

Mastitis bovina: variaciones en la detección de β -hemolisina y factor CAMP para la identificación de *Streptococcus agalactiae*.

Graciela Denamiel^{1*}, Tomás Puigdevall¹, Débora Chan² y Elida Gentilini¹

Cátedra de Microbiología¹ y de Bioestadística². Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Chorroarín 280, C1427. CWO, Ciudad Autónoma de Bs. As.

*Correo electrónico: gdenam@fvvet.uba.ar

(Recibido: 15 de octubre 2012; Aceptado: 25 de julio de 2013)

No existen conflictos de interés.

Palabras clave: *Streptococcus*, factor CAMP, β -hemolisina, mastitis bovina.

Keywords: *Streptococcus*, CAMP factor, β -hemolysin, bovine mastitis

RESUMEN

Streptococcus agalactiae es un patógeno productor de mastitis bovina, y como pruebas presuntivas para diferenciar esta especie de otros estreptococos se determina la expresión de β -hemolisina y factor CAMP. La sangre ovina se acepta como suplemento estándar para estas reacciones. Sin embargo, existen variantes según el uso de sangre humana o de animales para la preparación de agar sangre. El objetivo de este trabajo fue comparar sangre bovina y ovina para observar cuál otorga mejor eficiencia para estas pruebas y determinar la prevalencia de β -hemolisina y factor CAMP en *Streptococcus agalactiae* y otras especies productoras de mastitis bovina. Se trabajó con 111 aislamientos de estreptococos y se comparó la eficiencia en la detección de estas toxinas utilizando sangre bovina y ovina. El 82% (33/40) de los *S. agalactiae* fue β -hemolítico y el 90% (36/40) CAMP (+) en agar sangre bovina, mientras que con la sangre ovina fueron positivos en el 45% (18/40) en ambas determinaciones. Todas las especies estudiadas presentaron diferentes proporciones de ambas toxinas, y en *S. agalactiae* y *S. uberis* su evaluación resultó significativa para la identificación. Nosotros sugerimos el uso de sangre bovina para la identificación de los estreptococos provenientes de mastitis bovina.

SUMMARY

Bovine mastitis: variation in the detection of β -hemolysin and CAMP factor in the identification of *Streptococcus agalactiae*.

Streptococcus agalactiae is one of the contagious pathogen of bovine mastitis. Determination of haemolytic activity (β -hemolysin and CAMP factor) are presumptive tests to identify species of streptococci. Although ovine blood is accepted as the standard supplement, there are differences in the use of human or other animal blood. The aim of this study was to compare the use of bovine and ovine blood to evaluate which one provides better performance for the expression of haemolytic reactions and determine the prevalence of β -hemolysin and CAMP factor in *Streptococcus agalactiae* and the other strains of bovine mastitis. The expression for both toxins using ovine and bovine blood was compared in 111 strains of streptococci. With bovine blood, 82% (33/40) of *S. agalactiae* were β -hemolytic and 90% (36/40) CAMP (+), while using ovine blood, only 45% (18/40) were positive for both determinations. In this paper, all species studied had different expression for both toxins. In *S. agalactiae* and *S. uberis* the determination of toxins was significant for their identification. We suggest the use of bovine blood for the identification of streptococci isolated from bovine mastitis.

Introducción

Streptococcus agalactiae, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. uberis* y las especies incluidas en el Grupo *S. bovis* son los cocos catalasa negativo que tradicionalmente se relacionan con la mastitis bovina. Algunas de estas especies producen toxinas formadoras de poros en las membranas celulares, tales como la β -hemolisina y el factor CAMP, que favorecen el ingreso de estas al interior de las células del huésped y permiten la sobrevivencia intracelular

y la diseminación sistémica. Estas toxinas son componentes importantes de la patogenicidad de estas bacterias. Algunas de las pruebas presuntivas para la diferenciación de las especies de *Streptococcus* relacionadas con las mastitis indicadas por *Nacional Mastitis Council*¹⁴ son: la detección de la β -hemolisina y del factor CAMP, características esperables para *S. agalactiae*. Sin embargo, otros géneros microbianos, *Rhodococcus* sp., *Mannheimia haemolytica*, *Listeria monocitogenes*, *Aeromonas* spp. y otras especies de estreptococos

(algunos aislamientos de los grupos A, C, G y *S. uberis*) pueden presentar una o ambas toxinas^{8,10,11,12}, por lo que se necesitan estudios metabólicos complementarios¹³.

Los glóbulos rojos (GR) de todas las especies animales presentan una membrana externa de composición fosfolipídica y, del total de lípidos, el 40-70% está integrado por diferentes fosfolípidos que varían su frecuencia y cantidad según la especie animal. Uno de esos fosfolípidos es la esfingomielina, que se encuentra en alto porcentaje en los GR ovinos

y bovinos. El factor CAMP es una proteína difusible extracelular y termoestable, presente, generalmente, en los estreptococos de grupo B y que, en presencia de la β -lisina (β -hemolisina o esfingomielinasa C) de *Staphylococcus aureus* actúan en conjunto para dar una hemólisis sinérgica. La esfingomielinasa presente en *Staphylococcus aureus* se hidroliza a ceramida y permite que los GR se vuelvan susceptibles al factor CAMP, completando la lisis de estos. Este sinergismo está coordinado entre los dos microorganismos, donde el factor CAMP actúa como sinergista porque se comporta como un adyuvante para la acción de la esfingomielinasa del *Staphylococcus aureus*. Los GR de los mamíferos reaccionan distinto según el contenido de esfingomielina que se halle presente en sus membranas celulares. Los GR de ovinos y bovinos son los que presentan mayor concentración y se supone que son los más susceptibles al factor CAMP^{10,13}. Por otra parte, la β -hemolisina es otra proteína con alto peso molecular que solo se activa cuando está asociada a la superficie de la bacteria o ante la presencia de estabilizadores de alto peso molecular. La β -hemolisina facilita la invasión porque altera las barreras epiteliales y endoteliales de las células del huésped. De las especies de estreptococos relacionadas con la mastitis bovina, *S. agalactiae* es la única especie β -hemolítica mientras que, generalmente, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. uberis* y *S. bovis* son no hemolíticos⁵. Los objetivos de este trabajo fueron: I) comparar el empleo de glóbulos rojos ovinos y bovinos para una mayor eficiencia en la identificación de los estreptococos y, II) conocer la prevalencia de la expresión β -hemolisina y del factor CAMP en *Streptococcus agalactiae* y otras especies productoras de mastitis bovina.

Materiales y métodos

Aislamiento e identificación bacteriana

Ciento once estreptococos aislados de muestras de leche provenientes de bovinos con mastitis clínica y subclínica, pertenecientes al cepario de la Cátedra de Microbiología, fueron utilizados en este estudio. Los aislamientos se identificaron según el esquema de Facklam⁵ y por API Strep (bioMérieux®), y preservaron a -20 °C en caldo tripteína soya (Britania) con agregado del 5% de sangre desfibrinada bovina y 10% de glicerol.

Prueba de CAMP (Christie²)

Se partió de un cultivo de 24 h de *Staphylococcus aureus* en agar sangre (AS) y para cada aislamiento de estreptococo en estudio, de un cultivo de 24 h en caldo Todd-Hewitt (Britania SA). En una placa de AS se realizó, en el centro, un trazado de siembra en línea recta con el *S. aureus* y posteriormente se estrió, de forma perpendicular a esa línea y sin tocarla, a cada cepa de estreptococo.

El ensayo se realizó con AS bovino y AS ovino, y se cultivó a 30 °C, 24 h y en aerobiosis.

Interpretación: una prueba positiva se caracterizó por la presencia de una acentuada zona de hemólisis en forma de flecha en la línea de siembra del estreptococo.

Cepas control

Streptococcus agalactiae ATCC 27956 (control positivo) y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (control negativo).

Determinación de β -hemolisina

Cada aislamiento fue sembrado en dos placas de AS, una con eritrocitos

bovinos y otra con eritrocitos ovinos. Luego de 48 h a 30 °C en jarra con CO₂ se llevaron a temperatura de 4 °C para exacerbar la hemólisis, si se hallara presente.

Estudio estadístico

Para las especies que presentaban un número (n) superior a 30 se utilizó el test de diferencia de proporciones con distribución asintótica normal y el test de Fischer cuando el n fue menor. Para estimar la diferencia de proporciones se utilizaron intervalos de confianza con nivel 95%.

Resultados

Los porcentajes en la expresión de la β -hemolisina y de factor CAMP en AS bovino de las especies de estreptococos aislados de mastitis bovina se observan en la **Tabla I**.

Los porcentajes en la expresión del factor CAMP según la procedencia del tipo de eritrocito se presentan en la **Tabla II**. No se observaron variaciones con respecto a los porcentajes en la expresión de la β -hemolisina, con sangre bovina u ovina. Se halló una diferencia estadísticamente significativa en la expresión del factor CAMP según el tipo de GR en *Streptococcus agalactiae* (P <0,001). El intervalo de confianza de nivel 95% para la diferencia entre las proporciones de reacciones positivas en sangre ovina y bovina estimado fue: [-0,630;-0,270]. Los eritrocitos bovinos favorecen significativamente esta prueba cuando los aislamientos de *S. agalactiae* son de origen bovino. Por definición, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* no es β -hemolítico (a excepción de algunos aislamientos) y es CAMP negativo al igual que *S. bovis*. Aunque algunos aislamientos expresaron estas toxinas, los valores no fueron estadísticamente significativos.

Tabla I.

Porcentaje de la expresión de β -hemolisina y factor CAMP en agar sangre con eritrocitos bovinos, según especies de estreptococos.

| Especies | β -hemolisina | Factor CAMP |
|------------------------|---------------------|-------------|
| <i>S. agalactiae</i> | 82,5 (33/40) | 90 (36/40) |
| <i>S. dysgalactiae</i> | 5,5 (1/18) | 22,2 (4/18) |
| <i>S. uberis</i> | ----- | 50 (7/14) |
| <i>S. bovis</i> | 2,5 (1/39) | 2,5 (1/39) |

Tabla II.

Expresión de factor CAMP con eritrocitos bovinos u ovinos según las especies de estreptococos.

| Especies | Sangre ovina | Sangre bovina |
|------------------------|--------------|---------------|
| <i>S. agalactiae</i> | 45% (18/40) | 90% (36/40) |
| <i>S. dysgalactiae</i> | 16,6% (3/18) | 22,2% (4/18) |
| <i>S. uberis</i> | 14,2% (2/14) | 50% (7/14) |
| <i>S. bovis</i> | 2,5% (1/39) | 2,5% (1/39) |

S. uberis, especie no β -hemolítica, puede expresar el factor CAMP y se encontraron algunos aislamientos positivos. En estos casos, la diferencia entre el uso de AS ovino o bovino arrojó un valor levemente significativo con el test exacto de Fisher (P valor = 0,0691).

Discusión

La presencia de toxinas con propiedad de formar poros en la membrana celular de los eritrocitos se considera uno de los principales factores de patogenicidad de *Streptococcus agalactiae*. Esto se atribuye a que estas toxinas poseen funciones citolíticas que permiten la invasión microbiana y evitan la fagocitosis¹. La sangre ovina es un suplemento que se utiliza, en los laboratorios de diagnóstico de medicina humana, como estándar para la evaluación de las reacciones de hemólisis¹⁷, por lo que las empresas productoras de insumos lo comercializan habitualmente, y también se utiliza en los laboratorios de diagnóstico veterinario. El personal técnico debería conocer las posibles variaciones, en las reacciones hemolíticas, según la procedencia de los GR. Cada especie animal posee GR con diferente morfología y composición química de la membrana celular, características que afectan su susceptibilidad para ser lisados¹⁸.

La posibilidad de utilizar variantes de sangre de distintos animales o incluso del hombre, para la preparación de AS, puede llevar a diferencias que afecten la confiabilidad del método y, por consecuencia, del diagnóstico. Mac Faddin¹³ recomienda el uso de sangre ovina o bovina por el alto contenido de esfingomielina y lecitina en sus membranas. Hassan y col.⁷ informan sobre aislamientos de *S. agalactiae* recuperados de mastitis bovina que son CAMP negativos, mientras que Duarte y col.³ observan, en su estudio, que el 100% de los *Streptococcus agalactiae* era CAMP positivo y que,

utilizando sangre ovina solo el 52,9% presentó actividad β -hemolítica.

En el presente trabajo, así como encontramos cepas negativas a la prueba de CAMP y a la expresión de β -hemolisina, también pudo observarse que con la utilización de sangre bovina se mejoró significativamente la eficiencia para la expresión del factor CAMP.

En estudios recientes realizados con *Streptococcus agalactiae*, ecovar humano, se encontraron aislamientos que manifestaban deficiencias del factor CAMP pero, a pesar de ello, no se observó una disminución de su virulencia sistémica. Esta deficiencia fue compensada por la producción de β -hemolisinas que asumieron el rol compensador del factor CAMP^{8,15}. Respecto a *S. dysgalactiae* subsp.

dysgalactiae, aunque encontramos aislamientos que expresaron estas toxinas, sin respuesta a la definición de esta especie, los valores que se obtuvieron no resultaron estadísticamente significativos.

Streptococcus uberis es otra especie que por definición es CAMP negativo y no hemolítico o α -hemolítico⁴. Sin embargo, algunos estudios informan de aislamientos CAMP positivos, 71,6%¹⁶, 28%⁹ y más recientemente el 25%¹¹ de estos. En el presente estudio, la mitad de las cepas de *S. uberis* fue CAMP positiva, pero en esta especie, presentó bajo nivel de valor estadístico el tipo de GR utilizado.

Facklam⁵ informa que ninguna de las especies incluidas en el Grupo *S. bovis* presenta estas toxinas. Sin embargo, en este trabajo se encontró un aislamiento de *Streptococcus bovis*, identificado como *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, que expresó las dos toxinas; se observaron estos efectos tanto con GR ovinos como bovinos.

Por otra parte, es importante considerar que la reacción de CAMP es temperatura-dependiente, y la prueba debe realizarse entre los 15 y los 30 °C, ya que la máxima velocidad

de acción de esta toxina es a los 30 °C. Las estufas de cultivo suelen estar reguladas a 37 °C, temperatura óptima para el cultivo de la mayoría de los microorganismos. Esta variable debiera ser reconsiderada, si el aislamiento de *Streptococcus agalactiae* resulta CAMP negativo, para optimizar la prueba⁶.

Conclusión

Con el objetivo de lograr una mayor eficiencia en el laboratorio de diagnóstico microbiológico para la identificación de estreptococos aislados de mastitis bovina, consideramos que la utilización de GR bovinos para la preparación de agar sangre podría mejorar significativamente la expresión del factor CAMP.

Agradecimiento

Proyecto UBACyT 20020100100766 (2011-2014) Mastitis bovina.

Bibliografía

1. **Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, Park JM, et al.** The pore-forming toxin β -hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLoS Pathog* 2012; 8(7):e1002812.
2. **Christie R, Atkins NE, Munch-Petersen EA.** Note on a lytic phenomenon shown by Group B Streptococci. *Aust J Exp Biol* 1944; 22:197-200.
3. **Duarte R, Miranda OP, Bellei BC, Brito MAVP, Texeira LM.** Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J Clin Microbiol* 2004; 42(9):4214-4222.
4. **Euzéby JP.** 2011. Disponible en: www.bacteria.cict.fr/.
5. **Facklam R.** What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microb Rev* 2002; 15(4):613-630.
6. **Gase K, Ferretti JJ, Primeaux C, McShan WM.** Identification, cloning, and expression of the CAMP factor gene (*cfa*) of Group A Streptococci. *Infect Immun* 1999; 67(9):4725-4731.
7. **Hassan AA, Akineden O, Lämmle C, Huber-Schlenstedt R.** Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002; 49(5):257-259.
8. **Hensler ME, Quach D, Hsieh CJ, Doran KS, Nizet V.** CAMP factor is not essential for systemic virulence of Group B Streptococcus. *Microb Pathog* 2008; 44:84-88.
9. **Lämmle C.** Biochemical and serological properties of *Streptococcus uberis*. *Zbl Vet (B)* 1991; 38:737-742.
10. **Lang S, Palmer M.** Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP Factor as a pore-forming toxin. *J Biol Chem* 2003; 278 (40):38167-38173.
11. **Lasagno MC, Reinoso EB, Dieser SA, Calvino LF, Buzzola F, Vissio C, et al.** Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine subclinical mastitis in Argentinean dairy farms. *Rev Argent Microbiol* 2011; 43(3):212-217.
12. **Lo CW, Lai YK, Liu YT, Gallo RL, Huang CM.** *Staphylococcus aureus* hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting β -Hemolysin and CAMP factor. *J Invest Dermatol* 2011; 131 (2):401-409.
13. **Mac Faddin JF.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra Ed. Editorial Médica Panamericana. 2006. Capítulo 4. p.33.
14. **Nacional Mastitis Council.** 13 November 2002, Revision date. Laboratory handbook on mastitis bovine, Rev. Ed (on line) National Mastitis Council, Madison, Wis. Disponible en: <http://www.nmconline.org>.
15. **Rajagopal L.** Understanding the regulation of Group B streptococcal virulence factors. *Future Microbiol* 2009; 4 (2):201-221.
16. **Skalka B, Smola J.** Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor a new finding about diffusible exosubstance of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Zentralbl Bakteriol A* 1981; 249:190-194.
17. **Vera HD, Power DA.** **Culture media.** En: *Manual of Clinical Microbiology*, ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980; p. 965-999.
18. **Yeh E, Pinsky BA, Banaei N, Baron EJ.** Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PLoS ONE* 2009; 4(7):1-7, e6141.