

Adenitis equina: Detección de portadores de *Streptococcus equi* subsp. *equi*

Bustos, C.P.* , Muñoz, A.J., Di Gennaro, E.E., Rossano, M. y Guida, N.

Cátedra de Enfermedades Infecciosas,
Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.
Chorroarín 280, C1427CWO, Ciudad Autónoma de Bs. As.
*Correo electrónico: carlabustos@fvet.uba.ar

No existe conflicto de intereses.

Palabras clave

Equino, Adenitis, Portador, Streptococcus.

Keywords

Equine, Strangles, Carrier, Streptococcus.

RESUMEN

La adenitis equina es una enfermedad infecto-contagiosa, de curso agudo o subagudo caracterizada por producir linfadenitis purulenta del tracto respiratorio anterior de equinos de hasta dos años de edad principalmente. Su agente causal es *Streptococcus equi* subsp. *equi*, un coco grampositivo, β hemolítico y que pertenece al grupo C de Lancefield. Se trata de un patógeno primario y su detección en cualquier caballo es siempre significativa. Puede sobrevivir por largos períodos en los animales recuperados de la enfermedad o infectados en forma subclínica lo cual determina el estado de portador, "carrier" o persistentemente infectado. Se realizó un estudio para detectar portadores de Adenitis equina mediante hisopados nasofaríngeos de 100 caballos clínicamente sanos ubicados en la Provincia de Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Se realizaron estudios citológicos y bacteriológicos de las muestras, se determinó la capacidad de producir β hemólisis, se detectó el antígeno C de Lancefield y se identificaron las cepas a través de pruebas bioquímicas. Se aislaron 16 cepas de *Streptococcus equi*, identificando a 4 de ellas como *Streptococcus equi* subsp. *equi*. Todos los portadores detectados fueron animales jóvenes alojados a campo. Éste es el primer reporte de detección de carriers de Adenitis equina en nuestro país.

SUMMARY

Equine strangles: Detection of *Streptococcus equi* subsp. *equi* carriers.

Strangles is an acute or subacute infectious disease described as purulent lymphadenitis in the upper respiratory tract in younger horses. *Streptococcus equi* subsp. *Equi*, a Lancefield group C, β hemolytic, gram-positive coccoid bacterium is the causal agent, a primary pathogen and its detection in horses is always significant. *S. equi* can survive for long periods in animals recovered from the disease or after subclinical infection; this fact determines the carrier or persistently infected state. This research was conducted in order to detect carriers of strangles by taking nasopharyngeal swabs samples from 100 clinically healthy horses in Buenos Aires. Samples were also used in cytological and bacteriological studies: the ability to produce β hemolysis was confirmed, Lancefield group C antigen was detected and strains were identified by biochemical tests. Sixteen strains of *Streptococcus equi* were isolated; four of them were classified as *Streptococcus equi* subsp. *equi*. All detected carriers were young animals housed in fields. This is the first report of carriers' detection in Argentina..

Introducción

La adenitis equina (Ae) es una enfermedad infecciosa de curso agudo o subagudo, producida por *Streptococcus equi* subsp. *equi* (See) y caracterizada por provocar linfadenitis purulenta en el tracto respiratorio superior de equinos, principalmente menores de dos años de edad. Se transmite en forma directa a partir de otros equinos, en particular a través del contacto social normal e indirecta, al compartir alojamiento contaminado, fuentes de agua, comida o utensilios para alimentación y otros fomites¹¹. Actúan como fuente de infección los animales aparentemente sanos que están incubando la enfermedad o que son portadores inaparentes del microorganismo en sus vías aéreas superiores^{2,11}. La Ae se manifiesta en una variedad de síndromes clínicos.

La forma clásica posee una alta mortalidad y en ella se produce la tumefacción de los ganglios linfáticos retrofaríngeos y submandibulares con diseminación hemática del agente ("Adenitis bastarda") y extensos efectos metabólicos⁶. La forma atípica de la enfermedad, más leve, es probablemente más común en todo el mundo. Los signos incluyen pirexia, depresión, tos, descarga nasal purulenta, con autolimitación de la abscedación de los ganglios afectados y sus complicaciones.

El agente etiológico puede sobrevivir por largos períodos en los equinos recuperados de la enfermedad o infectados en forma subclínica lo cual determina el estado de portadores, "carriers" o persistentemente infectados². Los estudios epidemiológicos que han sido emprendidos durante los últimos 10 años han establecido un papel significativo del

caballo portador en la epidemiología de la Ae⁶. Al menos un portador se produce en aproximadamente el 50 % de los brotes⁶. Este puede ser una fuente de infección para animales susceptibles y su introducción al ganado puede ser una fuente de nuevos brotes¹². En otros países se han reportado entre el 9 y 44% de portadores utilizando la técnica de PCR⁹. No se encontraron datos de reportes que demuestren la portación de See en equinos de Argentina.

El See es un coco Gram positivo, β hemolítico y que pertenece al grupo C de Lancefield. La bacteria sólo es patógena en caballos y a diferencia de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (Sez), no es un habitante normal de la flora bacteriana del tracto respiratorio⁷. Se trata de un patógeno primario y su detección en cualquier caballo es siempre significativa⁶.

El diagnóstico se basa en el aislamiento microbiológico del agente. El cultivo de hisopados nasales, lavajes nasales o aspirados de pus de los abscesos sigue siendo la "prueba de oro" para la detección de *See*¹¹. La presencia de otros estreptococos beta hemolíticos, especialmente *Sez* puede complicar la interpretación de los cultivos⁶ lo que implica la necesidad de aplicar un protocolo preciso para la detección de animales portadores. Diferenciar las subespecies de *Streptococcus equi* por el aspecto de sus colonias o beta hemólisis es dificultoso y poco certero. La identificación y diferenciación tradicionalmente se basa en sus características fenotípicas, incluidas las propiedades serológicas por el uso de antiseros específicos del grupo C de Lancefield y propiedades bioquímicas tales como fermentación de lactosa, trealosa y sorbitol¹.

El principal objetivo en la profilaxis de la enfermedad es prevenir la exposición de los caballos susceptibles a la bacteria y esto se logra por la identificación de portadores crónicos, el aislamiento de caballos afectados y la desinfección del material contaminado⁷. Estrategias de control pueden ser posibles en algunas condiciones, pero la detección de caballos portadores sigue siendo un obstáculo importante para el control epidemiológico completo⁶.

La hipótesis de trabajo fue que la mucosa retrofaringea de equinos pertenecientes a establecimientos con historia clínica de Ae permanece persistentemente infectada por *See* y el objetivo principal del trabajo fue demostrar la presencia de *See* en muestras obtenidas de hisopados retrofaringeos de equinos clínicamente sanos de la Provincia de Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA).

Materiales y métodos

El Proyecto de Investigación fue evaluado y aprobado por el CICUAL (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

Muestreo

Se analizó un "n" total de 100 equinos clínicamente sanos ubicados en distintas zonas de la Provincia de Buenos Aires y de CABA. El 50% correspondió a animales en training (Studs, clubes, etc.) y el 50% restante a animales de haras dedicados a la producción equina. La selección de los animales de haras se realizó por muestreo aleatorio simple trabajando con un "n" equivalente a un porcentaje de los equinos

de cada establecimiento comprendido entre el 10% y el 15%. Como los animales a box rotan permanentemente se tomaron al azar entre 5 y 10 animales de diferentes studs pertenecientes a hipódromos o clubes hípicas que se encontraban disponibles el día del muestreo.

Se estableció como criterio de inclusión que los animales estuvieran clínicamente sanos y pertenecieran a establecimientos con historia clínico-epidemiológica de Ae y se excluyeron del muestreo aquellos equinos que recibirían tratamiento antibiótico. Se recolectaron datos tales como sexo, edad, pelaje, actividad e historia epidemiológica del establecimiento. Los datos de los animales muestreados se detallan en la tabla 1.

Las muestras se colectaron por pasajes de hisopos (de material plástico de 70 cm de largo con extremo de dacrón, cubiertos con tubo hueco de plástico y esterilizados con óxido de etileno) vía meato ventral de la nariz hacia el nivel de la cavidad orofaríngea y paladar blando hasta causar un acceso de tos en el paciente como se observa en la figura 1. El material removido se sumergió en un tubo con medio de transporte.

Estudios Citológicos: Extendidos de material extraído por hisopado nasofaríngeo se fijaron con alcohol metílico para examen citológico con la Coloración May Grundwald-Giemsa. Se observaron en 15 campos a 40 x, los tipos celulares y la presencia de cocos intra y extracelulares.

Bacteriología:

Cultivo: Las muestras se transportaron al laboratorio a 4°C y se sembraron 4 horas post obtención en agar sangre (agar base sangre adicionado con 10% de sangre equina estéril). Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera enriquecida con CO₂ (método de la vela) durante 24 -48 hs. Las colonias β hemolíticas se recuperaron en Agar tripteína soja.

Estudios morfológicos y tintoriales: se utilizó la tinción de Gram seleccionando a las cepas que microscópicamente coincidieron con las características de las bacterias en estudio: cocos positivos a la Tinción de Gram formando cadenas.

Prueba de la catalasa: se realizó la prueba mediante la adición de H₂O₂ a una suspensión bacteriana. La prueba es positiva ante la formación de burbujas y negativa ante la ausencia de las mismas. Se eligieron las cepas clasificadas como catalasa negativas.

Detección del antígeno C de Lancefield: Se utilizó el test de aglutinación de látex (Oxoid®) para detectar el antígeno C de Lancefield. Se realizó una suspensión bacteriana a la que se le adicionó la enzima de extracción provista por el kit comercial. Se incubó durante 5 minutos a 37°C en baño termostático, se agitó el tubo con la suspensión vigorosamente durante 2-3 segundos y luego se continuó incubando por 5 minutos más. Luego se colocó una gota del extracto obtenido y una gota del reactivo C en el área respectiva de la tarjeta de reacción. Se mezcló y se rotó la tarjeta suavemente. La prueba se consideró positiva ante la aparición de la aglutinación en 30 segundos.

Pruebas bioquímicas: Se identificaron las cepas por capacidades bioquímicas utilizando la galería API 20 STREP (Biomerieux®). La misma se compone de 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas y de fermentación de azúcares que se inoculan con una suspensión densa (superior a 4 de la escala de Mc Farland). La incubación es a 37°C durante 4 y 24 hs. Las reacciones se traducen en variaciones de coloración, espontáneas o reveladas mediante la adición de reactivos. La galería incluye las siguientes pruebas bioquímicas: Voges Proskauer, hidrólisis de ácido hipúrico, hidrólisis de esculina, pirrolidonil arilamilasa, alfa galactosidasa, beta glucuronidasa, beta galactosidasa, fosfatasa alcalina, leucina amino peptidasa y arginina dihidrolasa. Además incluye la fermentación de los siguientes azúcares: ribosa, arabinosa, manitol, sorbitol, lactosa, trehalosa, inulina, rafinosa, almidón y glicógeno. La lectura de estas reacciones se llevó a cabo utilizando una tabla de lectura y la identificación mediante el software de identificación (Biomerieux®).

Resultados

Estudios Citológicos

Se observaron células de Goblet, productoras de mucus (figura 2), células espumosas, con función fagocítica y células de epitelio cúbico/cilíndrico pseudoestratificado cilado. Además se encontraron células polimorfonucleares y cocos de ubicación extracelular (figura 3) en las citologías correspondientes a los animales 58, 66 y 67. Los signos citológicos de irritación e inflamación se evidenciaron por un aumento de las células de goblet junto con el aumento relacionado de mucina en el preparado (figura 4), la presencia de polimorfo-

Tabla 1.
Equinos muestreados y establecimientos de procedencia.

	Actividad	Antecedentes clínico-epidemiológicos	Animal	Sexo	Edad (años)	Pelaje
1	Hipódromo	Vacunación: I, E, Ae (vacuna comercial e inmunógeno autólogo)	1	M	4	Z
			2	M	3	Z
			3	M	4	T
			4	H	2	A
			5	M	2	Z
			6	M	2	Z
			7	H	2	A
			8	H	2	A
			9	H	4	Z
			10	H	4	A
			11	H	3	Z
			12	H	3	Z
			13	H	4	Z
			14	H	3	A
			15	M	3	Z
			16	M	3	A
			17	M	3	T
			18	M	3	A
			19	H	3	A
2	Haras	Vacunación: I, E, Te, Rn, WN	20	H	22	Z
			21	H	11	Z
			22	H	9	A
			23	H	3	A
			24	H	2	A
			25	M	1.5	A
			26	M	0.5	A
3	Hipódromo	Vacunación: I, E. S/D de vacunación contra Ae.	27	M	4	A
			28	H	3	Z
			29	M	2	Z
			30	H	2	Z
			31	M	2	Z
			32	M	2	Z
			33	M	2	Z
			34	M	2	Z
			35	M	3	Z
			36	M	2	A
			37	H	2	A
			38	M	4	Z
			39	M	3	Z
			40	M	5	Z
			41	H	2	Z
			42	M	2	Z
			43	M	2	Z
			44	M	5	Z
			45	H	3	Z
			46	H	3	Z
			47	M	2	Z
			48	M	10	T
			49	M	5	Z

	Actividad	Antecedentes clínico-epidemiológicos	Animal	Sexo	Edad (años)	Pelaje
4	Club Hípico	Vacunación: I, E, Te.	50	M	5	T
			51	H	6	T
			52	M	6	Z
			53	M	3	A
			54	H	4	Z
			55	M	5	T
			56	M	7	A
			57	M	8	Z
5	Haras	Vacunación: I, E, Ae (vacuna comercial e inmunógenos autólogos).	58*	H	3	A
			59	H	4	Z
			60	H	3	Z
			61	H	2	A
			62	H	2	T
			63	H	3	T
			64*	H	2	Z
			65	M	3	A
			66*	M	2	Z
6	Haras	Vacunación: I, E, Ae (vacuna comercial e inmunógenos autólogos).	67*	M	2	Z
			68	H	4	SD
			69	M	0.5	SD
			70	H	4	SD
			71	M	0.5	SD
			72	H	5	SD
			73	M	0.5	SD
			74	H	4	SD
			75	M	0.5	SD
			76	H	5	SD
			77	H	0.5	SD
			78	H	4	SD
			79	M	6	SD
			80	M	15	SD
			81	M	0.5	SD
			82	H	0.5	SD
			83	H	0.5	SD
84	M	0.5	SD			
85	M	0.5	SD			
7	Haras	1 caso de Ae 20 días previos al muestreo (animal 95). Vacunación: I, E, Ae (con inmunógenos autólogos).	86	H	18	A
			87	H	21	Z
			89	H	6	Z
			90	H	12	A
			91	H	16	Z
			92	H	10	Z
			93	H	14	Z
			94	H	12	T
8	Haras	Vacunación: I, E	95	H	6	Z
			96	H	3	SD
			97	M	5	SD
			98	H	6	SD
			99	H	4	SD
			100	M	4	SD

* animales portadores de *Streptococcus equi* subsp. *equi*.

Referencias: I: Influenza, E: Encefalomielititis; Ae: Adenitis equina; Te: tetanos; Rn: Rinoneumonitis; WN: West Nile virus; H: hembra; M: macho; A: alazán; Z: zaino, T: tordillo; S/D: sin datos.

Figura 1.
Metodología de muestreo nasofaríngeo.



Figura 2.
Citología mostrando células de goblet.

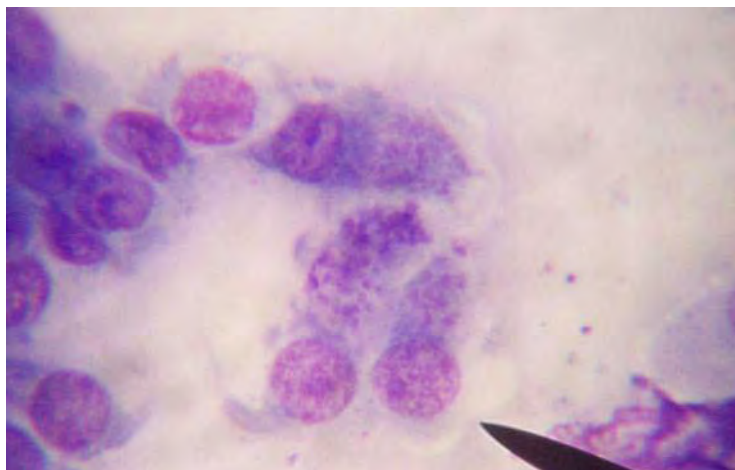


Figura 3.
Citología mostrando cocos dentro de un cluster de epitelio cilíndrico.

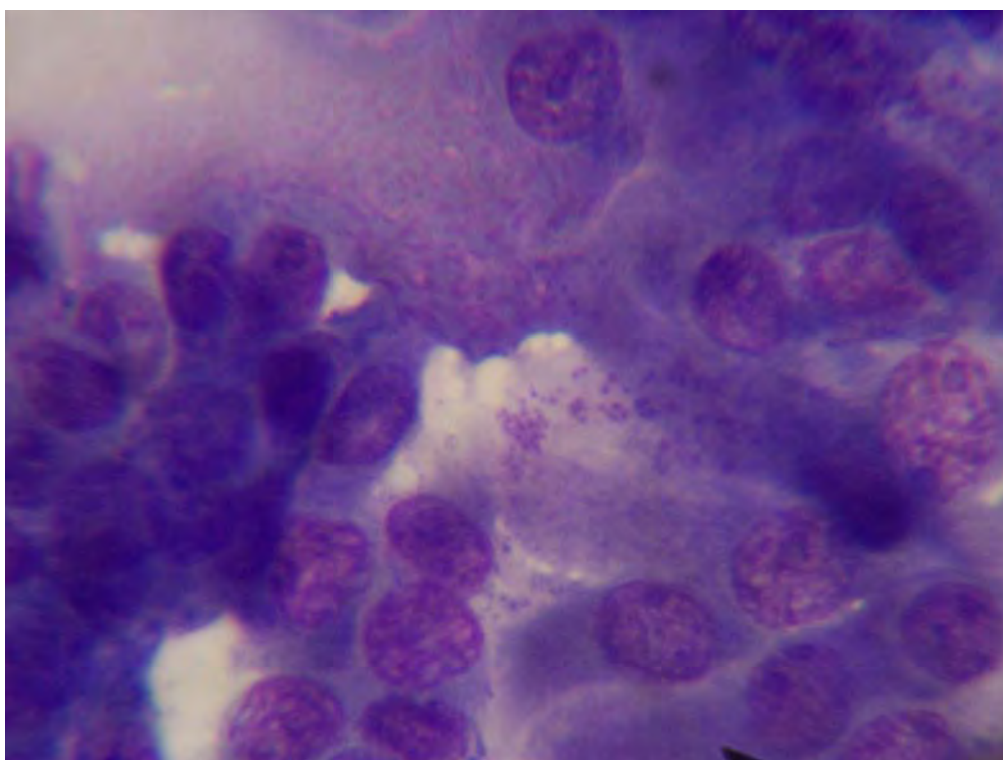


Figura 4.
Citología mostrando polimorfonuclear degenerado y hebra de mucina.

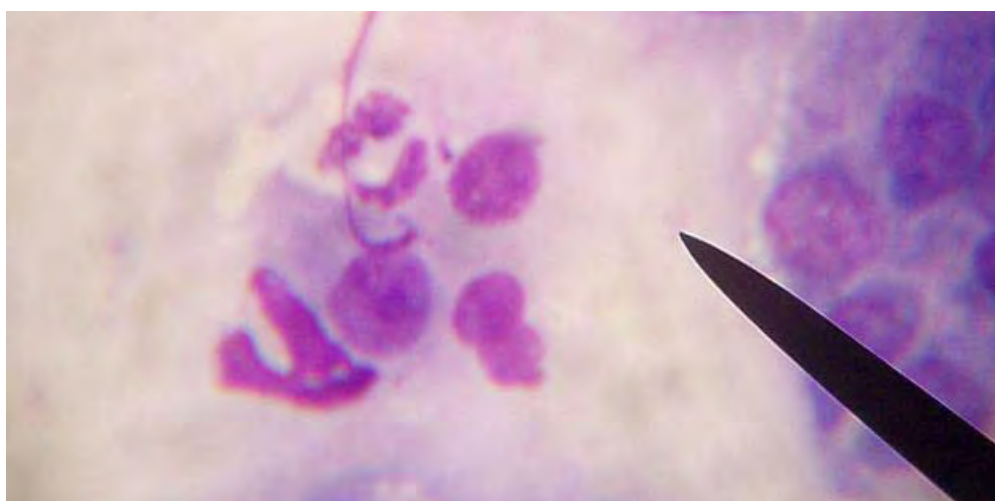


Figura 5.
Colonias β hemolíticas en agar sangre.



Figura 6.
Detección de capacidades bioquímicas mediante el API 20 STREP.



nucleares neutrófilos en un porcentaje mayor al 5 % de las células de la preparación y de los neutrófilos degenerados, fagocíticos o no, son sugerentes de proceso bacteriano.

Bacteriología

A partir del cultivo primario en agar sangre se analizaron las colonias β

hemolíticas (figura 5). Se realizó el estudio tintorial de las mismas, continuando el proceso de identificación de las cepas que microscópicamente correspondían a cocos agrupados en forma de cadenas y positivos a la tinción de Gram. Se detectó el antígeno C de Lancefield mediante el test de aglutinación en 16 de las cepas

catalasa-negativas. Mediante la galería de pruebas bioquímicas API 20 STREP (figura 6) se identificaron 4 cepas de See (identificadas como UBA 58/09, UBA 64/09, UBA 66/09 y UBA 67/09) y 12 cepas de Sez. Se hallaron además cepas de *Pseudomonas sp*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Corynebacterium sp* y *Bacillus sp*.

Discusión

Se analizaron las citologías de muestras de nasofarínge hallando correlación positiva entre los signos citológicos de irritación e inflamación y el aislamiento de *See*. No se encontraron citologías de características inflamatorias en los aislamientos de *Sez*. Esto puede deberse a que *Sez* es un microorganismo habitante normal de mucosas y *See* es patógeno primario de las vías aéreas superiores como lo describen Hewson *et al*⁶. Los microorganismos raras veces son aislados en cultivos puros de los casos de faringitis crónica en caballos y la distinción entre la colonización y la infección es difícil debido a una carencia de conocimiento sobre la flora normal de la faringe de los caballos. Se demostró la presencia de *See* en la mucosa nasofaríngea de equinos clínicamente sanos (portadores de *Ae*) en nuestro país. Dichos hallazgos microbiológicos coinciden con los obtenidos en las investigaciones llevadas a cabo en otros países por Newton *et al*⁸ en una granja, por Fintl *et al*⁷ en una escuela de equitación y por Groenbaek *et al*⁴ en dos rebaños con brotes de *Ae*.

Si bien se trabajó con establecimientos con antecedentes de *Ae*, se desconocen datos precisos sobre las características de los brotes y si los animales muestreados padecieron la enfermedad o estuvieron en contacto con otros equinos enfermos.

Se hallaron otros microorganismos en nasofarínge entre los que se destaca *Sez*. El aislamiento de *Streptococcus* β hemolítico del grupo C de Lancefield implica la necesidad de una correcta y cuidadosa evaluación en el diagnóstico y detección de portadores asintomáticos, ya que *See* y *Sez* sólo pueden diferenciarse por pruebas bioquímicas y PCR⁷. Además no existe inmunidad cruzada entre las subespecies de *Streptococcus equi* a pesar de sus estrechas relaciones filogenéticas⁹.

Conclusiones

Este trabajo constituye el primer reporte en nuestro país de animales portadores de *See*. Se comprobó la portación del agente investigado en el 4 % de los animales en estudio. La totalidad de los aislamientos provino de animales

jóvenes alojados a campo de entre 2 y 3 años de edad que pertenecían al mismo haras. Dicho establecimiento posee antecedentes clínico-epidemiológicos de la enfermedad sin datos precisos de las fechas de los brotes e incluye en su plan sanitario la utilización de vacunas comerciales contra *Ae* e inmunógenos autólogos realizados con los aislamientos de *See* obtenidos en brotes previos. Con respecto al sexo de los portadores detectados el 50% de ellos fueron hembras y el otro 50% machos.

En el 12% de los animales se aisló *Sez*, lo cual evidencia la necesidad de una correcta diferenciación entre ambas subespecies.

La identificación de animales portadores crónicos permitiría un mayor desarrollo de medidas profilácticas y de control de la *Ae*, con la consecuente disminución de brotes, secuelas clínicas y disminución de la performance deportiva que esta enfermedad produce. Se propone realizar investigaciones futuras en las que se trabaje con animales recuperados de la enfermedad para estudiar con mayor profundidad el estado de portador y su importancia epidemiológica en nuestro medio.

Agradecimientos

Agradecemos a los fondos otorgados por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires al subsidiar el Proyecto de Investigación UBACyT 2008-2010: "Patologías infecciosas del equino: Streptococosis, Aspergilosis y Salmonelosis" (V013). A la Cátedra de enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, a su personal no docente y al equipo docente, especialmente a la Vet. María Mesplet por su colaboración.

Bibliografía

1. Alber J, El-Sayed A, Lammler C, Hassan A A, Weiss R, Zschock M. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *J Vet Med B* 2004; 51: 455-458.
2. Bustos C, Muñoz A, Digennaro E, Moras E, Guida N. Aislamiento de *Streptococcus equi equi* en nasofaringe de equinos. Jornadas Hospitalarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, 2009, Buenos Aires, Argentina.
3. Fintl C, Dixon P, Brazil T, Pirie R, McGorum B. Endoscopic and bacteriological findings in a chronic outbreak of strangles. *Vet Rec* 2000; 147: 480-484.
4. Groenbaek L, Angen O, Vigre H, Olsen S. Evaluation of a nested PCR test and bacterial culture of swabs from the nasal passages and from abscesses in relation to diagnosis of *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine Vet J* 2006; 38: 59-63.
5. Hewson J, Viel L. Sampling, microbiology and cytology of the respiratory tract. *Equine Respiratory Diseases*, Leukex (Ed.), Jun 2002. www.ivis.org.
6. Knottenbelt D C. Strangles update. *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*; 2008 Jan 28- Feb 1; Moscow, Russia.
7. Lavoie J P. Les infections bactériennes: la gourmet. 11th Geneva Congress on Equine Medicine and Surgery. 2009, Dec 15-16-17; Ginebra.
8. Newton J, Wood J, Dunn K, DeBrauwer M, Chanter N. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *Vet Rec* 1997; 140: 84-90.
9. Newton J, Verheyen K, Talbot N, Timoney J, Wood J, Lakhani K, Chanter N. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. *Equine Vet J* 2000; 32: 515-526.
10. Prescott J, Timoney J. Could we eradicate strangles in equids. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 377-378.
11. Sellon D, Long M. *Equine Infectious Diseases*. Ed Saunders Elsevier; 2007.
12. Sweeney C, Timoney J, Neweton R, Hines M. Review of *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control and prevention of strangles. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*. 2005, Seattle, Washington, USA. AAEP Proceedings Vol 51.