenitis caseosa. Un problema aun sin solución. Mon. Med. Vet., 14: 21-27.

PINHEIRO JUNIOR, J. W.; OLIVEIRA, A. A. F.; ALVES, F. S. F.; SILVA, L. B. G.; RABELO, S. S. A.; MOTA, R. A. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis* experimental infection of goats mamary gland. Arq. Inst. Biol., 73 (4): 395-400.

RUIZ, J. R.; BARRERA, M.; FRIAS, M. T. 2007. Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. RECVET., 2 (8). [disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n080807/080707.pdf>].

SELLON, D.E.; LONG, T.A. 2007. Equine Infectious diseases. Ed. Saunders. St. Louis. Missouri. USA. pp. 263-277.

TADICH, N.; ÁLVAREZ, C.; CHACÓN, T.; GODOY, H. 2005. Linfadenitis caseosa (LAC) en ovinos en la XI región, Chile. Arch. Med. Vet., 37: 161-167.

THRUSFIELD, M. 1990., Epidemiología Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 14:196-197.

WILLIAMSON, L. H. 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 17 (2): 359-37.

YERUHAM, I.; FRIEDMAN, S.; PERL, S.; ELAD, D.; BERKOVICH, Y.; KALGARD, Y. 2004. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. Vet. Dermatol., 15:315-320.

ANEXOS

Anexo 1.- Fórmula de muestreo para detección de presencia de una enfermedad en la población (Thursfield, 1990).

$$n = (1 - (1 - P)^{1/d}) \times (N - ((d-1)/2))$$

Donde:

n (tamaño de muestra).

P (nivel de confianza)= 0,95

d (número de casos detectables en la población)⁶= 500.

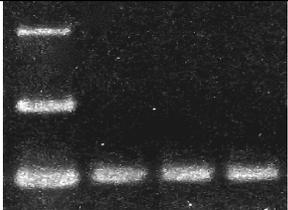
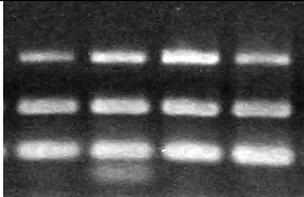
N (tamaño de la población de abscesos)= 1000.

⁶ Para el valor **d** se considero el peor escenario, es decir, un 50% de incidencia en lesiones sospechosas.

Anexo 2.-Partidores a utilizar para PCR simple y múltiple de *C. pseudotuberculosis*.

Nombre	Blanco de Amplificación	Secuencia (5'→3')	Tamaño producto (pb)
PLD-F PLD-R3	<i>pld</i>	ataagcgtaagcaggagca tcagcgggtgattgtctcca	202
16S-F 16S-R	16S ADNr	accgcacttagtggtgtg tctctacgccgatcttgat	816
C2700F C3130R	<i>rpoB</i>	cgtatgaacatcggccaggt tccatttcgccgaagcgctg	446

Anexo 3.- Desarrollo de un protocolo óptimo para el ensayo de PCR múltiple.

Fases	Protocolo 1			Protocolo 2			Protocolo final		
	T°C	Tpo	Rep	T°C	Tpo	Rep	T°C	Tpo	Rep
Denaturación inicial	94°C	5'	1	94°C	5'	1	94°C	5'	1
Denaturación	94°C	40"	30	94°C	40"	33	94°C	40"	33
Annealing	55°C	40"	30	58°C	40"	33	60°C	40"	33
Extensión	68°C	1'	30	70°C	1'	33	72°C	1'	33
Extensión final	68°C	10'	1	70°C	10'	1	72°C	10'	1
Imagen de amplificados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.									
	Observación: Se amplifican las tres bandas en unas pocas cepas			Observación: Se amplifican las tres bandas con la mayoría de las cepas			Observación: Se amplifican las tres bandas con todas las cepas		