

ESTUDIO DE ADHERENCIA E INVASIÓN DE *Corynebacterium Pseudotuberculosis*

STUDY OF ADHESION AND INVASION OF *Corynebacterium Pseudotuberculosis*

VALDIVIA, JD., PADILLA, D., ACOSTA, F., VEGA, J., ROMÁN, L., DÉNIZ, S., ACOSTA, B. y REAL F.

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria.
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Trasmontaña s/n. 35416. Arucas. Gran Canaria.
Email: justodariov@hotmail.com

RESUMEN

La linfadenitis caseosa, enfermedad infectocontagiosa causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, es una enfermedad de distribución mundial con elevada prevalencia en países con ganadería de pequeños rumiantes. Los estudios de adherencia e invasión celular, son usados actualmente para profundizar en diferentes aspectos de la patogenia de las enfermedades infecciosas. El objetivo de este trabajo es determinar tasas de adherencia e invasión celular de varias cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular de origen ovino FLK-BLV-044, lo que nos permitirá conocer diversos aspectos de la colonización, invasión, multiplicación y supervivencia intracelular de este patógeno.

Palabras clave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, invasión, adherencia, línea celular

SUMMARY

Caseous lymphadenitis, contagious disease caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is a worldwide disease with high prevalence in countries with small ruminant livestock. Studies of cell adhesion and invasion, are currently used to deepen various aspects of the pathogenesis of infectious diseases. The aim of this study is to determine rates of cell adhesion and invasion of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine cell line FLK-BLV-044, which allows us to know various aspects of colonization, invasion, intracellular multiplication and survival of this pathogen.

Key Words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, invasion, adherence, cell line.

Introducción

La linfadenitis caseosa, también llamada pseudotuberculosis, apóstema de los ovinos o enfermedad de Preisz-Nocard, es una enfermedad de distribución mundial muy prevalente en países que se ocupan de la ganadería de pequeños rumiantes. Este patógeno no causa importantes pérdidas por mortalidad, pero sí económicas por disminución en la produc-

tividad de carne y lana (Aleman y Spier, 2001). *Corynebacterium pseudotuberculosis* es un microorganismo cosmopolita con un fuerte significado en la patología ovina y caprina (Williamson, 2001).

La entrada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en células no fagocíticas puede ser empleada para evitar ambientes hostiles en los tejidos, para escapar de la fagocitosis, o para



facilitar su diseminación a través de ellas. Debido a esto, la invasión y multiplicación intracelular pueden suponer una ventaja para el patógeno y por tanto, para el avance de la enfermedad. La hipótesis de este trabajo es que *Corynebacterium pseudotuberculosis* puede utilizar este tipo de células para escapar del sistema de vigilancia inmunitario o para establecer un nicho ecológico favorable para una posterior dispersión a otros tejidos. Por tanto, investigar el comportamiento intracelular de esta bacteria, en este modelo celular, puede abrir una vía de investigación muy prolífica en cuanto a nuevos descubrimientos sobre la interacción de patógenos ovinos con su hospedador.

Los mecanismos implicados en la entrada, tráfico, supervivencia intracelular y diseminación de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en tejidos ovinos y caprinos son totalmente desconocidos, al no haber sido estudiados con anterioridad a este estudio, por lo que un mejor conocimiento de la patogénesis de este patógeno en células no fagocíticas y por lo tanto, de las interacciones bacteria-célula en este modelo, puede ayudar al desarrollo de nuevas herramientas para combatir esta enfermedad.

Material y métodos

En los diferentes ensayos de adherencia e invasión usamos un total de 4 cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de diferentes fuentes y orígenes. Para las diferentes experiencias de adherencia e invasión intracelular usamos la línea celular FLK-BLV-044, línea ovi-

na de origen fibroblástico, que fue cultivada en medio MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino descomplementado a 37°C con un 5% de CO₂.

Los ensayos descritos a continuación se basan en la metodología descrita por Isberg y Falkow (1985), así como por Pizarro-Cerdá y cols. (2002). Los diferentes ensayos realizados tratan de averiguar la tasa de invasión y adherencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a la línea celular FLK-BLV-044, para posteriormente determinar el tiempo que necesita *Corynebacterium pseudotuberculosis* para invadir la línea celular, y finalizar analizando la tasa de permanencia/replicación intracelular para determinar si una vez producida la invasión celular, *Corynebacterium pseudotuberculosis* se muere en el interior celular, queda latente, o es capaz de multiplicarse/replicarse activamente en el interior celular.

Resultados

Como observamos en la Figura 1, obtenemos tasas de adherencia desde el 1,84% de la cepa IUSA-1, hasta el 1,30% de la cepa IUSA-02 que es la que presenta la menor tasa de adherencia. Las cepas TARA 1 y CECT-808T presentan tasas de adherencia intermedias, con valores de 1,72% y 1,68%, respectivamente. En la Figura 2 observamos las tasas de invasión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044. La cepa TARA-1 es la que presenta mayor tasa de invasión (0,036%), mientras que la cepa que presenta menor tasa de invasión es la cepa IUSA-2 (0,029%).

Figura 1. Porcentaje de adherencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a la línea celular FLK-BLV-044.

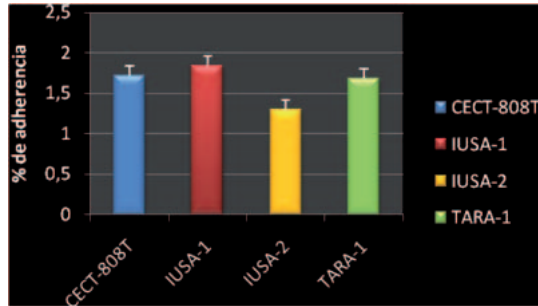
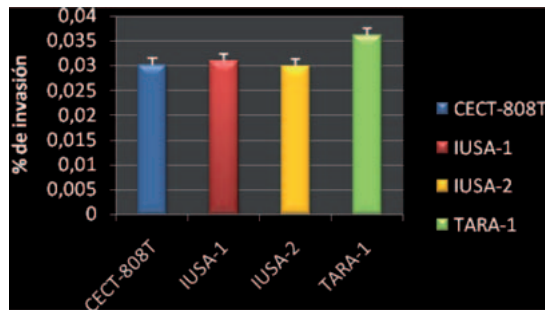


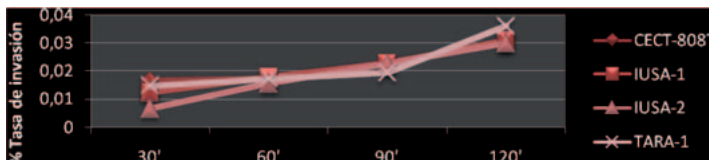
Figura 2. Porcentaje de invasión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044.



Como observamos en la Figura 3, todas las cepas probadas presentan una tendencia creciente de invasión según incrementamos los

tiempos de infección, más acentuada en la cepa TARA a partir de los 90 minutos, respecto a las demás cepas analizadas.

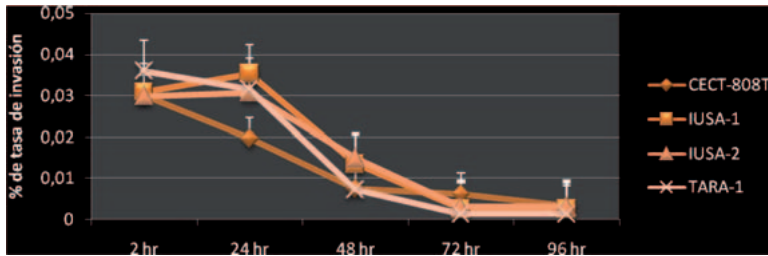
Figura 3. Porcentaje de internalización de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044 a diferentes tiempos de infección.



En la Figura 4 observamos la evolución intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044. El índice de proliferación intracelular (índice IPRO) de la

cepa IUSA-1, relación entre bacterias viables a las 24h y 2h, quedó establecido en 1,16, mientras que el resto de cepas analizadas presentan índices IPRO < 1.

Figura 4. Replicación intracelular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la línea celular FLK-BLV-044.



Discusión

Los estudios de adherencia e invasión celular, tanto *in vivo* como *in vitro*, son usados actualmente para profundizar en diferentes aspectos de la patogenia de las enfermedades infecciosas. La capacidad de ciertas bacterias de invadir células epiteliales es considerado como un importante factor de virulencia de varias bacterias patógenas humanas y animales, como *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* (Zierler y Galán, 1995). Los mecanismos involucrados en la adherencia, invasión y supervivencia intracelular de *C. pseudotuberculosis* en líneas celulares animales son totalmente desconocidos. Nuestros datos demuestran que *C. pseudotuberculosis* es

capaz de invadir células no fagocíticas de ovejitas, y que una vez en su interior, permanece viable durante más de 96 horas.

Conclusiones

Estos hallazgos *in vitro* son de sumo interés, ya que plantean la posibilidad de que *C. pseudotuberculosis* pueden difundirse *in vivo* a través de células no fagocíticas facilitando la difusión de la enfermedad, permitiéndole a su vez, proporcionarle cierto grado de protección frente a las defensas del animal infectado o proporcionar un nicho adecuado para su proliferación, permitiendo también el establecimiento del estado portador de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

- ALEMAN, M., SPIER, S.J., 2001. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In Large Animal Internal Medicine 3^d ed. Edited by Smith P.B. St Louis: Mosby Co. pp 1078-1084.
- ISBERG, R.R., FALKOW, S., 1985. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* 317: 262-264.
- PIZARRO-CERDÁ, J., LECUIT, M., Y COSSART, P. 2002. Measuring and Analysing Invasion of Mammalian Cells by Bacterial Pathogens: The *Listeria monocytogenes* System. *Meth. Microbiol.* 31: 161-176.
- WILLIAMSON, L.H., 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 17: 359-371.
- ZIERLER, M.K. y GALÁN, J.E. 1995. Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein Inv. *Journal of Infection and Immunity.* 63: 4024-4028.