

Artículos Generales

Corynebacterium pseudotuberculosis: Una breve actualización

FELIPE CHEUQUEPÁN V.^{1,2}, MARCO RÍOS C.^{1,2}, PEDRO ABALOS P.¹, M.V., M.Sc. y
PATRICIO RETAMAL M.¹, M.V., MSC., PhD.

¹ Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

² Alumno tesista.

ABSTRACT

***CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*: A BRIEF UPDATE**

Corynebacterium pseudotuberculosis is the causal agent of caseous lymphadenitis of sheep and goats (LAC), generating further cutaneous abscesses and granulomas in horses and cattle. LAC is a chronic, insidious and cosmopolitan disease. The infection has an endemic level in Chile, increasing its incidence during the dry season. However, the diagnosis is generally made by clinical signs usually being presumptive in nature. The aim of this paper is to present a brief review about the current state of infection, describing characteristics of the agent, the epidemiology and the alternatives for disease diagnosis.

Key words: *Corynebacterium, pseudotuberculosis*, review, caseous lymphadenitis.

RESUMEN

Corynebacterium pseudotuberculosis es el agente casual de la linfadenitis caseosa del ovino y caprino (LAC), generando además abscesos y granulomas cutáneos en equinos y bovinos. LAC es una enfermedad crónica, insidiosa y cosmopolita. La infección se encuentra a nivel endémico en nuestro país y es capaz de generar enfermedad y pérdidas económicas significativas principalmente en las épocas estivales, cuando es de mayor incidencia. Sin embargo, el diagnóstico se realiza generalmente por signos clínicos siendo generalmente de carácter presuntivo. El objetivo de este trabajo presentar una breve revisión del estado actual de la infección, considerando aspectos del agente, de la epidemiología y del diagnóstico de la enfermedad.

Palabras clave: *Corynebacterium, pseudotuberculosis*, revisión, linfadenitis caseosa.

Financiamiento: Proyecto FIV 121.014.019.102.003
E-mail: pretamal@uchile.cl

El agente

Corynebacterium pseudotuberculosis es el agente causal de la linfadenitis caseosa del ovino (LAC), enfermedad crónica insidiosa, cosmopolita, que causa pérdidas productivas cuantiosas. La enfermedad afecta también al caprino con características epidemiológicas y patogénicas semejantes. La bacteria produce abscesos pectorales en equinos y granulomas cutáneos ulcerativos en bovinos. Las cepas que infectan a equinos tienen características fenotípicas diferentes a las que afectan a los pequeños rumiantes (Dorella y col 2006b, Baird y Fontaine 2007).

Por la constitución de su pared celular (polímero de peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos) y de su ácidos nucleicos (alto contenido de G+C), *C. pseudotuberculosis* está integrado en el grupo denominado CMN, junto a micobacterias, rhodococcus y nocardias. En las extensiones para análisis microscópico tiene una disposición clásica de “letras chinas”, siendo Gram +, de crecimiento anaerobio facultativo rápido en medios adicionados con suero, cuyas colonias son de color pálido, secas, opacas y friables. En placas de agar-sangre las colonias presentan una delgada banda de beta-hemólisis a las 24 a 48 h de incubación, producida por la fosfolipasa D. En medios líquidos se desarrollan formando grumos, como consecuencia de sus ácidos micólicos. Las propiedades bioquímicas entre cepas son variables, especialmente ante la fermentación de fuentes de carbono, aunque todas las cepas que acidifican los medios no producen gas. La mayor diferencia entre cepas de pequeños rumiantes y las aisladas desde equinos, es que las primeras no reducen nitratos a nitritos. Los bovinos pueden infectarse con ambos tipos de cepas (Dorella y col 2006b, Baird y Fontaine 2007).

Los determinantes genéticos de virulencia de *C. pseudotuberculosis* no han sido muy estudiados, a pesar del impacto económico que genera esta infección en los planteles (Dorella y col 2006b). La mayoría de esos factores codifican o modifican la expresión de genes relacionados a virulencia, por lo que pueden ser utilizados como blancos potenciales para el desarrollo de vacunas, de fármacos quimioterapéuticos o en ensayos de diagnóstico del agente infeccioso. Entre estos factores se pueden mencionar:

- Fosfolipasa D. Corresponde a una exotoxina

que altera la permeabilidad vascular y afecta la función de los neutrófilos en la respuesta inflamatoria (D'Afonseca y col 2008). Debido a su inmunogenicidad se ha estudiado como potencial antígeno en vacunas. Además, se ha utilizado como blanco de amplificación en ensayos de PCR múltiple para discriminar entre aislados de *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, una especie genotípicamente muy relacionada (Pacheco y col 2007). El análisis bioinformático de las secuencias *pld* indica la existencia de un 68% de identidad nucleotídica entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*.

- RecA. Es una proteína altamente conservada entre distintos géneros bacterianos, ya que participa en funciones básicas como recombinación homóloga, reparación del DNA y respuesta SOS (D'Afonseca y col 2008). Mutantes *C. pseudotuberculosis recA* han demostrado ser atenuadas e inmunógenas al ser incorporadas en vacunas (Pogson y col 1996).
- 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 y col 2006b, D'Afonseca y col 2008). A través de su secuencia también se han identificado especies de *Corynebacterium* (Khamis y col 2004, 2005).
- 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 y col 2005). Con estudios realizados sobre la secuencia nucleotídica de este gen y de *rpoB* se ha determinado que *C. pseudotuberculosis* tiene una cercana relación filogenética con *C. ulcerans* (Khamis y col 2005, Dorella y col 2006b).

Patogenia

C. pseudotuberculosis produce en pequeños rumiantes la formación de piogranulomas en los nódulos linfáticos. La infección se inicia con el ingreso de la bacteria a través de lesiones generadas en el manejo de los ovinos, como la esquila y en menor medida los cortes de cola, marcaje y castraciones. Los baños sanitarios también contribuyen a la infección de pequeñas escoriaciones

de la piel cuando se han contaminado por abscesos abiertos. En caprinos, el consumo de forraje espinoso que lesiona la mucosa oral también es fuente de infección.

Cuando la bacteria esta dentro de la célula, la exotoxina fosfolipasa D produce la degeneración y destrucción de esta. Al mismo tiempo la bacteria invade otras células, principalmente macrófagos, que es el medio por el cual se disemina en el organismo. Sus lípidos de pared celular le confieren resistencia a las enzimas hidrolíticas de las células fagocíticas, permitiendo su supervivencia y proliferación en el ambiente intracelular (Dorella y col 2006b).

Esto genera la forma más corriente de presentación de la enfermedad correspondiente a la abscedación de nódulos linfáticos superficiales, debido al traslado del agente vía linfática hasta el linfonódulo regional. La otra forma de la enfermedad afecta nódulos linfáticos internos, especialmente del pulmón e hígado, como consecuencia de diseminación hematogena desde el conducto eferente de los nódulos linfáticos abscedados. Las lesiones de equinos y bovinos se producen por infección de heridas superficiales y también por la intervención de insectos hematófagos (Pinochet 1992, Yeruham y col 2004, Gädicke y col 2008).

En equinos los cuadros en que se reconoce a *C. pseudotuberculosis* como agente causal son: abscesos subcutáneos profundos a nivel pectoral y abdominal ventral siendo la presentación más frecuente, linfangitis ulcerativa, foliculitis y furunculosis (Baird y Fontaine 2007, Gädicke y col 2008).

En bovinos se describe la presentación de abscesos subcutáneos profundos, cuadros de mastitis e incluso casos de dermatitis necrótica del talón (Baird y Fontaine 2007).

Epidemiología

Los productores ovinos acostumbran a convivir con LAC. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la incidencia en países con endemia y aparecido en otros donde era considerada exótica, como en el Reino Unido. Su presentación se asocia a manejos específicos o bien al consumo de forraje seco, por lo que las temporadas estivales tienden a ser de mayor riesgo para la presentación de la enfermedad. Las pérdidas económicas se deben a la disminución en la condición corporal de los animales enfermos,

al pobre desarrollo del vellón, a la disminución en la producción de leche, desórdenes reproductivos, eliminación de animales infectados prematuramente y principalmente por la reducción en la producción de lana, aumento de los costos de inspección y decomisos de canales en matadero (Paton y col 1994, Cetinkaya y col 2002). En lesiones características de LAC de pequeños rumiantes, *C. pseudotuberculosis* puede recuperarse con una frecuencia de un 70 a 80%. Este porcentaje es aun mayor para equinos y bovinos, considerando abscesos pectorales y granulomas subcutáneos abscedativos, respectivamente (Yeruham y col 2004, Tadich y col 2005, Baird y Fontaine 2007). *C. pseudotuberculosis* también causa linfadenopatías purulentas en camélidos sudamericanos domésticos, lo que incidiría en la calidad y valor del pelo de estas especies (Braga 2007).

En el ser humano la infección es esporádica, especialmente como riesgo ocupacional en esquiladores, trabajadores de mataderos, carniceros, etc. Es de buen pronóstico, cediendo a los tratamientos con antibacterianos (Baird y Fontaine 2007).

Diagnóstico

Se han descrito diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de LAC, pero estas tienen el inconveniente de una baja eficiencia diagnóstica y de ser incapaces de discriminar entre animales previamente expuestos de aquellos que mantienen el estado de portador (Pacheco y col 2007).

El diagnóstico de la infección se realiza principalmente con un examen clínico de las lesiones y la identificación de *C. pseudotuberculosis* mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas (Cetinkaya y col 2002, Dorella y col 2006a, Dorella y col 2006b, D'Afonseca y col 2008).

La identificación por pruebas bioquímicas es a menudo problemático debido a la gran variabilidad en las características bioquímicas del patógeno. Además, este método no siempre es ventajoso o posible de realizar, ya que la punción de un linfonodo abscedado para obtener material purulento como muestra para el cultivo y aislamiento, puede convertirse en una potencial fuente de infección para otros animales debido a la descarga de contenido desde el absceso. Por otra parte las lesiones externas crónicas fibrosadas contienen escaso pus y pocos organismos viables (Cetinkaya y col 2002, Dorella y col 2006b,

D'Afonseca y col 2008).

Debido a la variabilidad fenotípica que tienen algunas cepas de *C. pseudotuberculosis* se ha sugerido que el PCR simplificaría la identificación de los cultivos de esta especie bacteriana (Cetinkaya y col 2002).

Al respecto, existen estudios previos que han reportado la utilidad del PCR para el diagnóstico rápido de *C. pseudotuberculosis* en aislados obtenidos directamente desde muestras de abscesos. Entre las secuencias utilizadas se encuentra la subunidad 16S del RNA ribosomal para el diagnóstico de la bacteria en caprinos y ovinos (Cetinkaya y col 2002), pero tiene el inconveniente de ser incapaz de discriminar entre *C. pseudotuberculosis* y *C. ulcerans*, ya que el 16S rDNA es un gen altamente conservado entre especies de un género (Khamis y col 2005). Para superar esta limitante, Pacheco y col (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 incluyeron las secuencias 16S rDNA, *pld* y *rpoB*, obteniendo un método de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficacia en el diagnóstico de la bacteria.

Situación Nacional

En Chile hay antecedentes de ocurrencia de LAC en ovinos desde los años 30 y se han realizado investigaciones en diagnóstico y vacunación, con resultados limitados tanto en sensibilidad y especificidad de las pruebas, como en protección de las vacunas, respectivamente (Pinochet 1992). En los últimos años se ha reconfirmado la enfermedad en ovinos con prevalencias altas en la Región de Aysén (Tadich y col 2005) y en nuestro laboratorio hemos venido aislando con mayor frecuencia el agente causal en abscesos pectorales de equinos. Además, por primera vez en nuestro país hemos logrado identificar la bacteria en abscesos subcutáneos de bovinos (datos no publicados).

Por otra parte, el díptero *Haematobia irritans* o comúnmente denominado "mosca de los cuernos", es un factor de riesgo epidemiológico que en los últimos años ha incidido en la transmisión de *C. pseudotuberculosis* entre animales durante los periodos estivales (Gädicke y col 2008). Las lesiones de LAC son corrientes de encontrar en ovinos y caprinos, ya sea en forma clínica o en mataderos de todo el país. En Chile, no existen

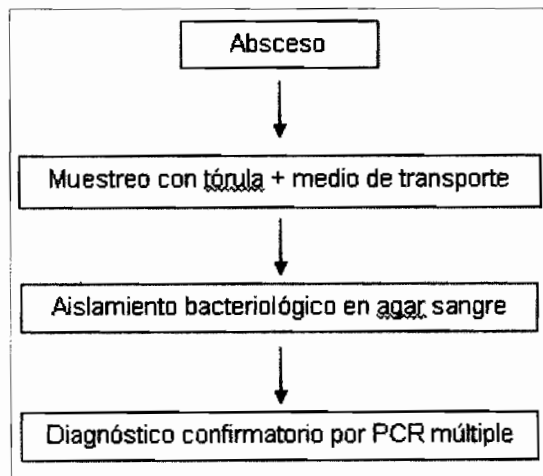


Figura 1. Etapas para el diagnóstico confirmatorio de *C. pseudotuberculosis*.

estudios sobre las características fenotípicas, genotípicas ni sobre los factores de patogenicidad de las cepas que afectan a las especies domésticas y el diagnóstico se realiza generalmente por los signos clínicos. Por este motivo, en nuestro laboratorio estamos realizando investigaciones que permitan generar mayor conocimiento de la enfermedad, especialmente en el ámbito epidemiológico y en el diagnóstico molecular de la infección. Como resultado de este trabajo sugerimos un procedimiento eficiente para la identificación directa del agente (Figura 1), implementado actualmente en nuestro laboratorio.

Finalmente, recomendamos a los veterinarios desarrollar un diagnóstico etiológico de los abscesos en sus animales, para facilitar sus procedimientos de control y mejorar el conocimiento epidemiológico que existe de *C. pseudotuberculosis* en nuestro país.

Agradecimientos: A los investigadores Consuelo Borie y José Pizarro, en cuyos laboratorios se han realizado algunos procedimientos experimentales. A los veterinarios Juan Lazo, Richard Arancibia, Enrique Pinto, Rigofredo Veneros y Marcela Gómez, que han participado en los muestreos de terreno.

REFERENCIAS

- 1.- BAIRD GJ, FONTAINE MC. 2007. *Corynebacterium*

- pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J Comp Pathol* 137: 179-210.
- 2.- BRAGA WU. 2007. Protection in alpacas against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using different bacterial components. *Vet Microbiol* 119: 297-303.
 - 3.- CETINKAYA B, KARAHAN M, ATIL E, KALIN R, T DE BAERE, VANECHOUTTE M. 2002. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol* 88: 75-83.
 - 4.- D'AFONSECA V, MORAES PM, DORELLA FA, PACHECO LG, MEYER R, PORTELA RW, MIYOSHI A, AZEVEDO V. 2008. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genet Mol Res* 7: 252-60.
 - 5.- DORELLA FA, FACHIN MS, BILLAULT A, DIAS NETO E, SORAVITO C, OLIVEIRA SC, MEYER R, MIYOSHI A, AZEVEDO V. 2006a. Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. *Genet Mol Res* 5: 653-63.
 - 6.- DORELLA FA, PACHECO LG, OLIVEIRA SC, MIYOSHI A, AZEVEDO V. 2006b. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 37: 201-18.
 - 7.- 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.
 - 8.- KHAMIS A, RAOULT D, LA SCOLA B. 2004. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 42: 3925-31.
 - 9.- KHAMIS A, RAOULT D, LA SCOLA B. 2005. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol* 43: 1934-6.
 - 10.- PACHECO LG, PENA RR, CASTRO TL, DORELLA FA, BAHIA RC, CARMINATI R, FROTA NM, OLIVEIRA CS, MEYER R, ALVES FS, 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 Med Microbiol* 56: 480-6.
 - 11.- PATON MW, ROSE IR, HART RA, SUTHERLAND SS, MERCY AR, ELLIS TM, DHALIWAL JA. 1994. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust Vet J* 71: 47-9.
 - 12.- PINOCHET L. 1992. Linfadenitis caseosa: un problema aún sin solución. *Monografías de Medicina Veterinaria* 14.
 - 13.- POGSON CA, SIMMONS CP, STRUGNELL RA, HODGSON AL. 1996. Cloning and manipulation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* recA gene for live vaccine vector development. *FEMS Microbiol Lett* 142: 139-45.
 - 14.- TADICH N, ÁLVAREZ C, CHACON T, GODOY H. 2005. Linfadenitis Caseosa (LAC) enovinos en la XI Región, Chile. *Arch Med Vet* 37: 161-167.
 - 15.- 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: 315-20.