



INFORME BREVE

Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis: evaluación de la sensibilidad antibiótica *in vitro*



Adriana A. Gallardo^a, Rocío A. Toledo^a, Ramón A. González Pasayo^b,
Vasco Azevedo^c, Carlos Robles^d, Fernando A. Paolicchi^b y Silvia G. Estevao Belchior^{a,*}

^a Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico-Tecnológico (CRIDECIT), Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina

^b Laboratorio de Bacteriología, Unidad Integrada Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina

^c Departamento de Biología General, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais ICB/UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^d Grupo de Salud Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Bariloche, Río Negro, Argentina

Recibido el 15 de marzo de 2018; aceptado el 4 de diciembre de 2018

Disponible en Internet el 20 de febrero de 2019

PALABRAS CLAVE

Linfoadenitis caseosa;
Antibióticos;
Método de difusión
y dilución;
Integrones;
Pequeños rumiantes

Resumen Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la sensibilidad antibiótica de aislamientos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* procedentes de pequeños rumiantes e investigar la presencia de integrones que contienen genes de resistencia. Se estudiaron 15 aislamientos de diferentes fuentes por los métodos de difusión y dilución. Por el método de difusión, amoxicilina-clavulánico, ampicilina, cefotaxima, ceftioxitina, ciprofloxacina, clo-ranfenicol, eritromicina, estreptomina, gentamicina, imipenem, kanamicina, norfloxacina, penicilina, rifampicina, tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol y vancomicina fueron activos frente al 100% de los aislamientos, mientras que amicacina presentó resultados variables. En los aislamientos que desarrollaron frente a amicacina se investigó la presencia de integrones de clase 1. El resultado fue negativo, sugiriendo la ausencia del integrón. Utilizando el método de dilución, los antibióticos más activos correspondieron a los grupos de cefalosporinas, gluco-péptidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas. Se demostró menor actividad de β -lactámicos y aminoglucósidos. No se registró variabilidad en los perfiles antibióticos en los aislamientos procedentes de diferentes fuentes.

© 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sbelchior@unpata.edu.ar (S.G. Estevao Belchior).

KEYWORDS

Lymphadenitis caseosa;
Antibiotics;
Diffusion and dilution method;
Integrans;
Small ruminant

Corynebacterium pseudotuberculosis biovar ovis: Evaluation of antibiotics susceptibility *in vitro*

Abstract The aims of this work were to study the antibiotic susceptibility in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from small ruminants and to determine the presence of integrons that contain resistance genes. Fifteen isolates of different sources were analysed using the diffusion and the dilution methods. When the diffusion method was performed, amoxicillin-clavulanic, ampicillin, cefotaxime, ceftiofur, ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, gentamicin, imipenem, kanamycin, norfloxacin, penicillin, rifampicin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and vancomycin were effective against the 100% of isolates, while amikacin showed variable results. The isolates that were able to grow with amikacin, were studied in relation to the presence of integron class 1. The result was negative, suggesting the absence of integron. Using dilution method, the antibiotics belonging to the cephalosporin, glycopeptide, macrolide, quinolone, and tetracycline groups were the most active ones for the *C. pseudotuberculosis* biovar ovis isolates. Less activity of β -lactam and aminoglycosides were observed. There was no observation of variability in the antibiotic patterns in the strains coming from different sources.

© 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad bacteriana supurativa de evolución crónica que afecta principalmente a ovinos y caprinos. El agente etiológico de la LAC es *Corynebacterium pseudotuberculosis*, un bacilo gram positivo irregular, corineforme, no lipofílico, que pertenece al grupo *Corynebacterium diphtheriae* conjuntamente con las especies *Corynebacterium diphtheriae* y *Corynebacterium ulcerans*. La LAC en animales adultos se presenta en forma cutánea y/o visceral. La primera se caracteriza por la formación de abscesos en el sistema linfático subcutáneo y afecta los ganglios linfáticos superficiales. En la forma visceral los abscesos se manifiestan en órganos como pulmones, hígado y riñón, causando deterioro en la condición orgánica del animal hacia estados caquéticos de curso crónico⁶.

Una posible alternativa para disminuir los efectos adversos de la enfermedad, en animales de alto valor genético y reproductivo, es la administración de antibióticos cuando se diagnostica la infección en la fase temprana. El éxito del tratamiento dependerá de la selección del antibiótico apropiado, considerando la farmacocinética, la farmacodinamia y el sitio de la infección¹⁴. Reportes de sensibilidad *in vitro* de cepas provenientes de diferentes especies animales mostraron que antibióticos de los grupos macrólidos, tetraciclinas, cefalosporinas, cloranfenicol y rifampicina fueron los más activos^{7,14}. Existen informes previos sobre patrones de sensibilidad antibiótica en *C. pseudotuberculosis* aislados de ovinos de la Patagonia argentina, zona endémica de LAC⁶. Sin embargo, debido a la aparición de cepas resistentes, en los últimos años se establecieron nuevos criterios y categorías interpretativas para *Corynebacterium* spp. por el método de dilución². Por ello, es importante mantener la información actualizada sobre el perfil de sensibilidad y resistencia, para una mejor selección de antibióticos frente a esta patología de impacto productivo.

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la sensibilidad antibiótica de *C. pseudotuberculosis* aislados de

pequeños rumiantes e investigar la presencia de integrones que contienen genes de resistencia.

Se estudiaron 15 aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de muestras de pequeños rumiantes de diferentes fuentes y localizaciones geográficas (tabla 1). Se cultivaron en agar tripteína soya suplementado con 5% de sangre ovina y se identificaron mediante el sistema comercial API[®] Coryne (bioMérieux, Francia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, previa coloración de Gram. Además se realizaron pruebas de lipofilismo, oxidasa, catalasa, pirazinamidas, CAMP y CAMP reversa⁶.

Método de difusión en agar

Se empleó agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de ovino, las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera normal y las lecturas de los halos de inhibición se evaluaron a las 24 h y se reconfirmaron a las 48 h^{6,7}. Se ensayaron los siguientes antibióticos: amicacina (30 μ g), amoxicilina-clavulánico (20/10 μ g), ampicilina (10 μ g), cefotaxima (30 μ g), ceftiofur (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), cloranfenicol (30 μ g), eritromicina (30 μ g), estreptomycin (300 μ g), gentamicina (10 μ g), imipenem (10 μ g), kanamicina (120 μ g), norfloxacin (10 μ g), penicilina G (10 U), rifampicina (5 μ g), tetraciclina (30 μ g), trimetoprim-sulfametoxazol (25 μ g) y vancomicina (30 μ g). Para la interpretación de los resultados se utilizaron los valores recomendados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para *Staphylococcus* spp., que fueron validados por estudios previos debido a que no hay valores de corte que asignen categorías interpretativas para corinebacterias por este método^{3,4,7}. Como cepa de control de calidad de la metodología se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabla 1 Descripción de los aislamientos estudiados

Aislamiento	Cabra u oveja	Sitio de lesión	Lugar origen
Cp10	Ovino	Absceso pulmonar	Santa Cruz, Argentina
Cp14	Ovino	Absceso pulmonar	Santa Cruz, Argentina
Cp15	Ovino	Linfonódulo mediastino	Santa Cruz, Argentina
Cp17	Ovino	Absceso renal	Santa Cruz, Argentina
Cp20	Ovino	Absceso renal	Santa Cruz, Argentina
Cp93	Ovino	Absceso renal	Chubut, Argentina
Cp95	Ovino	Linfonódulo inguinal superficial	Chubut, Argentina
7506	Caprino	Absceso testicular	Río Negro, Argentina
5807	Ovino	Linfonódulo inguinal superficial	Tierra del Fuego, Argentina
6007	Ovino	Linfonódulo inguinal superficial	Río Negro, Argentina
K407	Ovino	Linfonódulo pre-escapular	Chubut, Argentina
355 CRE	Ovino	Linfonódulo pre-crural	Aracatuba, Estado San Pablo, Brasil
174	Ovino	Linfonódulo pre-crural	Aracatuba, Estado San Pablo, Brasil
103	Ovino	Linfonódulo pre-escapular	Aracatuba, Estado San Pablo, Brasil
1002	Caprino	Linfonódulo inguinal superficial	Estado de Bahía, Brasil

Método de dilución

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se estudió por el método epsilométrico (Oxoid M.I.C. Evaluator™ Strip-Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, Reino Unido), basado en el uso de tiras inertes impregnadas con gradientes de los antibióticos: cefotaxima (0,015-256 µg/ml), ciprofloxacina (0,002-32 µg/ml), eritromicina (0,015-256 µg/ml), gentamicina (0,06-1.024 µg/ml), imipenem (0,002-32 µg/ml), penicilina (0,015-256 µg/ml), tetraciclina (0,015-256 µg/ml) y vancomicina (0,015-256 µg/ml). Para el ensayo se empleó agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de ovino. Los resultados fueron registrados a las 24 h y reconfirmados a las 48 h. Se interpretó el valor de la CIM en µg/ml, obtenido de la intersección entre la concentración dada por la tira reactiva y el crecimiento bacteriano que forma una elipse. Los datos se analizaron de acuerdo con los criterios establecidos en CLSI para *Corynebacterium* spp.². Como cepa de control de calidad de la metodología se utilizó *S. aureus* ATCC 29213.

Extracción de ADN

A partir de una suspensión en 300 µl de agua destilada estéril de un cultivo bacteriano, se realizó la extracción de ADN mediante la lisis por ebullición (5 min). Luego de la centrifugación (11.000 × g a 4 °C por 3 min) se separó el sobrenadante para ser utilizado en la PCR.

Detección de integrones

En la PCR se emplearon cebadores específicos para detectar los genes de la integrasa *intI1* de acuerdo al método descrito por Orman et al.¹² con modificaciones: la reacción de PCR se desarrolló en un volumen total de 25 µl conteniendo: 5 µl de ADN templado, los cebadores respectivos en concentración 1 µM, 1 µM dNTP (Promega, Madison, EE.UU.), 1X Green GoTaq Reaction Buffer (1,5 µM MgCl₂, pH 8,5); 1,5 µM MgCl₂ y 0,2 U de Go Taq DNA polymerase (Promega, Madison,

EE.UU.). La reacción de amplificación de ADN se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 3 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 30 s a 52 °C (apareamiento) y 2 min a 72 °C (extensión); extensión final 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se observaron en geles de agarosa al 1,8% (p/v) (Biodynamics SRL, Argentina) en buffer TAE 1X y se revelaron con colorante SYBR Safe. Se utilizó la cepa control *Enterobacter cloacae* E702.

Los aislamientos se caracterizaron como bacilos gram positivos agrupados en empalizada, no lipofílicos, con reacción positiva para las pruebas de catalasa, oxidasa, CAMP, CAMP reversa y negativa para pirazinamidasas y reducción de nitrato. Por los resultados de estas pruebas bioquímicas y los del sistema API® Coryne (bioMérieux, Francia), fueron identificados como *C. pseudotuberculosis* biovar ovis.

En las pruebas de difusión en agar, aplicando los criterios de CLSI para *Staphylococcus* spp., amicacina mostró resultados variables y el resto de los antibióticos fueron activos frente al 100% de los aislamientos, coincidiendo con otros autores^{3,4,6,7}. De los aminoglucósidos, amicacina no fue activa frente al 73% de los aislamientos, a diferencia de gentamicina, kanamicina y estreptomycin, que inhibieron el desarrollo de todos.

Por otra parte, los resultados de penicilina, eritromicina, gentamicina y ciprofloxacina fueron evaluados según los puntos de corte propuestos por Barberis et al.¹ para *Corynebacterium* spp. La interpretación para penicilina y ciprofloxacina no se modificó, pero sin embargo para eritromicina y gentamicina surgieron aislamientos con actividad intermedia: 27 y 33%, respectivamente.

Trabajos realizados con cepas de esta especie, de distintas fuentes, mostraron patrones de actividad antibacteriana variables. Aislamientos procedentes de ovinos y caprinos en Venezuela fueron informados resistentes para penicilina y trimetoprima-sulfametoxazol⁵. En dos aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis procedentes de huemules de la región de Aysen (Chile), uno de ellos fue inhibido por estreptomycin mientras que el otro resultó resistente a este antibiótico y a ciprofloxacina¹⁰. En la misma biovariedad

Antibióticos	Concentración inhibitoria mínima de 7 antimicrobianos		
	<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar ovis (n = 15)		
	CIM (µg/ml)		
	Rango (µg/ml)	50%	90%
Cefotaxima	0,25-1	0,5	1
Ciprofloxacina	0,03-0,06	0,06	0,06
Eritromicina	< 0,015-0,12	0,015	0,03
Gentamicina	0,06-8	4	8
Penicilina	0,03-0,5	0,06	0,25
Tetraciclina	0,06-0,5	0,12	0,25
Vancomicina	0,5-1	1	1

aislada de camello (*Camelus dromedarius*) los antibióticos ampicilina, eritromicina, penicilina, tetraciclina y estreptomina resultaron total o parcialmente ineficaces⁸.

La resistencia a antibióticos aminoglucósidos ha sido comunicada para las corinebacterias^{1,11,15}. Algunos autores sugieren que el biotipo que infecta a ovinos y caprinos sería resistente a los aminoglucósidos debido a mecanismos de impermeabilidad y relacionados con la incapacidad de producir la enzima nitrato reductasa⁹. Además, para el género *Corynebacterium* la adquisición y diseminación de resistencias a aminoglucósidos fue relacionada a la presencia de integrones. En particular, en *Corynebacterium resistens* DSM 45100 y *Corynebacterium glutamicum* se han identificado integrones plasmídicos clase 1^{11,15}. En los aislamientos que desarrollaron frente a aminoglucósidos se investigó la presencia de integrones de clase 1. El resultado fue negativo, sugiriendo la ausencia del integrón.

Con respecto a las pruebas de dilución, los métodos epsilométricos resultan una alternativa útil para la determinación de la sensibilidad, especialmente por su sencillez y la facilidad de interpretación. Además, muestran buena correlación con las CIM obtenidas por microdilución y dilución en agar para analizar la sensibilidad de corinebacterias⁷. La determinación de CIM a través de M.I.C. Evaluator™ es una alternativa a los métodos de microdilución. Trabajos previos demuestran que las CIM obtenidas por esta metodología se correlacionan con las categorías interpretativas de los métodos de dilución y con las de otros epsilométricos¹³.

Los valores de las CIM se expresan en la tabla 2. Cefotaxima, ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina y vancomicina fueron activos en el 100% de los aislamientos. Considerando los valores de CIM₉₀, los compuestos más eficaces fueron ciprofloxacina y eritromicina (0,06 y 0,03 µg/ml, respectivamente), seguidos por tetraciclina, con valores menores o iguales a 0,25 µg/ml. El 90% de los aislamientos fueron inhibidos por concentraciones ≤ 1 µg/ml de cefotaxima y vancomicina. De acuerdo con los valores de CIM₉₀, los aislamientos mostraron sensibilidad intermedia para gentamicina y penicilina.

La penicilina es uno de los antibióticos de primera línea utilizado en el tratamiento de LAC actualmente, y a pesar de que se notificaron cepas resistentes, aún no está claro el mecanismo de resistencia^{1,5,14}. Por otra parte, el punto de corte de sensibilidad establecido por CLSI para la penicilina fue reducido: de 1 a 0,125 µg/ml, recientemente².

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

Dado que *C. pseudotuberculosis* puede afectar a distintas especies animales, es importante conocer el perfil de actividad de antibióticos por la gran variabilidad que presentan las poblaciones bacterianas. En este trabajo los antibióticos pertenecientes a los grupos de cefalosporinas, glucopeptidos, macrólidos, quinolonas y tetraciclinas fueron los más activos para los aislamientos de *C. pseudotuberculosis* biovar ovis. Se demostró menor actividad de β-lactámicos y aminoglucósidos. No se registró variabilidad en los perfiles antibióticos en los aislamientos procedentes de diferentes fuentes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco y al Laboratorio de Bacteriología, Unidad Integrada Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por su apoyo económico y técnico.

Bibliografía

1. Barberis C, Sandoval E, Rodríguez H, Ramírez MS, Famiglietti A, Almuzara M, Vay C. Comparison between disk diffusion and agar dilution methods to determine *in vitro* susceptibility of *Corynebacterium* spp. clinical isolates and update of their susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;14:246–52.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, 2016; M45-3rd Edition. Wayne, PA, EE.UU.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 26th Edition, 2016. Zone diameter and Minimal Inhibitory Concentration Interpretative Standards for *Staphylococcus* spp.; M100-S. Wayne, PA, EE.UU.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement, 2007. Zone diameter and Minimal Inhibitory Concentration Interpretative Standards for *Staphylococcus* spp.; M100-S17, Vol 27, N° 1. Wayne, PA, EE.UU.
5. Delgado Duno A, Zárraga J, Chirino-Zárraga CI, Carrero Portillo LL. Caracterización epidemiológica de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Paraguaná, Venezuela. *Rev Med Vet*. 2015;31:35–45.
6. Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos A, Díaz Y, Álvarez L, Callejo R, Prieto M, Jodor N, Jensen O. Diagnóstico de *pseudotuberculosis* en ovinos patagónicos. *Rev Argent Microbiol*. 2007;39:44–6.

7. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE 3rd, Bernard KA. Clinical microbiology of Coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:125–59.
8. Hawari Dawood A. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (caseous lymphadenitis) in camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. *Am J Anim Vet Sci.* 2008;3:68–72.
9. Judson R, Songer JG. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: *in vitro* susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Vet Microbiol.* 1991;27:145–50.
10. Morales N, Aldridge D, Bahamonde A, Cerda J, Araya C, Muñoz R, Saldias ME, Lecocq C, Fresno M, Abalos P, Retamal P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Patagonian huemul (*Hippocamelus bisulcus*). *J Wildl Dis.* 2017;53:1–4.
11. Nesvera J, Hochmannova J, Patek M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;169:391–5.
12. Orman B, Piñeiro SA, Arduino S, Galas M, Melano R, Caffer MI, Sordelli DO, Centron D. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3963–70.
13. Rennie RP, Turnbull L, Brosnikoff C, Cloke J. First comprehensive evaluation of the M.I.C. evaluator device compared to Etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1153–7.
14. Rhodes DM, Magdesian KG, Byrne BA, Kass PH, Edman J, Spier SJ. Minimum inhibitory concentrations of equine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates (1996–2012). *J Vet Intern Med.* 2015;29:327–32.
15. Schröder J, Maus I, Meyer K, Wördemann S, Blom J, Jaenicke S, Schneider J, Trost E, Tauch A. Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics.* 2012;13:1–19.