



INFORME BREVE

Capacidad de supervivencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* en distintos suelos de la provincia de Chubut, Patagonia argentina



Laura Alvarez^a, Aillin William^a, Isabel Castro^b, Fernanda Valenzuela^b
y Silvia Estevao Belchior^{a,*}

^a Cátedra de Microbiología Clínica, Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina

^b Cátedra de Suelos, Departamento de Geología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina

Recibido el 30 de diciembre de 2015; aceptado el 18 de septiembre de 2016
Disponible en Internet el 4 de enero de 2017

PALABRAS CLAVE

Pseudotuberculosis;
Ovinos;
Contaminación del
ambiente

Resumen *Corynebacterium pseudotuberculosis* se transmite entre ovinos de la Patagonia argentina y ocasiona pseudotuberculosis. Esta bacteria, que infecta ganglios superficiales y vísceras, ingresa al animal a través de heridas en la piel o membranas mucosas. Durante la esquila, se cortan abscesos superficiales que drenan el contenido purulento y contaminan las herramientas y el suelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir a lo largo del tiempo en suelos de la Patagonia extraandina. Se recolectaron 5 muestras de suelos de distintas zonas de la provincia del Chubut (Patagonia extraandina) con características fisicoquímicas diferenciales en lo que respecta a contenido de materia orgánica, pH, conductividad eléctrica y textura. Diferentes alícuotas de estas muestras se inocularon con la cepa de *C. pseudotuberculosis* PAT10, aislada de un ovino patagónico, y se conservaron a temperatura ambiente. A distintos tiempos se determinó el número de bacterias supervivientes. El 60% de la población de *C. pseudotuberculosis* inoculada sobrevivió durante 80 y 210 días en suelos con moderadas y altas concentraciones de materia orgánica, respectivamente. Los suelos de características diversas de la Patagonia contaminados con poblaciones de *C. pseudotuberculosis* cumplirían un papel importante en el ciclo de infección en la naturaleza. La supervivencia de la bacteria por largos períodos se vio favorecida por el mayor contenido de materia orgánica sumado a la textura franco-limosa y no se observó la influencia de variables como el pH y la salinidad.

© 2016 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. Estevao Belchior).

KEYWORDS

Pseudotuberculosis;
Sheep;
Soil contamination

Survival capacity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* in different soil types from Chubut, Argentine Patagonia

Abstract *Corynebacterium pseudotuberculosis* is transmitted among sheep in Argentine Patagonia causing pseudotuberculosis. The bacterium penetrates the skin or mucous membrane wounds, infecting the superficial lymph nodes and viscera. When surface abscesses are cut during shearing, they drain their purulent contents and contaminate tools and the soil. The objective of this work was to evaluate the survival capacity of *C. pseudotuberculosis* over time, in soils from the extra-Andean Patagonia region. Five types of superficial soils were collected from different areas in Chubut province (extra-Andean Patagonia), having distinctive physico-chemical properties including organic matter content (very high to nonexistent), pH (neutral to strongly alkaline), electrical conductivity (saline to non-saline) and texture (sandy, clayey, silty loam). Different aliquots of each type of soil were inoculated with *C. pseudotuberculosis* PAT10 strain isolated from a Patagonian sheep, and were stored at room temperature. The number of surviving bacteria was determined at various times. Sixty percent (60%) of the inoculated *C. pseudotuberculosis* population survived for 80 to 210 days in soils with moderate to high organic matter content respectively. Silty soils favored bacterial survival, whereas the variables pH and salinity had no effect on survival.

© 2016 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) o pseudotuberculosis es una enfermedad que afecta a ovejas, cabras, vacas y otros animales domésticos. Su curso es típicamente crónico y se presenta en forma cutánea o visceral. La primera se caracteriza por la formación de abscesos caseosos en el sistema linfático subcutáneo del animal, que se palpan a través de la piel. En la forma visceral, los abscesos se manifiestan en ganglios internos de la cavidad torácica y órganos importantes, como pulmones, hígado y riñones⁷.

La LAC es una patología que ocasiona pérdidas económicas en la industria ovina y caprina, debido a decomisos totales o parciales, pérdida de peso del animal, baja calidad y cantidad de lana, menor producción de leche y fertilidad disminuida¹⁰.

En ovejas y cabras, el agente etiológico es *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*, un coccobacilo gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo. La patogenia está asociada principalmente a la acción de una fosfolipasa D con afinidad por células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos. Además, compuestos lipídicos de la pared celular de la bacteria favorecen la vida intracelular en macrófagos⁴.

La principal vía de ingreso del microorganismo en los animales es la piel lesionada por la esquila; también ingresan a través de membranas mucosas. La máquina de esquila, cuando se contamina con pus de abscesos externos abiertos, favorece la transmisión horizontal de *C. pseudotuberculosis*⁴.

El material purulento eliminado de los abscesos contiene concentraciones muy elevadas de microorganismos viables que contaminan no solo las herramientas de esquila, sino también el suelo. Las corinebacterias presentes en el pus se organizan formando agregados bacterianos que facilitan su resistencia a condiciones ambientales adversas y mantienen su capacidad de infección¹. El estudio de la capacidad de

supervivencia del microorganismo fuera del huésped reviste importancia para el desarrollo de programas de control y prevención de la LAC².

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *C. pseudotuberculosis* de sobrevivir a lo largo del tiempo en suelos de la Patagonia extraandina.

Para este estudio, se seleccionó la cepa autóctona de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* PAT10. Esta fue identificada por métodos bioquímicos y por técnicas moleculares mediante la secuenciación del gen 16S del ADNr. El aislamiento fue recuperado de un nódulo pulmonar de un ovino de la Patagonia^{5,13}. Los cultivos de la cepa seleccionada se realizaron en agar sangre de ovino al 5%, y para los ensayos se preparó una suspensión en solución fisiológica estéril.

Se recolectaron 5 muestras de suelos tomadas a una profundidad entre 0 y 10 cm de la superficie de distintas zonas de la provincia de Chubut, con características fisicoquímicas diferenciales (fig. 1). Tres muestras provinieron de la zona de Pampa Pelada (coordenadas: 45° 0,8' 45'' S y 67° 57' 0,8'' O): la muestra 1 (M1) de un corral de estancia donde habitualmente se encierran ovinos, la muestra 2 (M2) de un área de pastoreo de una estancia y la muestra 3 (M3) fue recolectada fuera de la estancia. La muestra 4 (M4) fue recolectada de la zona de chacras en Sarmiento (coordenadas 45° 35,5' 59,4'' S y 69° 1' 2,86'' O), donde habitualmente se realizan tareas de manejo a campo de ovinos. La muestra 5 (M5) se obtuvo de un suelo seleccionado de una zona cercana a la costa en Comodoro Rivadavia (coordenadas 45° 49' 30,4'' S y 67° 27' 45,4'' O).

En las 5 muestras se realizaron las siguientes determinaciones analíticas: pH en agua (1:1) por vía potenciométrica, materia orgánica, textura y conductividad eléctrica¹¹. Las características fisicoquímicas de los suelos se muestran en la tabla 1. Se tomaron en consideración valores de referencia de zonas cercanas a las de muestreo para los horizontes



Figura 1 Áreas de estudio.

superficiales de Pampa Pelada, de la zona de chacras de Sarmiento y de suelos de la zona costera en Comodoro Rivadavia (Castro, comunicación personal).

Alícuotas de 3 cm³ de cada suelo fueron distribuidas en tubos de ensayo, esterilizadas e inoculadas con la cepa seleccionada empleando 1 ml de una suspensión bacteriana con una densidad óptica equivalente a 1 de la escala de Mc Farland (3,10⁸ UFC/ml).

El ensayo se desarrolló en condiciones controladas de laboratorio, empleando la técnica descrita por Hayashi et al.⁸ con modificaciones. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente (20-22 °C) durante 7 meses.

A distintos tiempos, se determinó el número de bacterias supervivientes. Para ello, en cada tubo inoculado se distribuyeron 2 ml de solución fisiológica estéril, se homogenizó con vórtex por 1 min y del sobrenadante se realizaron diluciones seriadas para los recuentos bacterianos. De la misma manera, se procesaron muestras de suelo no inoculado como controles negativos del ensayo. Los recuentos se realizaron por triplicado, empleando la técnica de Miles et al.⁹. Para el análisis, los datos se transformaron a logaritmo en base 10 (log₁₀ UFC/cm³ de suelo). Los valores se expresaron como promedios ± desviación estándar (DE) y de acuerdo con la distribución de las variables, paramétricas o no paramétricas, se aplicó el test de ANOVA. La probabilidad $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Además, se obtuvieron los porcentajes de supervivencia con sus respectivas DE.

En la figura 2 se presenta la variación en los porcentajes de supervivencia durante el ensayo. En los sistemas M1, M2 y M3, entre el 60 y el 80% de la población bacteriana sobrevivió durante 80 días, y luego se registró un descenso brusco hasta los 120 días de incubación. Las muestras M1 y

M2 presentaron contenidos de materia orgánica levemente mayores que los de referencia para la zona estudiada debido al aporte orgánico de las heces de los ovinos y las pasturas. En M3, el porcentaje de materia orgánica se encontró dentro del rango normal establecido para las zonas de muestreo, lo que indica su procedencia natural. No se registraron diferencias significativas entre los recuentos a diferentes tiempos entre estas 3 muestras.

En el suelo M4, la cepa se mantuvo viable en una proporción del 90 al 95% hasta los 120 días posteriores a la inoculación. Luego la supervivencia comenzó a caer de a poco, hasta llegar a aproximadamente al 60% a los 210 días del ensayo. Este suelo, con textura franco-limosa y fuertemente alcalino y salino, presentó porcentajes de materia orgánica más elevados que los informados como valores de referencia para la zona. El contenido de heces de ovinos sería el principal aporte orgánico en este sistema. Por otra

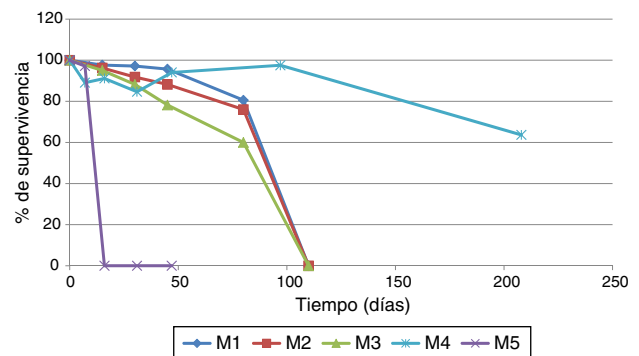


Figura 2 Porcentaje de supervivencia de *C. pseudotuberculosis* en diferentes tipos de suelos.

Tabla 1 Características fisicoquímicas de los suelos

Área	Pampa Pelada			Sarmiento			Comodoro Rivadavia		
	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	VR	M 4	M 5	VR
Coordenadas	45° 0,8' 45" S; 67° 57' 0,8" O			45° 35,5' 59,4" S; 69° 1' 2,86" O			45° 49' 30,4" S; 67° 27' 45,4" O		
Muestra	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	VR	M 4	M 5	VR
pH	7,20	6,62	6,92	8,65	7,83	6,45-7,98	Fuertemente alcalino	Ligeramente alcalino	7,82-9,35
Conductividad eléctrica dS/m	0,14	0,07	0,19	5,63	7,76	0,08-0,74	Salino	Salino	4,56-8,74
% Materia orgánica	1,97	1,62	1,11	26,28	0,02	0,72-1,20	1,05-1,93	0,02	0,02-0,45

VR: valor de referencia.

Fuente: Castro I, comunicación personal.

parte, este suelo presentó en su composición un 50% de fracción limosa, lo que permite retener mayores contenidos de humedad.

Por el contrario en M5, la bacteria sobrevivió durante los primeros 7 días con un porcentaje de supervivencia del 97%, para disminuir abruptamente y ser nula a los 15 días del ensayo. En este suelo, de textura arcillosa a arcillo-limosa, ligeramente alcalino y salino, el contenido de materia orgánica fue ínfimo, pero estuvo dentro del rango de los valores normales establecidos para esa zona.

En los suelos utilizados en estos ensayos, los valores de pH y de conductividad eléctrica se encontraron dentro del rango de los valores de referencia.

Del análisis de los resultados surge que se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los recuentos bacterianos: el mayor porcentaje de supervivencia de *C. pseudotuberculosis* a los 7 meses (duración total del ensayo) se observó en el suelo con mayor aporte de materia orgánica y textura franco-limosa, es decir, en la muestra M4.

El contenido de materia orgánica en los suelos de textura franca (limoso o arenoso) favoreció la supervivencia de la bacteria, independientemente de la influencia de otras variables, como pH y salinidad.

Los datos de este estudio fueron comparados con ensayos realizados en condiciones similares pero con otras especies de corinebacterias patógenas en vacas: *Corynebacterium pilosum*, *Corynebacterium renale* y *Corynebacterium cystitidis*. *C. pseudotuberculosis* mostró un patrón de supervivencia similar al de *C. pilosum*, ya que se observó que en suelos orgánicos esta última especie sobrevivió hasta 210 días, con un porcentaje de supervivencia del 10%. Las otras 2 especies, *C. renale* y *C. cystitidis*, sobrevivieron hasta 56 y 63 días, respectivamente. En suelos sin nutrientes, la población bacteriana de las 3 especies disminuyó rápidamente, y *C. renale* y *C. pilosum* no se aislaron en los suelos luego de 70 días⁸. Otro estudio realizado por Spier et al.¹² demostró que cepas de *C. pseudotuberculosis* biovariedad *equi*, que infecta caballos, se mantuvieron viables durante 224 días en suelos con un 5 a un 10% de materia fecal de equinos, independientemente de su textura o su nivel de humedad. Si bien Spier et al.¹² concluyen que la biovariedad *equi* sobrevive en suelos con propiedades muy variables, en la experiencia el crecimiento fue mayor en suelos arenosos con fragmentos gruesos que en suelos limosos. En el presente trabajo, la cepa estudiada se mantuvo viable por más tiempo y con mayores porcentajes de supervivencia en el suelo de textura franco-limosa. Esta textura se corresponde con más de un 50% de fracción limosa; por el contrario, en los suelos arenosos y franco-arenosos, la proporción de limo no supera el 15 y el 50% de limo, respectivamente. Además, para la biovariedad *equi* se ha reportado que las áreas con suelos que contienen niveles de humedad más altos tuvieron un efecto protector contra la infección de *C. pseudotuberculosis* en los caballos, dado que estos suelos se mantienen cubiertos permanentemente por vegetación³.

Los resultados sugieren que las poblaciones de *C. pseudotuberculosis* que contaminan repetidamente los suelos de la Patagonia (a causa de las prácticas de manejo a campo de ovinos infectados) podrían mantenerse viables y cumplirían un papel importante en el ciclo de infección en la naturaleza. Estos conocimientos del aislamiento autóctono de *C. pseudotuberculosis*, junto con

otros sobre la capacidad de supervivencia bajo condiciones de desecación y déficit de nutrientes¹, permiten una mayor comprensión del comportamiento de la bacteria durante los períodos en que se encuentra fuera del huésped. La aplicación de barreras durante el proceso de la esquila (como el uso de altas temperaturas y de desinfectantes) sería una medida complementaria al manejo adecuado de los animales enfermos, que permitiría disminuir la dispersión de las bacterias en el ambiente y la transmisión de la enfermedad dentro de las majadas⁶.

Si bien el presente estudio se realizó sobre suelos esterilizados y la supervivencia de *C. pseudotuberculosis* podría estar afectada por la presencia de otros microorganismos del suelo, *C. pseudotuberculosis* sería capaz de sobrevivir a lo largo del tiempo en suelos de la Patagonia extraandina con diferentes aportes de materia orgánica y humedad, independientemente de otras variables, como el pH y la salinidad.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue financiado mediante el subsidio otorgado por la UNPSJB (PI 1022/12).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al Med. Vet. Oscar Jensen (Chacra Experimental del Centro de Investigación en Zoonosis de Sarmiento, Ministerio de Salud y Ministerio de Desarrollo Territorial y Sectores Productivos, Chubut) y al Sr. Carlos Torrecillas (Estancia la Guillermina, Chubut, Argentina), por su predisposición y colaboración en la recolección y el aporte de las muestras de suelos para que se desarrollara este trabajo de investigación. Los autores agradecen a los revisores por sus comentarios.

Bibliografía

1. Alvarez L, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Alvarez HM, Estevao Belchior S. Estudio de viabilidad, frente a condiciones de estrés ambiental, de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislada de ovinos de la región patagónica. XI Congreso Argentino de Microbiología [resumen 598-20030]. Rev Arg Microbiol. 2007;39 Supl 1:140.
2. Augustine JL, Renshaw HW. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. Am J Vet Res. 1986;47:713-5.
3. Boysen C, Davis EG, Beard LA, Lubbers BV, Raghavan RK. Bayesian geostatistical analysis and ecoclimatic determinants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection among horses. 2006; PLoS ONE 10(10):e0140666. doi:10.1371/journal.pone.0140666.
4. Estevao Belchior S, Alvarez L. Effect of quaternary ammonium compounds and temperature on shearing utensils contaminated by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Onl J Vet Res. 2014;18:587-595 [consultado Jul 2014]. Disponible en: <http://onljvetres.com>
5. Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos A, Díaz Y, Álvarez L, Callejo R, Prieto M, Jodor N, Jensen O. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep from Patagonia. Rev Arg Microbiol. 2007;39:44-6.
6. Estevao Belchior S, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Jensen O. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Rev Vet Arg. 2006;258-78. XXIII.
7. Fontaine MC, Baird GJ. Caseous lymphadenitis. Small Rumin Res. 2008;76:42-8.
8. Hayashi A, Yanagawa R, Kida H. Survival of *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium pilosum* and *Corynebacterium cystitidis* in soil. Vet Microbiol. 1985;10:381-6.
9. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg (Lond). 1938;38:732-49.
10. Paton MW, Rose IR, Hart RA, Sutherland SS, Mercy AR, Ellis TM, Dhaliwal JA. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. Aust Vet J. 1994;71:47-9.
11. Sistema de Apoyo Metodológico a Laboratorios de Análisis de suelos, aguas, vegetales y enmiendas orgánicas (SAMPLA). Curso de metodologías para laboratorios de análisis de suelos y aguas. 2012. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
12. Spier SJ, Toth B, Edman J, Quave A, Habasha F, Garrick M, Byrne BA. January 2012, Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *equi* in soil. Vet Record. 2012;170:80 [On-line] [consultado Ene 2012]. Disponible en: <http://www.veterinaryrecord.bmj.com>
13. Teixeira Cerdeira L, Cybelle Pinto A, Cruz Schneider MP, Silva de Almeida S, Rodrigues dos Santos A, Vieira Barbosa EG, Ali A, Silvanira Barbosa M, Ribeiro Carneiro A, Jucá Ramos RT, Oliveira dos Santos R, Barh D, Barve N, Zambare V, Estevão Belchior S, Guimaraes LC, de Castro Soares S, Carvalho de Abreu VA, Tauch A, Trost E, Miyoshi A, Azevedo V, Silva A. Whole genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* PAT10 strain isolated from sheep in Patagonia, Argentine. J Bacteriol. 2011;193:6420-1.