



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD HEMOLÍTICA ENTRE
CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PROVENIENTES DE
OVINOS, EQUINOS Y CAPRINOS

JOSEFINA GUTIÉRREZ DOMÍNGUEZ

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

PROFESOR GUÍA: PEDRO ÁBALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE
2010

MEMORIA DE TÍTULO

“COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD HEMOLÍTICA ENTRE CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PROVENIENTES DE OVINOS, CAPRINOS Y EQUINOS”.

Josefina Gutiérrez Domínguez *

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

RESUMEN

Corynebacterium pseudotuberculosis es el microorganismo causante de la linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes, así como de la linfangitis ulcerativa y abscesos en equinos y bovinos, causando pérdidas económicas importantes ya que disminuye el rendimiento productivo del ganado. Uno de los principales factores de virulencia de esta bacteria es la presencia de una esfingomielinasa específica, la fosfolipasa D, que favorece la diseminación de la bacteria dentro del hospedero. En este estudio se determina la presencia del gen que codifica esta exotoxina y se cuantifica la capacidad hemolítica de la misma, en aislados de *C. pseudotuberculosis* obtenidos desde ovinos, caprinos y equinos. Como resultado se obtuvo que existen diferencias dependiendo del origen, lo que puede estar generando las características de expresión de la enfermedad, ya que las cepas de origen ovino tienen mayor capacidad hemolítica que las de otras especies. Se sugiere que la capacidad hemolítica de las diferentes cepas puede estar relacionada con presentaciones clínicas diferentes en las especies animales en estudio y se propone un método de medición cualitativa de hemólisis en placas de agar sangre.

Palabras claves: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, linfadenitis caseosa, fosfolipasa D.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is the etiologic agent of caseous lymphadenitis in small ruminants, as well as ulcerative lymphangitis and abscesses in horses and cattle, causing significant economic losses because it reduces the productive efficiency of livestock. One of the main factors of virulence is the presence of a specific sphingomyelinase, phospholipase D, which promotes the spread of bacteria within the host. This study determines the presence of the gene encoding the exotoxin and quantifies the hemolytic capacity thereof, isolated from *C. pseudotuberculosis* obtained from sheep, goats and horses. It was observed that there are differences depending on the source, which may be generating the expression characteristics of the disease as ovine strains have greater capacity than other hemolytic species. It is suggested that the hemolytic capacity of different strains may be related to different clinical presentations in the animal species under study and proposes a method of qualitative measurement of hemolysis in blood agar plates.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caseous lymphadenitis, phospholipase D.

INTRODUCCIÓN

La linfadenitis caseosa (LAC) es una enfermedad infectocontagiosa que disminuye el rendimiento animal, produciendo lesiones abscedativas crónicas, tanto en tejido subcutáneo como en los nódulos linfáticos y órganos internos (3, 4, 10, 14). Es producida por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacteria que infecta a diversas especies animales, siendo los ovinos y caprinos los más afectados, aunque también se encuentra en equinos, bovinos, ciervos, camellos, camélidos sudamericanos y hasta en seres humanos (1, 3, 14).

C. pseudotuberculosis pertenece al género *Corynebacterium*, familia *Actinomycetae*, al igual que los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, constituyendo un grupo muy heterogéneo de bacterias que poseen características comunes en relación a la organización de la pared celular. *C. pseudotuberculosis* se describe como un bacilo pleomórfico (0,5-0,6 μm por 1,0-3,0 μm), inmóvil, Gram positivo, aunque la tinción puede ser irregular en algunos casos, se observan al frotis como una organización típica de “letras chinas” (1, 5).

El microorganismo es anaerobio facultativo, tiene un crecimiento óptimo a una temperatura de 37° C y un pH de 7.0 a 7.2 (1, 5). En la superficie de un medio sólido se puede observar el desarrollo de pequeñas colonias blanquecinas, secas y opacas. Al cultivo en Agar Sangre se observa una zona de β - hemólisis alrededor de la colonia luego de una incubación por 48-72 horas (1, 3, 14, 15). El cultivo de la bacteria en un medio líquido produce un sedimento blanquecino característico (5).

Los principales factores de virulencia de *C. pseudotuberculosis* son la Fosfolipasa D (PLD) y los ácidos micólicos presentes en la pared de la bacteria (3). Los determinantes genéticos de virulencia de *C. pseudotuberculosis* no han sido muy estudiados a pesar del impacto económico que genera esta infección en los rebaños (5).

Los ácidos micólicos le entregan al microorganismo una protección contra el ambiente durante largos períodos de tiempo, además de establecer la capacidad citotóxica de la bacteria (1).

La PLD funciona como una esfingomielinasa específica que cataliza la disociación de la esfingomielina, fosfolípido importante que forma parte constitutiva de la membrana celular (1, 14), produciendo así un incremento en la permeabilidad vascular (11, 17) favoreciendo la diseminación de la bacteria en el individuo (4, 7, 12). Se ha estudiado la PLD como factor de virulencia eliminando o inactivando el gen que la codifica, demostrándose que esas cepas son incapaces de causar los abscesos clásicos de la LAC (1, 8, 12).

La PLD afecta significativamente la viabilidad de los neutrófilos ovinos después de 24 horas de exposición al microorganismo, además reduce la habilidad de estas células de migrar hacia el suero ovino activado, afectando directamente a los lípidos de membrana o a los receptores para factores quimiotácticos que dirigen la migración celular (17). Se ha evidenciado que la exotoxina favorece la sobrevivencia de la bacteria en el organismo ya que le permite escapar de los neutrófilos al alterar su función y causar la muerte de los mismos. Se ha descrito también que activa al complemento por una vía alternativa limitando la opsonización de *C. pseudotuberculosis* (3, 11, 17).

Está comprobado que la PLD además de ser de gran importancia tanto en la patogenicidad como en la supervivencia de la bacteria en el animal, es un potente factor de inmunización y un antígeno útil para el diagnóstico de la enfermedad (1, 3, 5, 14).

Debido a que se han descrito distintos patrones de lesiones entre especies (3), en este estudio se postula que existen diferencias en la capacidad hemolítica entre distintas cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* provenientes de diferentes especies animales, lo que podría estar provocando esta característica en la infección de campo. Por ello, experimentalmente se determinarán diferencias en la capacidad hemolítica de *C. pseudotuberculosis* entre cepas de equinos, caprinos y ovinos mediante métodos cualitativos y cuantitativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

Se trabajó con veintinueve cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, provenientes de ovinos (n=15), caprinos (n=10) y equinos (n=4). Estas cepas fueron previamente identificadas por pruebas bioquímicas y confirmadas por PCR y secuenciación del ADN (5, 13). Estuvieron almacenadas a -80°C en un sistema Microbank®.

2. Cultivo bacteriológico

Cada cepa bacteriana se recuperó en caldo tripticasa de soya (CTS) para verificar su viabilidad y asegurar su pureza. Durante la realización de este trabajo fueron conservadas en tubos con agar tripticasa de soya (ATS) tendido.

3. Identificación del gen *pld*

Para detectar el gen *pld* se utilizó el método de PCR simple descrito por Pacheco y col. (13) para cada una de las cepas. Brevemente, el ADN bacteriano fue obtenido mediante la ruptura de las células utilizando perlas de zirconia-silica en agitación en un equipo Mini Bead Beater® (Cole-Parmer) a 4600 rpm por 90 seg. Este ADN fue purificado mediante “High pure PCR template preparation kit®” (ROCHE) siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla de la reacción y los tiempos de amplificación se realizaron con algunas modificaciones (13). Las amplificaciones fueron efectuadas en volúmenes de 12,5 µL conteniendo: 1,25 µL de buffer PCR 10X, 0,5 µL de MgCl 50 mM, 0,25 µL de dNTPs 10 mM, 1,25 µL de cada uno de los partidores (PLD-F (13) y PLD-R3 (*)), 0,1 µL de Taq polimerasa 5U por µL, 6,9 µL de agua destilada PCR y 1 µL del templado (0,2 µg/µL) a estudiar. Como control positivo se utilizó ADN extraído desde cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas e identificadas previamente en nuestro laboratorio. Como control negativo se utilizó *Streptococcus equi* aislado de un absceso equino con diagnóstico clínico de Gurma.

La reacción consideró los siguientes ciclos: denaturación inicial a 95° C por cinco minutos; treintaicinco ciclos de 95° C por un minuto, 58° C por cuarenta segundos y 68° C por un minuto y medio; extensión final a 68° C por siete minutos.

(*) Comunicación personal, Dr. Patricio Retamal, Marzo 2010.

Finalmente, los amplificadores 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 y se fotografiaron mediante sistema digital.

4. Evaluación de la capacidad hemolítica

Desde los tubos de ATS tendido, las cepas fueron cultivadas en CTS a 37°C por 48 horas. Una vez obtenido el desarrollo los tubos fueron homogenizados en "vortex" y de esta suspensión bacteriana se realizaron diluciones 1:5.000 en suero fisiológico, cultivándose 100 µL de esta dilución en placas que contenían 15 mL de Agar común con un 5% de sangre ovina, esparciendo el contenido con un rastrillo. Las placas fueron cultivadas a 37° C por 96 horas hasta observar colonias aisladas con una hemólisis clara a su alrededor. Las placas se fotografiaron desde una distancia de 20 centímetros para luego medir los diámetros, en milímetros (mm), de cinco colonias y sus respectivos halos de hemólisis. Con estos valores, se obtuvo una razón hemólisis/colonia (rH/C) y se calculó el promedio de las cinco colonias para cada cepa. Con este método se obtuvo una relación de la capacidad hemolítica de cada cepa.

Con el fin de comprobar cuantitativamente la producción de toxina PLD de cada cepa, estas fueron cultivadas en tubos con CTS a 37°C por 48 horas, luego de lo cual se tomó 1 mL. de este cultivo para sembrar matraces de 500 mL. que contenían 100 mL. de medio nutricio Burrell (2) y medio infusión cerebro-corazón (9), ambos enriquecidos con 5% de suero estéril equino. Los matraces fueron cultivados a 37°C por 48 horas en agitación constante, después de lo cual los contenidos fueron centrifugados a 2.000 x g a 4°C durante treinta minutos. Se obtuvieron los sobrenadantes los que fueron filtrados por filtros Minisart® (Sartorius) de 0,20 µm.

Para determinar la capacidad hemolítica de estos sobrenadantes filtrados, se realizó una titulación al doble, en tubos, con volúmenes de 500 µL. agregándose 50 µL. de una suspensión al 5 % de eritrocitos lavados de ovino (9). Esta preparación se mantuvo a 37°C por 24 horas, al cabo de las cuales se determinó el punto final de hemólisis.

5. El análisis de los resultados

Para analizar los resultados y hacer una relación estadística además de comparar la capacidad hemolítica de las cepas, se ocupó un Análisis de Varianza (ANDEVA). Por haber diferencias en la cantidad de muestras por especie se utilizó el método de SNK para comparaciones múltiples (16).

RESULTADOS

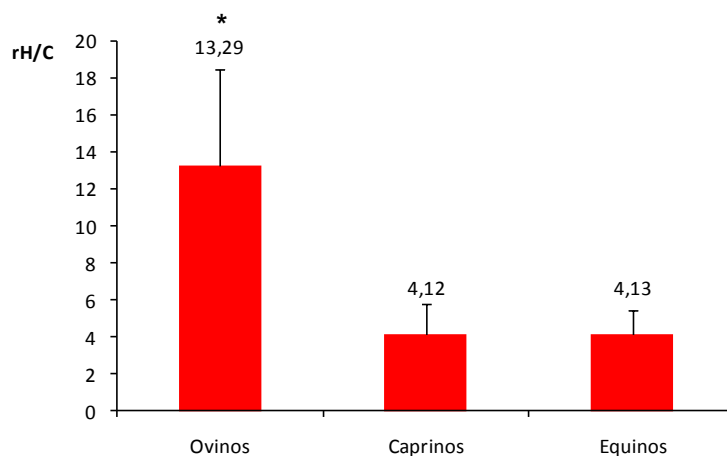
Mediante PCR simple se comprobó la presencia del gen *pld* en todas las cepas estudiadas.

En el **Cuadro 1** y en el **Gráfico 1** se muestran las rH/C de cada cepa estudiada, observándose mayores valores en las cepas provenientes de ovinos. Estos resultados son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$), demostrando que la capacidad hemolítica de las cepas ovinas es mayor en relación a las cepas de caprinos y equinos. Las razones de hemólisis entre cepas provenientes de caprinos y equinos no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Cuadro 1. Capacidad hemolítica de cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas de ovinos (O), caprinos (C) y equinos (E) determinada por la razón hemólisis/colonia (rH/C).

Cepa	rH/C	Cepa	rH/C	Cepa	rH/C
C2	2,3	C12	5,6	O6	10,4
C11	2,6	E19	6	O2	12,3
C4	3	C18	6,3	O78	13,5
C13	3	C16	6,7	O76	14,1
C10	3,1	O73	7,5	O12	17,1
E3	3,1	O3	7,8	O77	18,8
C19	3,3	O72	7,8	O68	20,8
E8	3,5	O4	8,3	O75	21,1
E17	3,9	O15	8,8	O65	21,2
C17	5,3	O20	9,9		

Gráfico 1. Promedio de razones hemólisis/colonia (rH/C) de cepas obtenidas de ovinos (O), caprinos (C) y equinos (E).



(*) $p \leq 0,05$

La evaluación cuantitativa de la producción de toxina a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes cepas demostró que en el medio nutricio de Burrell una sola cepa alcanzó un título hemolítico alto (1/32) y varias de ellas ni siquiera produjeron toxinas detectables por este método como se aprecia en el **Cuadro 2**. Por ello, se probó el medio infusión cerebro-corazón en las cepas de mayor y menor título de cada especie animal obtenidas en el medio nutricio Burrell. Con esto se comprobó que el medio de cultivo infusión cerebro-corazón generó sobrenadantes con mayores títulos hemolíticos como se aprecia en el **Cuadro 3**. En el **Cuadro 3** se muestran las titulaciones realizadas a cada cepa y el grado de hemólisis que se observó en ambos medios de cultivo. Se concluye que en ambos medios de cultivo de la toxina y posteriores titulaciones, no existiría una diferencia estadísticamente significativa entre cepas provenientes de distintas especies animales; pero sí entre los medios de cultivo, aunque los coeficientes de variación de la prueba son muy altos por lo que se presume que son otros factores los que estarían influyendo sobre estas diferencias.

Cuadro 2. Títulos hemolíticos de los sobrenadantes de cultivos de *C. pseudotuberculosis* en medio nutricio de Burrell, obtenidos de diferentes especies animales.

CEPA	O12	O68	O76	C2	C11	C13	E3	E17	E19	O3
BURRELL	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	1/1	1/1	1/2
CEPA	O15	O65	O72	O75	O77	C4	C10	C12	C16	C17
BURRELL	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
CEPA	C18	E8	O4	O6	O78	C19	O73	O20	O2	
BURRELL	1/2	1/2	1/4	1/4	1/4	1/4	1/8	1/16	1/32	

SH= Sin hemólisis.

Cuadro 3. Títulos hemolíticos de sobrenadantes de cultivos de *C. pseudotuberculosis* obtenidos de diferentes especies animales producidos en medio nutricio de Burrell e infusión cerebro-corazón.

Cepas	C-C	BURRELL
O2	1/32	1/32
O20	1/64	1/16
O68	1/8	SH
O73	1/8	1/8
O76	1/16	SH
C10	1/16	1/2
C11	1/32	SH
C13	1/16	SH
E3	1/128	SH
E8	1/32	1/2

SH= Sin hemólisis.

DISCUSIÓN

La fosfolipasa D (PLD) está descrita como uno de los principales factores de virulencia que permiten la diseminación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en los tejidos de los animales infectados (4, 7, 12). En este trabajo se identificó la presencia del gen *pld* en todas las cepas estudiadas, lo que concuerda firmemente con otras publicaciones al respecto (1, 6).

En los cultivos en agar sangre, se logró verificar que las colonias provenientes de cepas ovinas produjeron un halo de hemólisis significativamente mayor que aquellos producidos por los aislados provenientes de caprinos y equinos (**Cuadro 1**). Esto podría relacionarse con la variabilidad en la distribución de las lesiones y tipo de éstas que presentan las diferentes especies animales (3). Otro antecedente de que existen diferencias entre cepas provenientes de diferentes especies animales es que se ha logrado distinguir dos biovars, el biovar *equi* que en su mayoría reduce nitratos a nitritos, es susceptible a la estreptomycinina y que afecta a equinos, y el biovar *ovis* el cual no reduce nitratos, generalmente es estreptomycinina resistente y afecta a pequeños rumiantes (4, 15).

Aunque todas las cepas tienen el gen *pld* no todas generaron actividad hemolítica en medio de cultivo líquido. Esto se demuestra por las diferencias de título e incluso ausencia de títulos hemolíticos de algunas cepas (**Cuadro 2**). La expresión del gen *pld* podría estar influenciada por el medio de cultivo en que se desarrolla la bacteria, lo que se comprobó con títulos hemolíticos mayores en los sobrenadantes de las cepas que fueron cultivadas en el medio

infusión cerebro-corazón. En un estudio realizado por McKean y col. (11) se presume que existen cambios en la expresión del gen y que éstos juegan un rol fundamental en el desenlace de la enfermedad. Se ha establecido que hay distintas señales que modifican la expresión del gen *pld*; la principal es el “shock” térmico (pasar de 37° C a 43° C), que actúa como señal represora, y tanto la alta densidad de cultivos como la replicación intracelular en macrófagos infectados aumentan significativamente la expresión de este gen (11). Se ha descrito además que la enzima necesita iones de calcio y magnesio para su actividad en el organismo (15). Se postula también que la concentración máxima de toxina producida se alcanza a un pH determinado, alrededor de 8 (6); por lo que tenemos una amplia gama de factores que pueden estar influenciando la producción y la actividad de la toxina. Sin embargo, en los procedimientos experimentales de este trabajo hubo control de temperatura y de pH, del ambiente y de los cultivos respectivamente para disminuir las influencias de estos factores sobre los resultados obtenidos, quedando las diferencias como efecto de factores intrínsecos de cada cepa y su especie de procedencia.

Esta información puede servir a futuro para el desarrollo de mejores alternativas de diagnóstico y de prevención, ya que PLD se utiliza normalmente en la producción de vacunas que, aunque no evitan la infección, disminuyen la capacidad de diseminación de la bacteria dentro del organismo, puesto que los anticuerpos producidos son capaces de neutralizar a la toxina, limitando su efecto modificador de la permeabilidad vascular (17).

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que las cepas de *C. pseudotuberculosis* aisladas a partir de lesiones abscedativas de diferentes especies animales poseen el gen de la PLD, pero que sin embargo existen diferencias significativas en la capacidad de producir hemólisis, siendo las cepas provenientes de ovinos aquellas más eficientes. Además, se comprobó que la capacidad hemolítica es mayor en medio de cultivo líquido infusión cerebro-corazón lo que implicaría que según las condiciones *in vitro* se modifican las expresiones del gen o la actividad de la proteína.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto FIV 9102003

BIBLIOGRAFÍA

1. **BAIRD, G; FONTAINE, M. 2007.** *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. J. Comp. Path. 137: 179-210.
2. **BATARCE, P. 1982.** Tesis. "LINFOADENITIS CASEOSA" Diagnóstico serológico por prueba de inmunodifusión en gel de agar. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
3. **BELCHIOR, S; GALLARDO, A; ÁBALOS, A; JODOR, N; JENSEN, O. 2006.** Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Vet. Argentina, 23: 258-278.
4. **BELCHIOR, S; GALLARDO, A; ÁBALOS, A; DÍAZ, Y; ÁLVAREZ, L; CALLEJO, R; PRIETO, M; JODOR, N; JENSEN, O. 2007.** Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. Rev. Argentina Microbiol., 39: 44-46.
5. **DORELLA, F; PACHECO, L; OLIVEIRA, S; MIYOSHI, A; AZEVEDO, V. 2006.** *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbyology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet. Res. 37: 201-218.
6. **DOTY, R; DUNNE, H; HOKANSON, J; REID, J. 1964.** A comparison of toxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the development of a diagnostic skin test for Caseous Lymphadenitis of sheep and goats. Am. J. Vet. Res. 25: 1679-1684.
7. **HODGSON, A; BIRD, P; NISBET, I. 1990.** Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. J. Bact. 172: 1256-1261.
8. **HODGSON, A; KRYWULT, J; CORNER, L; ROTHEL, J; RADFORD, A. 1992.** Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. Infect. Immun. 60: 2900-2905.
9. **HSU, T; RENSHAW, H; LIVINGSTON, C; AUGUSTINE, J; ZINK, D; GAUER, B. 1985.** *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxin: Fatal hemolytic anemia induced in gnotobiotic neonatal small ruminants by parenteral administration of preparations containing exotoxin. Am. J. Vet. Res. 46: 1206-1211.

10. **KURIA, J; MBUTHIA, P; KANG'ETHE, E; WAHOME, R. 2001.** Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Vet. Res. Comm.*, 25: 89-97.
11. **McKEAN, S; DAVIES, J; MOORE, R. 2007.** Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiol.*, 153: 2203-2211.
12. **McNAMARA, P; CUEVAS, W; SONGER, G. 1995.** Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene*, 156: 113-118.
13. **PACHECO, L; PENA, R; CASTRO, T; DORELLA, F; BAHIA, R; CARMINATI, R; FROTA, N; OLIVEIRA, S; MEYER, R; ALVES, F; 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.
14. **RUIZ, J; BARRERA, M; FRIAS, M. 2007.** Linfadenitis caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. *RECVET.* 2: 8.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080807/080707.pdf>
15. **SONGER, G; LIBBY, S; IANDOLO, J; CUEVAS, W. 1990.** Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. *Infec. Immun.*, 58: 131-136.
16. **WOOLSON, R. 1987.** Comparing more than two groups of observations: analysis of variance for comparing groups. *Statistical methods for the analysis of biomedical data.* John Wiley and Sons. Canadá. 314-347.
17. **YOZWIAK, M; SONGER, G. 1993.** Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 392-397.