

## Adenitis equina: aislamiento de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* de caballos con linfadenitis

*Vet. Arg. ? Vol. XXXII ? N° 326 ? Junio 2015.*

\*Bustos, Carla Paola; Marfil, María Jimena; Lanza, Natalia; Muñoz, Alejandra Jimena; Guida, Nora.

### Resumen

La Adenitis equina es una enfermedad infecciosa mundialmente distribuida y producida por *Streptococcus equi* subsp. *equi* que afecta al tracto respiratorio superior de equinos jóvenes causando faringitis y linfadenitis retrofaríngea y submandibular. Un cuadro conocido como Falsa Adenitis por su similitud clínica es ocasionado por *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, una bacteria grampositiva del grupo C de Lancefield y comensal de las mucosas del equino. Es considerado un patógeno oportunista que puede ocasionar enfermedad en el caballo y en otras especies animales, incluyendo el hombre.

El objetivo de este trabajo fue identificar *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* de equinos con linfadenitis submandibular.

Se trabajó con muestras de 6 caballos con signología compatible con Adenitis equina (con cultivo negativo para *Streptococcus equi* subsp. *equi*) mediante la punción de los linfonódulos submandibulares. Se identificó *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* y se determinó expresión capsular y el perfil de sensibilidad antibiótica.

Sólo un aislamiento expresó cápsula fina. Se evidenció un alto porcentaje de sensibilidad antibiótica, con sensibilidad intermedia a la tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol y resistencia a la estreptomina.

Al observar casos aislados con signología clínica leve podemos concluir que en los animales enfermos el agente actuó como patógeno oportunista luego de situaciones estresantes. Destacamos la importancia de la relación huésped ? agente ? ambiente para el desarrollo de enfermedad y el correcto diagnóstico microbiológico para un adecuado control y prevención de la Adenitis equina.

*False Strangles: Isolation of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus from horses with submandibular lymphadenitis.*

### Summary

Strangles is a worldwide infectious disease which is caused by *Streptococcus equi* subsp. *equi*. It affects upper respiratory tract of young horses causing pharyngitis and retropharyngea and submandibular lymphadenitis. A similar disease is called False Strangles and it is produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, a

gram-positive bacterium of group C of Lancefield that is considered a part-mucosal commensal of the horses. It is an opportunistic pathogen of horses and others animals including human.

The aim of this work was identified *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* from horses with submandibular lymphadenitis.

Six horses with clinical signs of Strangles (without isolation of *Streptococcus equi* subsp. *equi*) were sampled by pus aspirated from lymph nodes. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* was identified and capsular expression and antibiotic sensitivity profile were determined.

Small sized of capsule was expressed by only one strain. A high percentage of antibiotic sensitivity was obtained. However, intermediate sensitivity of tetracycline and trimethoprim-sulphamethoxazole and resistance of streptomycin were showed. We could conclude that the bacterium was an opportunistic pathogen in these animals because of mild signology and isolated cases. We stress the importance between host, agent and environment to disease development and microbiology diagnosis to appropriate control and prevention of Strangles.

*Palabras clave: Equinos, Adenitis equina, Falsa Adenitis, linfadenitis, Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

*\*Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.*

*Correspondencia: carlabustos@fvvet.uba.ar*

## Introducción

La Adenitis equina es una enfermedad infecciosa mundialmente distribuida y producida por *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*) que afecta al tracto respiratorio superior de los equinos jóvenes (*Sellon, 2007*). La forma clínica más difundida incluye rinitis, faringitis y linfadenitis de linfonódulos de cabeza y cuello, principalmente de linfonódulos submandibulares y retrofaríngeos cuyos principales signos clínicos son pirexia, decaimiento, descarga nasal, disfagia, disnea y tos (*Knottenbelt, 2008; Sweeney, 2005*).

La forma sistémica o Adenitis bastarda se debe a la distribución linfo-hemática del agente y consecuente formación de abscesos en órganos como pulmón, hígado, bazo e intestinos y desarrollo de poliartrosis, pudiendo dar sintomatología clínica variada según el órgano afectado (*Sellon, 2007; Sweeney, 2005*).

*S. equi* es un coco grampositivo, beta hemolítico, perteneciente al grupo C de Lancefield (*Timoney, 2004*) que actúa como patógeno primario. Los animales recuperados de la enfermedad pueden continuar portando el agente en nasofaringe y bolsas guturales por largos periodos de tiempo, siendo una fuente de infección para otros animales susceptibles por lo que su identificación y tratamiento son de

gran importancia para el manejo de la enfermedad (Sweeney, 2005).

Se ha descrito un cuadro clínico similar a la Adenitis equina denominado "Falsa Adenitis" que es producido por *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) con una sintomatología más leve y sin la típica presentación en brotes (Knottenbelt, 2008). Esta bacteria forma parte de la flora residente de las mucosas nasofaríngea y genital equina y se la asocia a infecciones oportunistas en situaciones de estrés y/o enfermedades virales concomitantes. Es principalmente aislado de equinos sanos pudiendo ocasionar infecciones del tracto respiratorio y genital y además, afectar otras especies mamíferas (Akineden, 2005; Timoney, 2004; Las Heras, 2002;), incluyendo al hombre (\_



Se tomaron muestras de linfonódulos submandibulares de equinos con linfadenitis (Figura 1) pertenecientes a establecimientos ubicados en la provincia de Buenos Aires.

Se realizó la punción de los linfonódulos con aguja 50/10 acoplada a jeringa de 20 ml de capacidad, previa desinfección del área a punzar con yodo povidona. El material purulento se trasladó refrigerado al laboratorio.

*Aislamiento e Identificación:*

Las muestras se cultivaron en agar sangre (agar base sangre suplementado con 5% de sangre de equino adulto) a 37°C y en atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>.

Se detectó la capacidad de hemólisis en agar sangre equino de las bacterias aisladas. Se realizó la coloración de Gram de las cepas, considerando afinidad tintorial, forma y agrupación.

Se les realizó las pruebas bioquímicas para identificación de género: presencia de las enzimas catalasa y oxidasa, tipo de respiración, capacidad de oxidar y/o fermentar la glucosa (OF) y movilidad. A las cepas de *Streptococcus sp.* se les

realizó la prueba de aglutinación de látex (Oxoid®) para la identificación del grupo según el esquema serológico de Rebeca Lancefield y se estudió el perfil bioquímico-metabólico mediante la galería comercial API20 Strep (bioMérieux®).

#### *Sensibilidad antibiótica:*

Por cada aislamiento de *S. zooepidemicus* se realizó un estudio con el método de difusión en placa según Bauer-Kirby y las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010) para *Streptococcus* beta hemolíticos.

Los antibióticos probados fueron: penicilina G (P 10 U), cefotaxime (CTX 30 µg), eritromicina (ERY 15 µg), tetraciclina (TET 30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (TMS 25 µg), cefalexina (CL 30 µg), lincomicina (MY 15 µg), ampicilina sulbactam (AMS 10 µg), azitromicina (ZIT 15 µg), rifampicina (RFA 5 µg), estreptomina (300 µg) y florfenicol (FFC 30 µg), recomendados para grampositivos.

La lectura se realizó mediante la medición de los halos de inhibición a las 18 hs de su siembra a 37°C y posterior comparación con los puntos de corte indicados por el CLSI (2008, 2010).

#### *Tinción negativa para cápsula:*

Se utilizó la tinción negativa con tinta china para los aislamientos de *S. zooepidemicus*. Se incubaron en el medio Todd Hewitt broth (THB) adicionado con 0,2% de extracto de levadura y 10% de suero equino adulto estéril a 37°C y en atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>. Se colocó una gota del cultivo y se mezcló con una gota de una mezcla de tinta china, agua destilada, suero equino adulto y formol. Luego se secar al aire el extendido se fijó con metanol durante 1 minuto. Se tiñó con violeta de genciana al 25% en alcohol etílico durante 5 minutos y se enjuagó con agua por inmersión. Se observaron las coloraciones en microscopio óptico a 100X.

## **Resultados**

#### *Aislamiento e Identificación:*

Se identificó *S. zooepidemicus* en los 6 animales con linfadenitis submandibular.

#### *Sensibilidad Antibiótica:*

Los resultados de los antibiogramas por difusión en disco mostraron sensibilidad intermedia a la TET y el TMS y resistencia a la S en uno de los aislamientos de *S. zooepidemicus*. Los demás aislamientos fueron sensibles a todos los antibióticos testeados.

#### *Tinción negativa para cápsula:*

Solo se evidenció expresión de cápsula fina (Figura 2) en uno de los aislamientos, siendo el resto acapsulados.

Figura 1: Potranca recientemente destetada de 5 meses con linfadenitis submandibular de la que se aisló *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.



Figura 2: Aislamiento con cápsula fina a 100X: se observa la cadena de cocos teñidos con cristal violeta y un halo blanco alrededor. **Discusión.**

Los caballos con sospecha de Adenitis equina de los que se aisló *S. zooepidemicus* presentaban signos clínicos leves como decaimiento y tumefacción de linfonódulos submandibulares. Además, se trataba de casos aislados, coincidentes con el momento del destete o el comienzo del training con lo que los animales se encontraban bajo un estrés que justificaría la infección secundaria por este agente como es descrito por Sellon *et al.* (2007), Knottenbelt (2008) y Lindahl (2013). Por otra parte, una publicación reciente de Lindahl *et al.* (2013) identificó de muestras

nasales de 12 caballos un único clon de *S. zooepidemicus* (ST-24 mediante la técnica de MLST) de un brote con signos consistentes con Adenitis equina sin evidencias de otros patógenos respiratorios. Si bien esto sugeriría que ciertos clones podrían tener un potencial patógeno mayor, aún se requieren más estudios al respecto para comprender la epidemiología.

La presencia de cápsula es un factor de patogenicidad reconocido en otros miembros del género estreptococos. En este trabajo se buscó evidenciar la expresión de cápsula bajo la hipótesis que aquellos aislamientos de enfermos presentarían cápsula como factor de patogenicidad. Sin embargo, esto sólo fue comprobado en uno de los aislamientos que expresó cápsula fina. Esto coincide con la bibliografía internacional que considera a la mayoría de las cepas de *S. zooepidemicus* como acapsuladas (Sellon, 2007; Timoney, 2004). Por otro lado, como sólo trabajamos con una técnica fenotípica, puede ser posible que bajo las condiciones in vitro estudiadas, los aislamientos no expresen cápsula pero que ante otras condiciones si lo hagan.

Los aislamientos mostraron un alto porcentaje de sensibilidad a los antibióticos probados. Si bien un aislamiento resultó resistente a la estreptomina y con sensibilidad intermedia al trimetropim sulfametoxazol y a la tetraciclina, no realizamos la determinación de la concentración inhibitoria mínima para confirmar la resistencia. Además, la penicilina que es el antimicrobiano de elección para este agente (Prescott, 2002), mostró un halo de inhibición de más de 35 mm en los aislamientos.

Destacamos la importancia de la relación huésped ? agente ? ambiente para que se genere enfermedad por patógenos secundarios. Asimismo, el correcto diagnóstico con identificación del agente etiológico de una linfadenitis submandibular o retrofaríngea es de relevancia para la inmediata instauración de medidas profilácticas y de control adecuadas para la enfermedad.

### **Agradecimientos.**

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires por financiar esta investigación con el Proyecto UBACyT 2011-2014: "Infección persistente por bacterias y hongos que afectan la producción equina: aislamiento y caracterización de cepas de *Streptococcus equi* spp en vías respiratorias y mucosa genital; micota asociada y Salmonelosis" (Código 20020100100149). A los veterinarios clínicos que colaboraron con los muestreos. A los docentes y no docentes de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas, FCV, UBA.

### **Bibliografía**

- AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A.; ALBER, J.; EL-SAYED, A.; ESTOEPANGESTIE, A.; LAMMLER, C.; SIEBERT, U. 2005. Phenotypic and genotypic properties of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German North Sea during the phocine distemper outbreak in 2002. *Vet. Microbiol.*, 110(1), 147-152.
- ALBER, J.; EL SAYED, A.; LAMMLER, C.; HASSAN, A.; WEISS, R.; ZSCHOCK, M. 2004. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *J Vet Med B*, 51, 455-458.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bordes-Ben%C3%ADtez%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=16550347?>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bordes-Ben%C3%ADtez%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16550347?>)BORDES-BENÍTEZ A.; SÁNCHEZ-OÑORO M.; SUÁREZ-BORDÓN P.; GARCÍA-ROJAS A.; ALAMO-ANTÚNEZ I.; SÁNCHEZ-MAROTO A, BOLAÑOS-RIVERO, M. 2006. Outbreak of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections on the island of Gran Canaria associated with the consumption of inadequately pasteurized cheese. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006 Apr;25(4):242-6.
- 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)* 2012, 93, 1/2: 28-35.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals, Approved Standard; Third Edition; M31-A3; 2008.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement; M100-S20; 2010.
- KNOTTENBELT D. 2008. Strangles update. Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association; 2008, Jan 28- Feb 1; Moscow, Russia.
- LAS HERAS, A.; VELA, A. I.; FERBÁNDEZ, E.; LEGAZ, E.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. 2002. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(3), 1106-1108.
- LINDAHL S. *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Upper respiratory disease in horses and zoonotic transmisión to humans. 2013. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.  
 LINDAHL S.; ASPÁN A.; BAVERUD, V.; PAILLOT, R.; PRINGLE, J.; RASH, N.; SODERLUND, R.; WALLER, A. 2013. Outbreak of upper respiratory disease in horses caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ST-24. *Vet*

Microbiol 2013 Sep 27;166(1-2):281-5.

-PRESCOTT J.; BAGGOTT J.; WALTER R. Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria. Tercera edición; Editorial Intermédica; 2002.

-SELLON, D; LONG, M. 2007. Equine Infectious Diseases. Ed. ELSEVIER.

-SWEENEY C.; TIMONEY J.; NEWTON R.; HINES, M. 2005. 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.

-TIMONEY, J. F. 2004. The pathogenic equine streptococci. Vet. Res.2004, 35, 397-409.

-WALLER, A.; PAILLOT, R.; TIMONEY J. F. (2011). *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 1231-1240.

---