

Evaluación toxicológica de *Pithomyces chartarum* en Argentina.

Licoff, N.¹; Khalloub, P.¹; Diab, S.¹; Cantón, G.²; Odeón, A.² y Odriozola, E.²

1. Residencia Interna en Salud Animal

2. INTA Balcarce. CC 276 Ruta Nacional 226 Km 73,5 - (7620) Balcarce. eodriozola@balcarce.inta.gov.ar

Palabras clave: *Pithomyces chartarum*, esporidesmina, Argentina.

Keywords: *Pithomyces chartarum*, sporidesmin, Argentina.

RESUMEN

La capacidad de *Pithomyces chartarum* de producir esporidesmina ha sido comprobada en diferentes países con sistemas pastoriles. Este hongo también ha sido identificado en Argentina y se lo ha relacionado con cuadros de fotosensibilización secundaria. El diagnóstico se ha basado en el alto conteo de esporas, análisis sanguíneos e histopatológicos, pero no se ha realizado la determinación de esporidesmina en muestras de forraje o en aislamientos del hongo. El objetivo de este estudio es determinar la presencia de cepas de *P. chartarum* productoras de esporidesmina en muestras de pasturas de Argentina. Para el conteo de esporas se usó la técnica descrita por di Menna y para la determinación de cepas productoras de esporidesmina un test de ELISA directo de competición. Se aislaron 101 cepas de *P. chartarum* de muestras de pasturas con cantidades de 5.000 y 1.475.000 esporas por gramo de forraje. La producción de esporas en los cultivos en placa varió entre $1,7 \times 10^6$ y $8,5 \times 10^6$. El 30,7 % de las cepas aisladas evaluadas (31), resultaron positivas a la producción de esporidesmina respuestas.

SUMMARY

Toxicologic analysis of *Pithomyces chartarum* in Argentina.

The capacity of the fungus *Pithomyces chartarum* of producing sporidesmin has been proven in different countries. This fungus has also been identified in Argentina, being related to cases of photosensibilization. The diagnosis was made through spore counts, blood analysis and histopathology, but never by sporidesmin determination. The aims of this study were to determine *P. chartarum* strains which could produce sporidesmin in fodder samples in Argentina. For spore counting the di Menna technique was applied and also a direct c-ELISA test to detect strains producing sporidesmin. Strains of *P. chartarum* (101) were isolated from grass samples; the spore counts from these samples were 5,000 to 1,475,000 spores per gram of forage. The production of spores in plate cultures was between 1.7×10^6 and 8.5×10^6 . Of the isolated strains, 30.7% (31) resulted positive in sporidesmin production.

Introducción

Pithomyces chartarum (Berk & M.A. Curtis) M.B. Ellis, es un hongo saprófito que puede producir la micotoxina esporidesmina A, responsable de causar cuadros de eczema facial en ganado alimentado sobre pasturas.

Es de distribución mundial y ha sido encontrado en Europa, África, Asia, Oceanía y en América³⁻¹³. Determinadas medidas de manejo, tales como el pastoreo intensivo aumentan la posibilidad de ingestión de esporas del *P. chartarum* que desarrollan en el material muerto de la pastura y, con determinadas condiciones climáticas, se multiplican rápidamente aumentando su peligrosidad. Para el desarrollo del hongo se deben producir temperaturas mínimas a nivel del pasto por encima de 12-13°C durante dos, tres o más días, coincidiendo con suficiente humedad (3-4 mm. de lluvia, rocíos fuertes) para mantener la base de la pastura continuamente húmeda. Con la intensificación del pastoreo los animales consumen el

estrato más bajo de la pastura, donde el hongo desarrolla y se intoxican^{2,8}. La esporidesmina A causa daño hepático primario el cual se manifiesta como una fotosensibilización hepatógena (Kelly 1985). En casos severos esto puede llevar a la muerte de animales. La exposición a bajas dosis de la micotoxina produce pérdidas productivas con disminución en la ganancia de peso, mermas en la producción de leche o lana y en los índices reproductivos. Éstas son las razones por las que el eczema facial tiene un impacto económico importante en la industria ganadera en Nueva Zelanda, al igual que en otros países como Australia y Sudáfrica, aunque en menor medida. Estudios realizados por Collin et al.⁴⁻⁵, Collin y Towers⁷, di Menna et al¹⁰ y Halder et al¹² demostraron que la producción de esporidesmina puede variar entre cepas de *P. chartarum* aisladas en la misma región o país. En Nueva Zelanda, Collin et al⁴ analizaron la capacidad de producir esporidesmina de 676 cepas aisladas; a pesar de que esporulaban

masivamente, 2 de ellas no produjeron la toxina. Tres años después el mismo autor analizó cepas provenientes de países de Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) y de Sudamérica (Brasil y Uruguay). En el caso de las cepas de Australia y Nueva Zelanda estudiadas, la producción de esporidesmina fue del 67 y 86%, respectivamente, mientras que las cepas provenientes de Brasil y Uruguay demostraron que sólo el 2 y 28% produjeron la toxina⁵. Algunos trabajos previos indicaban que todas las cepas analizadas provenientes de Nueva Zelanda producían toxina⁷⁻¹⁰. Halder et al¹² examinaron 12 cepas aisladas de pasturas de Texas (EE.UU.) mientras que Collin y Towers⁷ evaluaron 57 cepas de Norte y Sudamérica; ninguno de los estudios encontró cepas productoras de esporidesmina a pesar de que demostraron capacidad de esporular. Un estudio de Sudáfrica indicó que, al menos, el 25% de las 167 cepas aisladas producían cantidades moderadas de toxinas bajo condiciones de laboratorio, mientras que otro estudio

indicó que 3 de cada 10 cepas aisladas de Francia producían niveles detectables de toxina⁷.

El conocimiento de la capacidad de *P. chartarum* de producir esporidesmina en diferentes regiones geográficas, especialmente en países que utilizan grandes áreas pastoriles como recurso forrajero, resulta de gran interés para estimar el impacto económico que esta afección pudiese ocasionar en la producción de leche y carne.

P. chartarum también está presente en Argentina y se lo ha relacionado con fotosensibilización secundaria³. En estos casos, el diagnóstico se basó en el alto conteo de esporas por gramo de materia seca de forraje (epg), determinaciones de bioquímica clínica (enzimas hepáticas) y análisis histopatológico. Sin embargo la determinación de esporidesmina en muestras de forrajes o sobre cepas aisladas no ha sido estudiada localmente hasta ahora.

El propósito de éste estudio fue determinar la presencia de cepas de *P. chartarum* productoras de esporidesmina en pasturas de la región pampeana y mesopotámica de la Argentina.

Materiales y métodos

Las muestras de forraje analizadas fueron tomadas de pastizales naturales y pasturas cultivadas. Se seleccionó material muerto que se encontraba en el estrato bajo de forraje, sobre el suelo. Las muestras fueron obtenidas de diferentes establecimientos de la provincia de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fe, según colaboración de productores y profesionales de cada zona. Para determinar la cantidad de esporas de *P. chartarum* en la pastura las muestras fueron lavadas empleando la técnica descrita por

Collin et al (1998), utilizando diez gramos de forraje seco dentro de una bolsa plástica donde se agregan cien mililitros de agua de red con una gota de detergente común. La muestra de pasto es macerada mediante suaves y repetidos masajes. Para realizar el conteo de esporas propiamente dicho se usó la técnica desarrollada por di Menna⁹, en la cual se toma una alícuota de la suspensión resultante anteriormente, cuantificando en una cámara hemocitométrica de Neubauer.

Luego se realizó el aislamiento de *P. chartarum* por la técnica de cultivo monospórico (Fitzgerald et al¹¹). A tal fin, con el uso de microscopio óptico a 450 aumentos, se eligieron esporas viables. Estas fueron transferidas a uno de los 24 hoyuelos de placas de cultivo celular, conteniendo 1 ml de RCA (Rabbit Chow Agar) con antibióticos (estreptomocina 100 ppm y tetraciclina 50 ppm). Las placas así sembradas fueron incubadas durante 15 días a 22°C bajo luz ultravioleta cercana (350 nm).

Terminada la incubación, las colonias obtenidas fueron utilizadas en la evaluación de la producción de esporidesmina. Para la extracción de dicha micotoxina se agregaron 425 µl de una solución acuosa de Tween-20 (0.05% v/v) a cada hoyuelo y las colonias fueron "lavadas" usando un agitador de placas Titer Plate Shaker (Lab-Line Instruments, Inc.) durante 5 minutos a 700 rpm. Una alícuota de 50 µl del lavado de cada aislamiento fue analizada por medio de la técnica de ELISA directa de competición descrita por Collin et al (1998) para determinar la presencia de esporidesmina. La sensibilidad del test de ELISA utilizado permitió detectar concentraciones de esporidesmina de 1,6 ng/ml o mayores.

Luego del lavado de las colonias el contenido de los hoyuelos (micelio,

esporas y medio de cultivo) fue vaciado dentro del vaso de un mixer "Sorvall Ovni-Mixer Homogenizer" (Du Pont Company, Newton Conn. 06470) al cual se le agregó 10 ml de etanol 50% y 90 ml de agua corriente. El material fue mezclado durante 15 segundos a 4000 rpm y la suspensión resultante fue usada para contar las esporas con la cámara hemocitométrica de Neubauer.

Resultados

El conteo obtenido de las 170 muestras de pastura analizadas varió entre 5.000 y 1.475.000 esporas de *P. chartarum* por gramo de materia seca de forraje.

Se aislaron 101 cepas de *P. chartarum* de las muestras de pasturas de diferentes áreas de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos.

Las cepas analizadas mostraron diferencias tanto en crecimiento como en su habilidad para esporular. La producción de esporas en los cultivos en placa varió entre 1,7 x 10⁶ y 8,5 x 10⁶.

La esporulación de las cepas aisladas fue evaluada para determinar que la cantidad de esporas presentes superara la cantidad mínima requerida para la detección de esporidesmina. Estaba reportado que la producción de esporidesmina podía variar entre 0,6 y 3,5 µg cada 10-6 esporas⁶. Teniendo en cuenta este antecedente se consideró que el test de ELISA empleado detectaría la producción mínima de 2,7 x 10³ esporas.

De las 101 cepas aisladas evaluadas, 31 resultaron positivas a la producción de esporidesmina (30.7% de las muestras).

Cuadro 1. Capacidad de producción de esporidesmina de cepas de *P. chartarum* aisladas en Argentina

Provincia	Partido	Número de Muestras	Número de aislamientos	Esporidesmina A	
				No. de +	% de +
Buenos Aires	9 de Julio	1	3	0	0,0
	Balcarce	4	17	7	41,2
	Bolívar	1	4	0	0,0
	Castelli	1	2	0	0,0
	Chascomús	4	9	9	100,0
	Chivilcoy	1	4	0	0,0
	Coronel Dorrego	1	6	0	0,0
	Maipú	2	8	3	37,5
	General Alvarado	1	3	1	33,3
	Pehuajó	1	4	2	50,0
	Pila	1	1	1	100,0
	Rivadavia	1	1	0	0,0
	Saladillo	1	7	3	42,9
Tres Arroyos	4	17	5	29,4	
Córdoba	Santa María	1	1	0	0,0
	Unión	1	4	0	0,0
E. Ríos	Federación	1	6	0	0,0
Santa Fe	General López	1	4	0	0,0
		Total	101	31	30,7

Discusión

Al igual que en el trabajo de Collin et al⁵ se encontraron valores similares a los descritos en Uruguay. En este estudio se observó que sólo el 30,7% de las cepas fueron capaces de producir esporidesmina. También se detectó una gran variabilidad en la proporción de cepas aisladas productoras de esporidesmina entre las zonas muestreadas, desde un 0% hasta un 100% de cepas positivas.

Teniendo en cuenta que los sistemas productivos de Argentina están basados en el uso de pasturas naturales y cultivadas, la presencia de cepas toxigénicas de éste hongo en las muestras analizadas podría ocasionar importantes cuadros subclínicos con mermas en la producción, además de las pérdidas ya conocidas causadas por casos clínicos de intoxicación.

La proporción de cepas tóxicas encontradas en este trabajo es similar a la reportada por Collin et al⁵ en Uruguay, pero más alta a la

reportada en Brasil, donde la proporción de cepas tóxicas sólo alcanza el 2%. Aunque los porcentajes son mucho más bajos que los reportados en Australia (67%) y Nueva Zelanda (86%), donde esta enfermedad tiene un gran impacto económico.

Previo a este trabajo sólo existía la suposición de la existencia de cepas tóxicas de *P. chartarum* en Argentina. Por primera vez se obtienen evidencias de la presencia de cepas toxigénicas de *P. chartarum* en el país.

La información generada en cuanto a la variabilidad zonal de cepas productoras de esporidesmina deberá ser avalada por futuros trabajos con mayor número de muestras que permitan corroborar estos resultados.

La toxicidad de las pasturas ha sido estimada tradicionalmente a través del conteo de esporas producidas por *P. chartarum*⁸. Esta estimación disminuye su validez teniendo en cuenta la variación de las diferentes

cepas para producir toxina y, además, se debe tener en cuenta que el número de esporas puede variar rápidamente por la lluvia o por la radiación ultravioleta¹⁶.

En Nueva Zelanda, donde el porcentaje de cepas productoras de esporidesmina llega al 90%⁶, las pasturas contaminadas con niveles de 50.000 a 100.000 epg son consideradas peligrosas^{4,13}. De acuerdo con esto, considerando que el porcentaje de cepas tóxicas detectadas en este ensayo llega al 30%, los niveles de riesgo de las pasturas deberían ser superiores a los de esos países para ser consideradas peligrosas.

No obstante si evaluamos la toxicidad de una pastura en base al conteo de esporas se deberá tener presente la gran variación en el porcentaje de cepas tóxicas observadas entre las diferentes zonas. Esta situación hace imprescindible un análisis regional más exhaustivo para disponer de información más segura en cada área geográfica.

Conclusiones

Los aislamientos de *P. chartarum* y su evaluación por medio de un test de ELISA fue empleado por primera vez en el país, generando información sobre la existencia de cepas

productoras de esporidesmina en Argentina, y que el 30% aproximadamente de las cepas analizadas fueron capaces de producir la toxina. Esto toma importancia en la evaluación de la potencial toxicidad de forrajes a la

hora de confirmar un diagnóstico. Los datos generados en este trabajo no pretenden ser concluyentes, ya que esta información deberá ser confirmada mediante la realización de futuros estudios.

Bibliografía

1. **Briggs, L.R.; Towers, N.R.; Molan, P.C.** Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for analysis of Sporidesmin A and its metabolites in ovine urine and bile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994; 42: 2769-2777.
2. **Brook, P.J.** Ecology of the fungus *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M. B. Ellis in pasture in relation to facial eczema disease of sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1963; 6: 147-228.
3. **Carrillo, B.J.; Carcagno, C.; Corbellini, C.N.; Duffy, S.J.; Miquel, J.M.; de Miguel, M.S.** Fotosensibilización por *Pithomyces chartarum* en bovinos en la República Argentina. Primera comunicación. *Revista Investigación Agropecuaria* 1980; 15: 527-538.
4. **Collin, R.G.; Briggs, L.R.; Towers, N.R.** Development and evaluation of an enzyme immunoassay for sporidesmin in pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1995; 38: 297-302.
5. **Collin, R.G.; Odriozola, E.; Towers, N.R.** Sporidesmin production by *Pithomyces chartarum* isolates from Australia, Brazil, New Zealand and Uruguay. *Mycology Research* 1998; 102 (2): 163-166.
6. **Collin, R.G.; Schneider, E.; Briggs, L.; Towers, N.** Development of Immunodiagnostic Field Test for the Detection of the Mycotoxin, Sporidesmin A. *Food and Agricultural Immunology* 1998; 10: 91-104.
7. **Collin, R.G.; Towers, N.R.** First reported isolation from New Zealand pasture of *Pithomyces chartarum* unable to produce sporidesmin. *Mycopathologia* 1995; 130: 37-40.
8. **di Menna, M.E.** *Pithomyces chartarum* spore counts in pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1973; 16: 343-351.
9. **di Menna, M.E.** The wash method of counting *Pithomyces chartarum* spores in pasture. *Proceedings of the Ruakura Farmers Conference* 1-8, 1977.
10. **di Menna, M.E.; Campbell, J.; Mortimer, P.H.** Sporidesmin production and sporulation in *Pithomyces chartarum*. *Journal of General Microbiology* 1970; 61: 87-96.
11. **Fitzgerald, J.M.; Collin, R.G.; Towers, N.R.** Biological control of sporidesmin producing strains of *Pithomyces chartarum* by biocompetitive exclusion. *Letters in Applied Microbiology* 1998; 26: 17-21.
12. **Halder, C.A.; Taber, R.A. ; Camp, B.J.** Absence of Sporidesmin Production by Twelve Texas Isolates of *Pithomyces spp.* *Applied and Environmental Microbiology* 1981; 41: 212-215.
13. **Hansen, D.E.; McCoy, R.D.; Hedstrom, O.R.; Snyder, S.P.; Ballerstedt, P.B.** Photosensitization associated with exposure to *Pithomyces chartarum* in lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1994; 204: 1668-1671.
14. **Nelly, W.R.** The liver and biliary system. In: Jubb K. V. F., Kennedy P.C, Palmer N, eds. *Pathology of domestic animals*. New York: Academic Press Inc. 3rd ed. Vol 2. 288-303. 1985.
15. **Marbrook, J.; Matthews. R.E.F.** Loss of sporidesmin from spores of *Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M. B. Ellis. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1962; 5: 223-236.