

o de la presencia de la equibactina en aislamientos locales de *Streptococcus equi* subsp *equi* y su utilidad diagn

Vet. Arg. ? Vol. XXXVI ? N° 369 ? Enero 2019.

Carla Paola Bustos^{1*}, Caiane Tasca², María Mesplet¹, Nora Guida¹, Agueda Castagna de Vargas².

Resumen

Streptococcus equi subsp. *equi* (*S. equi*) es un coco grampositivo, ? hemolítico y agente causal de la adenitis equina. *S. equi* afecta el tracto respiratorio alto del equino con abscedación de linfonódulos de cabeza y cuello, pudiendo permanecer en animales recuperados como portadores quienes actúan como una importante fuente de infección. Posee numerosos factores de virulencia y además, produce equibactina (Eqb) que es un sideróforo para la captación más eficiente de hierro. Eqb le permitiría proliferar en tonsilas y linfonódulos y mantenerse en las mucosas de los portadores. El diagnóstico de la adenitis equina y la detección de portadores incluye la PCR directa y el cultivo e identificación fenotípica y genotípica (genes *sodA*, *seel*, *seeH* y/o *seM*). Recientemente, se comenzó a utilizar como diagnóstico PCR de los genes *eqbG* y *eqbE* que codifican para la Eqb. El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de la Eqb en aislamientos argentinos de *S. equi* y evaluar su utilidad en el diagnóstico de la adenitis equina y en la detección de portadores. Se estudió la presencia de la Eqb mediante la amplificación de los genes *eqbG* y *eqbE* en 29 aislamientos de *S. equi*, 13 de enfermos y 16 de portadores. El 100% (29/29) de los aislamientos resultaron positivos al gen *eqbG* y el 86% (25/29) al gen *eqbE*. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en Brasil y por lo tanto, consideramos que la detección de la Eqb puede ser útil en la identificación de cepas locales de *S. equi* siempre que se considere la amplificación del gen *eqbG* ya que la utilización del gen *eqbE* arrojó un elevado número de falsos negativos de *S. equi*.

Palabras clave: *Streptococcus equi* subsp. *equi*, Adenitis equina, Diagnóstico, Portadores, Equibactina

Summary

Streptococcus equi subsp. *equi* (*S. equi*) is a ? hemolytic and Gram-positive coccus that produces Strangles. *S. equi* affects upper respiratory tract of horses and it produces abscessation of lymph nodes of head and neck. Healthy horses recovered from Strangles might continue to harbour *S. equi* and may transmit the bacterium to other horses. *S. equi* has large virulence factors and also produces equibactin (Eqb), a siderophore that enhances its ability to acquire iron. Eqb may be related with proliferation of *S. equi* in tonsils and lymph nodes and the persistence of the bacterium in mucous of carrier horses. Strangles diagnosis and carrier detection are done by direct PCR and culture of the bacterium using phenotypic and genotypic identification (*sodA*, *seel*, *seeH* and/or *seM*

genes). Recently, PCR amplifying *eqbG* and *eqbE* genes, which encode Eqb, is used for *S. equi* identification. The aim of this work was to study the presence of Eqb in Argentine isolates of *S. equi* and to analyse its utility in Strangles diagnosis and carrier detection. Twenty-nine isolates (13 from sick horses and 16 from carriers) were studied by *eqbG* and *eqbE* genes amplification. One hundred percent of isolates (29/29) were positive to *eqbG* gene and 86% (25/29) of them were positive to *eqbE* gene. Similar results were obtained in Brazil, thus so we propose that the Eqb detection using *eqbG* gene may be useful to identify local strains of *S. equi*. However, *eqbE* was negative in a high number of *S. equi* isolates producing false negative results so it should not be use in local strain identification.

Keywords: *Streptococcus equi subsp. equi*, Strangles, Diagnosis, Carriers, Equibactin.

1Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Argentina.

2Universidad Federal de Santa María, Laboratorio de Bacteriología (LABAC), Río Grande do Sul, Brasil.

carlabustos@fvvet.uba.ar

Introducción

Streptococcus equi subsp. equi (*S. equi*) es un coco grampositivo, ? hemolítico del grupo C de Lancefield, agente causal de la adenitis equina. Esta enfermedad se caracteriza por afectar el tracto respiratorio alto de equinos jóvenes produciendo rinitis, faringitis y linfadenitis de cabeza y cuello (Sellon, 2013; Waller, 2013). Aproximadamente el 10% de los animales recuperados de la enfermedad pueden permanecer como portadores de *S. equi* siendo una importante fuente de infección para otros animales susceptibles (Newton, 2000; Chanter, 2000).

S. equi posee numerosos factores de virulencia entre los que se destacan la cápsula de ácido hialurónico, la proteína M (SeM), los superantígenos SeeI, SeeH, SeeL y SeeM y, diversas enzimas como la estreptolisina y la estreptoquinasa (Waller, 2011; Paillot, 2010; Timoney, 2004). Además, produce un sideróforo llamado equibactina (Eqb) que tiene la habilidad de captar el hierro *in vitro* (Cordoni, 2015; Waller, 2011). Se cree que la captación más eficiente de hierro le permite a la bacteria proliferar en tonsilas y linfonódulos (Ln) aumentando su capacidad de formar abscesos y sería fundamental para mantenerse en las mucosas de los animales portadores (Waller, 2011).

El diagnóstico de la adenitis equina se basa en la signología de los equinos, la presentación en forma de brote y se confirma con el aislamiento de la bacteria a partir de los Ln abscedados y/o de las secreciones nasales purulentas (Bustos, 2016; Waller, 2013; Timoney, 2004). También se puede realizar la detección del microorganismo a través de PCR directa (a punto final o en tiempo real), que posee mayor sensibilidad que el cultivo (Cordoni, 2015; Waller, 2013; Webb, 2013). Sin embargo, la PCR directa no permite distinguir entre bacterias viables o muertas y además, tampoco permite el estudio genotípico ni del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos, ni la utilización

de la cepa en el desarrollo de inmunógenos autólogos (comunicación personal). Por otro lado, el diagnóstico de los caballos portadores se realiza a partir del cultivo o PCR directa de muestras obtenidas idealmente de las bolsas guturales o de la nasofaringe donde la bacteria se encuentra de manera intermitente (Bustos, 2012a; Newton, 2000; Chanter, 2000; Chanter, 1997).

La posterior identificación de genes específicos de *S. equi*, como *sodA*, *seel*, *seeH* y/o *seM*, entre otros, por medio de la técnica de PCR, permite su diferenciación con otra bacteria estrechamente relacionada: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) (Bustos, 2016; Cordoni, 2015; North, 2014; Waller, 2013; Webb, 2013). Estos dos microorganismos poseen un 98% de homología genética pero se comportan de manera diferente ya que *S. equi* es un patógeno primario adaptado al equino y *S. zooepidemicus* es un comensal de mucosas que puede generar infecciones secundarias en diversas especies animales (Waller, 2011; Timoney, 2004). Recientemente se han comenzado a utilizar los genes que codifican para la Eqb como *targets* para el diagnóstico por PCR. La amplificación de los genes *eqbG* y *eqbE* fue probada por Cordoni et al. (2015) y Webb et al. (2013), respectivamente, mostrando valores de sensibilidad y especificidad elevados.

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de la Eqb en aislamientos argentinos de *S. equi* y evaluar su utilidad en el diagnóstico de la adenitis equina y en la detección de portadores.

Material y métodos

Se estudiaron 29 aislamientos de *S. equi*, 13 provenientes de animales enfermos (10 de linfadenitis submandibular y 3 de empiema de bolsas guturales) y 16 de animales clínicamente sanos considerados portadores.

Se estudió la presencia de la Eqb mediante la amplificación de una región de 201 pb del gen *eqbG* y una región de 1063 pb del gen *eqbE* utilizando los *primers* descritos en la tabla 1.

Primers	Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Referencia
ZM435	<i>eqbE</i>	5' CCGAATTTGTCCA AGTGGTATG 3'	1063 pb	Webb <i>et al.</i> (2013)
ZM436		5' GCACTCCGTTATA CTCACTG 3'		
ICESE2GC2F	<i>eqbG</i>	5' TTACCTCCATTAC TTGACAATCCAT 3'	201 pb	Cordoni <i>et al.</i> (2015)
ICESE2GC2R		5' GATTTGCAACATG AAACATTTACAG 3'		

Tabla 1: *Primers, secuencias y tamaño de los segmentos de los genes eqbG y eqbE amplificados en los aislamientos de S. equi estudiados.* Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 25 μ L conteniendo 5 μ L de Buffer 5x GoTaq (Promega), 10mM de cada *primer*, 20mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 1UI of GoTaq DNA Polimerasa, 1 μ L de templado (?100 ng de ADN) y agua libre de DNAsas y RNAsas. Se utilizó como control positivo a la cepa de referencia ATCC®39506 de *S. equi* y como control negativo agua ultrapura.

Los productos amplificados fueron corridos electroforéticamente en gel de agarosa al 1,5% y observados luego de la tinción con GelRed® (Biotium-Uniscience) a través de un transiluminador con luz U.V.

Resultados

Todos los aislamientos estudiados resultaron positivos a la PCR amplificando el gen *eqbG* y 25 de ellos fueron positivos para el gen *eqbE* (Figuras 1 y 2).

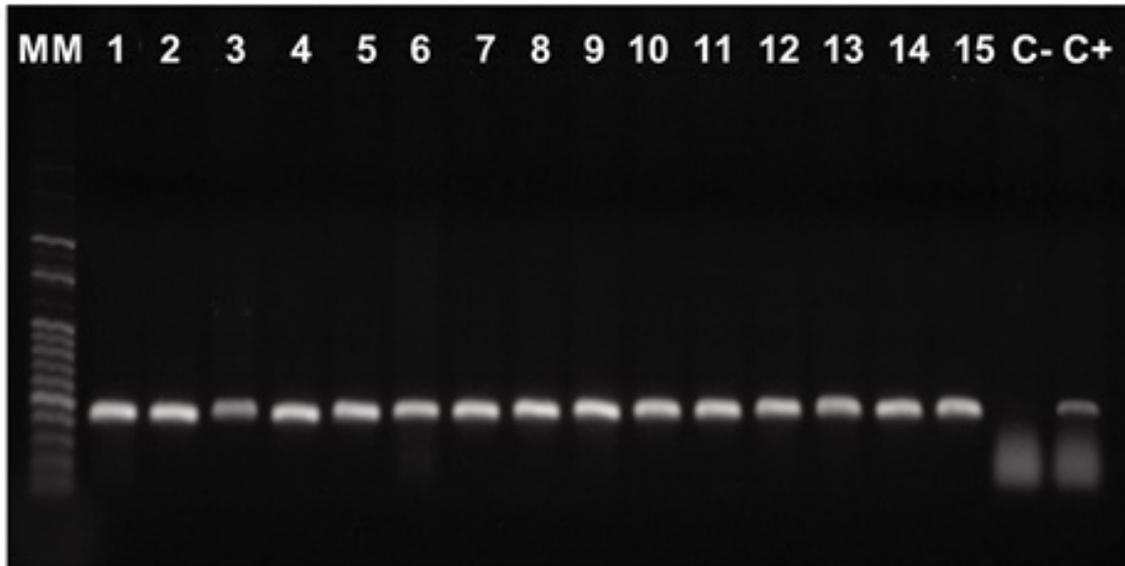


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del segmento de 201 pb del gen *eqbG*. MM: marcador de peso molecular. Calles 1-15: aislamientos de *S. equi* positivos. C+:

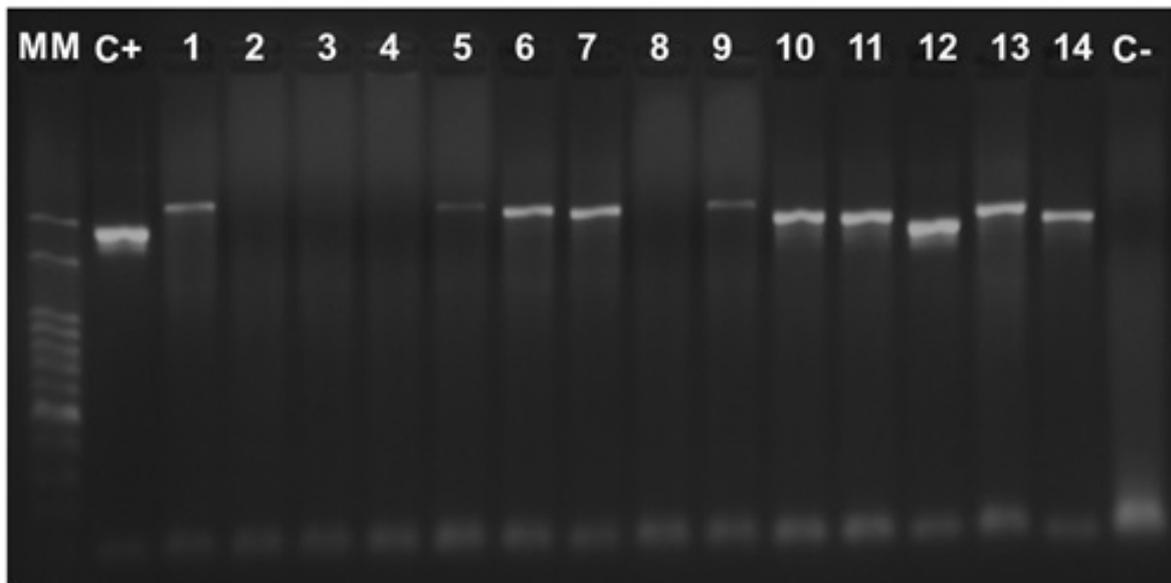


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del segmento de 1063 pb del gen *eqbE*. MM: marcador de peso molecular. Calles 1, 5-7, 9-14: aislamientos de *S. equi* positivos. Calles 2-4, 8: aislamientos de *S. equi* negativos. C+: control positivo. C-: control negativo. Los resultados de las PCR amplificando cada gen en los aislamientos se detallan en la tabla 2.

	Aislamientos	Origen	PCR	
			<i>eqbG</i>	<i>eqbE</i>
Aislamientos de animales con signología clínica	UBA8Ch	Bolsas guturales	+	+
	UBA8Md	Bolsas guturales	+	+
	UBA8Gd	Bolsas guturales	+	-
	UBA9Md	Ln submandibular	+	+
	UBA10Gd	Ln submandibular	+	+
	UBA11Gd	Ln submandibular	+	+
	UBA12Gd	Ln submandibular	+	+
	UBA29Gd	Ln submandibular	+	+
	UBA393	Ln submandibular	+	-
	UBA487	Ln submandibular	+	-
	UBAP659-1	Ln submandibular	+	-
	UBA685	Ln submandibular	+	+
	UBA726	Ln submandibular	+	+
	UBAP9	Nasofaringe	+	+
UBAP22-1	Nasofaringe	+	+	
UBAP22-2	Nasofaringe	+	+	
UBAP56-1	Nasofaringe	+	+	
UBAP56-2	Nasofaringe	+	+	

Tabla 2: Resultados de las PCR amplificando los genes *eqbG* y *eqbE* en los aislamientos de *S. equi* estudiados. **Discusión**

Se logró detectar la presencia del gen *eqbG* en el 100% (29/29) de los aislamientos de *S. equi* y el 86% (25/29) de ellos resultaron positivos a la PCR para el gen *eqbE*. De los 4 aislamientos que resultaron negativos, uno correspondía a un caballo con empiema de bolsas guturales y los otros fueron obtenidos de In de 3 equinos con sintomatología de adenitis equina. De manera similar, en estudios realizados con aislamientos brasileños, se obtuvo un 100% de aislamientos positivos al gen *eqbG* y sólo un 66% (40/60) al gen *eqbE*. Ninguno de los aislamientos brasileños de caballos portadores fue positivo al gen *eqbE* (Tasca, 2018), a diferencia del presente estudio, donde todos los aislamientos de portadores amplificaron ambos genes. El 95,24% (40/42) de aislamientos provenientes de animales enfermos en Brasil resultaron positivos al gen *eqbE* mientras que sólo el 69,23% (9/13) de los aislamientos de enfermos en Argentina presentaron dicho gen. Estas diferencias podrían deberse a la presencia de otros factores de virulencia presentes en las cepas aisladas de enfermos que permiten a la bacteria producir lesiones y enfermar a los animales estudiados.

Por otro lado, es interesante destacar que se obtuvieron diferencias en 3 aislamientos aislados de la misma muestra de empiema de bolsas guturales de un equino adulto: UBA8Ch y UBA8Md fueron positivos tanto a *eqbG* como a *eqbE* pero UBA8Gd fue sólo positivo a *eqbG*. Además, en estudios previos de estos aislamientos observamos diferencias en cuanto a su susceptibilidad antimicrobiana, nivel de expresión de cápsula y formación de biofilm (Bustos, 2016; Bustos, 2012b). Webb et al. (2013) también reportaron 2 aislamientos de *S. equi* negativos a *eqbE* procedentes de bolsas guturales de 2 equinos pertenecientes al mismo establecimiento. Estos resultados podrían estar indicando cierto grado de atenuación de las cepas alojadas en las bolsas guturales como ha sido descrito previamente por otros investigadores que identificaron la SeM truncada y la pérdida de genes de numerosos aislamientos de *S. equi* de portadores (Harris, 2015; Webb, 2013; Chanter, 2000).

Con base en los resultados obtenidos en el estudio de aislamientos argentinos y brasileños, la detección de la Eqb puede ser útil en la identificación de cepas locales de *S. equi* siempre que se considere la amplificación del gen *eqbG*. No recomendamos utilizar la PCR amplificando el gen *eqbE* para diagnosticar adenitis equina ya que el 30,77% de las cepas aisladas de enfermos en Argentina resultó negativo; ni para detectar portadores ya que el 100% de las cepas aisladas de portadores en el sur de Brasil estudiadas no amplificaron ese gen y por lo tanto arrojaron un elevado número de falsos negativos de *S. equi*.

La expansión clonal de los aislamientos de *S. equi* con pérdidas de genes enfatiza la importancia de incluir más de un gen *target* para la identificación por PCR y así disminuir

los falsos negativos en el diagnóstico de adenitis equina y principalmente, en la detección de portadores. Se propone entonces, aumentar el número de aislamientos de *S. equi* a analizar para conocer la prevalencia de estos genes en los aislamientos locales y la utilidad diagnóstica de las PCR amplificando los genes *eqbG* y *eqbE*.

Conclusiones

Según los hallazgos obtenidos, la PCR utilizando el gen *eqbG* podría ser útil para la identificación de aislamientos locales de *S. equi*. El gen *eqbE* no sería adecuado para el diagnóstico de la adenitis equina ni para la detección de portadores de la enfermedad.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco de la Movilidad Docente 2017 de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM) de la Dra. Carla Bustos y financiado por los Proyectos de Investigación UBACyT 20020130100299BA (Dir. Dra. Nora Guida y codir. Dra. María Mesplet) y UFSM044905 (Dir. Dra. Águeda Castagna de Vargas). Caiane Tasca fue becaria de Maestría UFSM 2016-2018 y Carla Bustos fue Becaria Postdoctoral CONICET 2016-2018.

Bibliografía

- BUSTOS, C.; MUÑOZ, A.; DI GENNARO, E.; ROSSANO, M.; GUIDA, N. 2012. Detección de portadores de *Streptococcus equi* subsp. *equi*. Rev Med Vet (B. Aires), 93, 1/2: 28-35. (a)
- BUSTOS, C.; MUÑOZ, A.; PICOS, J.; MORAS, E.; GUIDA, N. 2012. Different strains of *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from a guttural pouch empyema. Journal of Equine Veterinary Science, 32: S3-S95. (b)
- BUSTOS, C. Adenitis equina: Aislamiento y caracterización de *Streptococcus equi* subsp. *equi* de la provincia de Buenos Aires. 2016. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- CHANTER, N.; TALBOT, N.; NEWTON, J.; HEWSON, D.; VERHEYEN, K. 2000. *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. Microbiology, 146(6): 1361-1369.
- CORDONI, G.; WILLIAMS, A.; DURHAM, A.; FLORIO, D.; ZANONI, G.; LA RAGIONE, R. 2015. Rapid diagnosis of strangles (*Streptococcus equi* subspecies *equi*) using PCR. Research in Veterinary Science, 102: 162-166.
- HARRIS, S.; ROBINSON, C.; STEWARD, K.; WEBB, K.; PAILLOT, R.; PARKHILL, J.; HOLDEN, M.; WALLER, A. 2015. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. *Genome Research*, 25(9), 1360?1371.
- HOLDEN, M.; HEATHER, Z.; PAILLOT, R.; STEWARD, K.; WEBB, K.; AINSLIE, F.; JOURDAN, T.; BASON, N.; HOLROYD, N.; MUNGALL, K.; QUAIL, M.; SANDERS, M.; SIMMONDS, M.; WILLEY, D.; BROOKS, K.; AANENSEN, D; SPRATT, B.; JOLLEY, K.;

- MAIDEN, M.; KEHOE, M.; CHANTER, N.; BENTLEY, S.; ROBINSON, C.; MASKELL, D.; PARKHILL, J.; WALLER, A. 2009. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence and genetic exchange with human pathogens. PLoS Pathogens 5(3):e100346.
- NEWTON, J.; WOOD, J.; CHANTER, N. 1997. Strangles: long term carriage of *Streptococcus equi* in horses. Equine Veterinary Education, 9(2): 98-102.
- NEWTON, J.; VERHEYEN, K.; TALBOT, N.; TIMONEY, J.; WOOD, J.; LAKHANI, K.; CHANTER, N. 2000. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. Equine Veterinary Journal, 32(6): 515-526.
- NORTH, S.; WAKELEY, P.; MAYO, N.; MAYERS, J.; SAWYER, J. 2014. Development of a real-time PCR to detect *Streptococcus equi* subspecies *equi*. Equine Veterinary Journal, 46(1): 56-59.
- PAILLOT, R.; ROBINSON, C.; STEWARD, K.; WRIGHT, N.; JOURDAN, T.; BUTCHER, N.; HEATHER, Z.; WALLER, A. 2010. Contribution of each of four Superantigens to *Streptococcus equi* induced mitogenicity, gamma interferon synthesis, and immunity. Infection and immunity, 78: 1728-1739.
- SELLON, D.; LONG, M. 2013. Equine Infectious Diseases. Second edition. Ed. Saunders.
- SWEENEY C.; TIMONEY J.; NEWTON R.; HINES, M. 2005. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control and prevention of strangles. J Vet Intern Med, 19(1): 123-134.
- TASCA, C. Caracterização fenotípica e genotípica de *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolados de equinos enfermos y portadores no Rio Grande do Sul. Tesis de Maestría. Universidade Federal de Santa María. Santa María, Brasil.
- TIMONEY, J. 2004. The pathogenic equine streptococci. Vet. Res, 35, 397-409.
- WALLER, A.; PAILLOT, R.; TIMONEY J. 2011. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. Journal of Medical Microbiology, 60: 1231-1240.
- WALLER, A. 2013. Strangles: Taking steps towards eradication. Veterinary Microbiology, 167(1?2): 50?60.
- WEBB, K.; BARKER, C.; HARRISON, T.; HEATHER, Z.; STEWARD, K.; ROBINSON, C.; NEWTON, J.; WALLER, A. 2013. Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. The Veterinary Journal, 195(3): 300-304.
-