

2014

TESIS DOCTORAL

Lilian Pilares Ortega

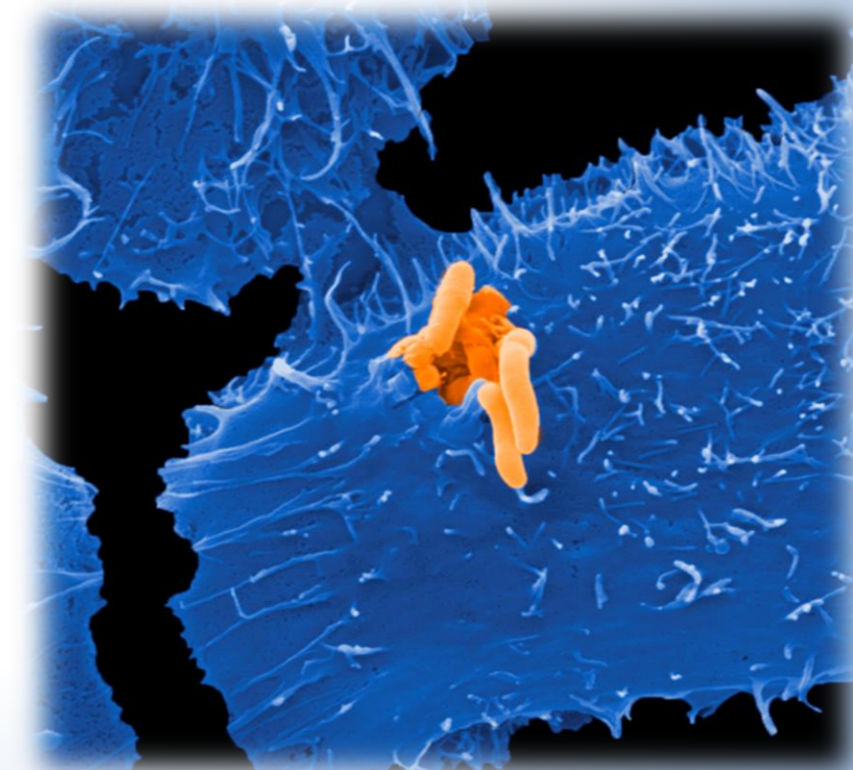


UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
 FACULTAD DE MEDICINA
 DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
 MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

Rhodococcus equi como patógeno humano:
 diagnóstico, interacción con células no
 fagocíticas y sensibilidad a
 antimicrobianos.

Lilian Olga Pilares Ortega



Dirigida por: Jesús Navas Méndez
 José Ramos Vivas

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR



***Rhodococcus equi* como patógeno humano:
diagnóstico, interacción con células no fagocíticas
y sensibilidad a antimicrobianos.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por Lilian Olga Pilares Ortega

Directores:

Jesús Navas Méndez

José Ramos Vivas

Santander, Abril 2014

Jesús Navas Méndez, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular y Responsable del grupo de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Cantabria.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“*Rhodococcus equi* como patógeno humano: diagnóstico, interacción con células no fagocíticas y sensibilidad a antimicrobianos”** que presenta la Licenciada en Biología Lilian Olga Pilares Ortega, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Cantabria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando su presentación como director de la mencionada Tesis Doctoral.

Santander, Abril 2014

Fdo: Jesús Navas Méndez

José Ramos Vivas, Investigador del grupo de Microbiología Clínica y Molecular del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “***Rhodococcus equi* como patógeno humano: diagnóstico, interacción con células no fagocíticas y sensibilidad a antimicrobianos**” que presenta la Licenciada en Biología Lilian Olga Pilares Ortega, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando su presentación como director de la mencionada Tesis Doctoral.

Santander, Abril 2014

Fdo: José Ramos Vivas

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y en el Laboratorio de Microbiología del Instituto IDIVAL bajo la dirección de los doctores Jesús Navas Méndez y José Ramos Vivas, gracias a una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID).

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que han contribuido de muy diversas maneras al desarrollo y culminación de esta Tesis Doctoral.

Empezaré agradeciendo a mis Directores de Tesis, a Jesús Navas con quien inicié el trabajo de investigación en Santander, por su confianza, dedicación y apoyo en todo momento. A José Ramos Vivas, por transmitirme su inquietud, perfeccionamiento, meticulosidad y por su gran calidad humana.

A Jesús Merino, quien hizo posible mi viaje de más de nueve mil kilómetros hasta Santander, que sin sus acertadas gestiones no habría sido posible realizar este viaje, gracias Dr. Merino.

A los profesores y compañeros del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria, especialmente a Manolo, por su empatía y calidez.

A José Manuel Icardo, del Departamento de Anatomía y Biología Celular, por su ayuda con la microscopía electrónica de barrido.

A los compañeros, personal asistencial y administrativo del Hospital de Liencres.

A Luis Martínez, por su confianza y orientaciones en el tema de antimicrobianos. A Carlos Ruiz de Alegría, por su ayuda con el MALDI-TOF y a todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, especialmente a Cristina, Elena, Marta, Alain, Belén, María y Alicia.

A Fidel, por su ayuda con el microscopio y a todos los compañeros del IDIVAL, especialmente a aquellas que más que compañeras son amigas, con quienes he compartido muchos momentos alegres y no tan alegres, divertidos y no tan divertidos, Fer, Raquel y sobre todo a Sara.

Agradesco en realidad a todos los que he conocido durante estos años de tesis y que tal vez no estoy mencionando, porque todos y cada uno de ellos me han aportado mucho en esta trayectoria.

A mis padres, especialmente a mi madre, Olga Ortega, aunque estando lejos fué y es mi gran apoyo. Mamá, muchas gracias por absolutamente todo.

A mi hermano, mi único hermano, Paúl, que aunque él no lo sepa, me impulsa a hacer las cosas bien.

A Fabián, la luz de mis ojos, mi querido Fabián, mi pequeño Fabián, que con una sonrisa suya, es capaz de cambiar todo mi mundo.

A Marcos, aunque a su manera, ha intentado comprenderme y ha intentado apoyarme en esta trayectoria.

Y no debo, terminar sin agradecer de una manera muy especial a aquella persona que conozco hace diecinueve años, porque ha confiado en mí y ha estado a mi lado, aunque no sea físicamente, aún en los momentos más difíciles y porque conoce como es esto de la investigación y de lejos ha estado impulsándome a llevar a cabo con éxito esta y todas las etapas que emprendí hasta ahora.

Sinceramente, ¡Gracias a todos!

A Fabián

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Género <i>Rhodococcus</i>	3
1.2. <i>Rhodococcus equi</i>	4
1.3. <i>Rhodococcus equi</i> como patógeno animal	5
1.4. <i>Rhodococcus equi</i> como patógeno humano	7
1.5. Identificación y caracterización de <i>Rhodococcus equi</i>	9
1.5.1. Métodos fenotípicos de identificación.....	9
1.5.2. Métodos moleculares de identificación genotípica.....	13
1.5.3. Métodos proteómicos de identificación bacteriana	18
1.6. Género <i>Dietzia</i>	25
1.7. Diagnóstico diferencial entre <i>Rhodococcus</i> spp. y <i>Dietzia</i> spp.	26
1.8. Inmunidad frente a <i>Rhodococcus equi</i>	28
1.8.1. Respuesta inmunitaria humoral	29
1.8.2. Respuesta inmunitaria mediada por células.....	29
1.9. Agentes antimicrobianos en el tratamiento de las infecciones causadas por <i>R. equi</i>	34
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. Cepas bacterianas incluidas en este estudio	45
3.2. Caracterización fenotípica	45
3.2.1. Medios de cultivo.....	45
3.2.2. Conservación de las cepas bacterianas	45
3.2.3. Análisis morfológico de las colonias.....	47
3.2.4. Identificación por la prueba API-Coryne.....	48
3.2.5. Reacción CAMP.....	48
3.3. Caracterización genotípica.....	49
3.3.1. Extracción de ADN genómico bacteriano	49
3.3.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	50
3.3.3. Amplificación del gen codificante para el ARNr 16S	50
3.3.4. Amplificación del gen <i>choE</i> específico para <i>R. equi</i>	50
3.3.5. Purificación de productos obtenidos mediante PCR.....	51
3.3.6. Secuenciación del ADN.....	52
3.3.7. Análisis informático.....	52

3.3.8. Tipificación molecular	52
3.4. Caracterización proteómica	52
3.4.1. Preparación de las muestras	52
3.4.2. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF	53
3.5. Interacción de <i>R. equi</i> con células epiteliales A549	54
3.5.1. Líneas celulares	54
3.5.2. Producción de un anticuerpo policlonal frente a <i>R. equi</i>	55
3.5.3. Ensayos de inmunofluorescencia	56
3.5.4. Microscopía confocal	56
3.5.5. Adherencia e invasión de células epiteliales A549	57
3.5.6. Visualización de la entrada de <i>R. equi</i> en células A549 mediante SEM	59
3.5.7. Infecciones bacterianas	60
3.5.8. Infecciones con bacterias muertas	61
3.5.9. Formación de biocapas	62
3.5.10. Detección de citoquinas solubles en sobrenadantes de células infectadas	63
3.5.11. Análisis de la expresión de genes de citoquinas mediante PCR en tiempo real	64
3.5.12. Análisis estadístico	66
3.5.13. Tratamiento con inhibidores	66
3.6. Sensibilidad a los antimicrobianos	66
3.6.1. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias	68
4. RESULTADOS	73
4.1. Identificación basada en características fenotípicas y genotípicas	75
4.2. Identificación mediante proteómica	80
4.3. Interacción de <i>R. equi</i> con células epiteliales A549	82
4.4. Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos de <i>R. equi</i>	101
5. DISCUSIÓN	133
6. CONCLUSIONES	153
7. BIBLIOGRAFÍA	157
8. ANEXOS	189
9. PUBLICACIONES	199

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características morfo-fisiológicas de <i>Rhodococcus equi</i> y <i>Dietzia maris</i>	27
Tabla 2. Cepas incluidas en este estudio.....	47
Tabla 3. Reacciones incluidas en la galería de API-Coryne.....	48
Tabla 4. Cebadores utilizados en las reacciones de amplificación por PCR	51
Tabla 5. Cebadores usados para la RT-PCR	65
Tabla 6. Comités Nacionales del Antibiograma.....	67
Tabla 7. Rangos de dilución de los antimicrobianos.....	70
Tabla 8. Características fenotípicas de 8 aislados diferentes a <i>R. equi</i>	75
Tabla 9. Resultados test CAMP	76
Tabla 10. Test API Coryne	77
Tabla 11. Resultados de la identificación por API CORYNE V3.0	78
Tabla 12. Homologías del gen ARNr 16S de las cepas estudiadas	79
Tabla 13. Comparación del método de colonia directa con el método de extracción para la identificación de <i>Rhodococcus</i> spp. mediante MALDI-TOF MS	81
Tabla 14. Cepas bacterianas usadas en este estudio y sus características TRAVAP.....	83
Tabla 15. Expresión de los genes que codifican para IL-6 e IL-8.....	100
Tabla 16. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de AMX-CLV frente a cepas de <i>R. equi</i>	1022
Tabla 17. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de ampicilina frente a cepas de <i>R. equi</i>	103
Tabla 18. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de cefalotina frente a cepas de <i>R. equi</i>	104
Tabla 19. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de cefepima frente a cepas de <i>R. equi</i>	105
Tabla 20. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de cefotaxima frente a cepas de <i>R. equi</i>	106
Tabla 21. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de cefuroxima frente a cepas de <i>R. equi</i>	107
Tabla 22. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de imipenem frente a cepas de <i>R. equi</i>	108
Tabla 23. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de meropenem frente a cepas de <i>R. equi</i>	109
Tabla 24. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de penicilina frente a cepas de <i>R. equi</i>	110

Tabla 25. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de teicoplanina frente a cepas de <i>R. equi</i>	111
Tabla 26. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de vancomicina frente a cepas de <i>R. equi</i>	112
Tabla 27. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de amicacina frente a cepas de <i>R. equi</i>	113
Tabla 28. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de gentamicina frente a cepas de <i>R. equi</i>	114
Tabla 29. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de tobramicina frente a cepas de <i>R. equi</i>	115
Tabla 30. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de clindamicina frente a cepas de <i>R. equi</i>	116
Tabla 31. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de azitromicina frente a cepas de <i>R. equi</i>	117
Tabla 32. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de claritromicina frente a cepas de <i>R. equi</i> ..	118
Tabla 33. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de eritromicina frente a cepas de <i>R. equi</i>	119
Tabla 34. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de espiramicina frente a cepas de <i>R. equi</i> ...	120
Tabla 35. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de doxiciclina frente a cepas de <i>R. equi</i>	121
Tabla 36. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de tetraciclina frente a cepas de <i>R. equi</i>	122
Tabla 37. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de tigeciclina frente a cepas de <i>R. equi</i>	123
Tabla 38. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de ciprofloxacina frente a cepas de <i>R. equi</i> ..	124
Tabla 39. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de levofloxacina frente a cepas de <i>R. equi</i> ...	125
Tabla 40. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de moxifloxacina frente a cepas de <i>R. equi</i> ..	126
Tabla 41. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de trimetoprim/sulfametoxazol frente a cepas de <i>R. equi</i>	127
Tabla 42. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de cloranfenicol frente a cepas de <i>R. equi</i>	128
Tabla 43. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de daptomicina frente a cepas de <i>R. equi</i>	129
Tabla 44. Rango de CMIs, CMI ₅₀ y CMI ₉₀ de rifampicina frente a cepas de <i>R. equi</i>	130
Tabla 45. Actividad <i>in vitro</i> de 29 antimicrobianos frente a cepas de <i>R. equi</i>	131
Tabla 46. Interpretación de las pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> de 49 cepas de <i>R. equi</i> aisladas de pacientes humanos basado en el documento M100-S22 (CLSI, 2012b) para <i>Staphylococcus</i> spp.	132

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía electrónica de transmisión de <i>R. equi</i> 103S. Pili de <i>R. equi</i> 103S visualizado con microscopía de inmunofluorescencia.	4
Figura 2. Organización de la envoltura celular en <i>Rhodococcus</i>	11
Figura 3. Estructura genética y análisis con Artemis comparison tool (ACT) de la región variable de los plásmidos de virulencia de <i>R. equi</i> pVAPB1593 y pVAPA1037.	17
Figura 4. Esquema de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) y esquema de ionización por electrospray (ESI)	22
Figura 5. Tráfico intracelular de <i>R. equi</i> en macrófagos.	33
Figura 6. Sitios de acción de agentes antimicrobianos.	37
Figura 7. Proceso de la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS.....	54
Figura 8. Proceso del método de microdilución en caldo aplicado a las cepas de estudio.....	70
Figura 9. Figura de la reacción CAMP entre <i>L. ivanovii</i> y las cepas de estudio.....	76
Figura 10. Galería de API Coryne con perfil numérico 1110004.....	77
Figura 11. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S mostrando la relación filogenética entre los aislados identificados como <i>Dietzia</i> y las cepas representativas de <i>Dietzia</i> y <i>R. equi</i>	80
Figura 12. Tinción con CV de las biocapas formadas por la cepa <i>R. equi</i> RE55 en placas de 48 pocillos.....	84
Figura 13. Microfotografía de SEM de las biocapas formadas por <i>R. equi in vitro</i>	84
Figura 14. Autoaglutinación de <i>R. equi</i>	85
Figura 15. Microfotografías de SEM de células A549 infectadas con la cepa <i>R. equi</i> RE55.	86
Figura 16. Microfotografía de SEM de células A549 infectadas con la cepa <i>R. equi</i> RE55.	86
Figura 17. Adherencia e internalización de <i>R. equi</i> en las células A549.....	88
Figura 18. Experimentos de adherencia.	89
Figura 19. Relación entre los niveles de invasión de <i>R. equi</i> y la fase de crecimiento.	89

Figura 20. Relación entre los niveles de invasión de <i>R. equi</i> y el número de bacterias inoculadas.	90
Figura 21. Efecto de la citocalasina D y del frío en la internalización de <i>R. equi</i>	91
Figura 22. Índices de proliferación de <i>R. equi</i> después de 24 horas de infección de las células A549.	91
Figura 23. Células A549 infectadas durante 120 minutos con la cepa <i>R. equi</i> RE55 y mantenidas hasta las 24 horas.	92
Figura 24. Internalización de <i>R. equi</i> en las células A549.	94
Figura 25. Internalización de <i>R. equi</i> en las células A549.	95
Figura 26. Internalización de <i>R. equi</i> en las células A549.	95
Figura 27. Cuantificación de la supervivencia intracelular.	96
Figura 28. Células A549 infectadas con la cepa <i>R. equi</i> RE55 durante 24 horas.	97
Figura 29. Células A549 infectadas con la cepa <i>R. equi</i> RE55 durante 24 horas.	97
Figura 30. Inducción por <i>R. equi</i> de la secreción de IL-6 en las células epiteliales A549.	99
Figura 31. Inducción por <i>R. equi</i> de la producción de IL-8 en las células epiteliales A549.	99
Figura 32. CMI de amoxicilina-ácido clavulánico frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	102
Figura 33. CMI de ampicilina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	103
Figura 34. CMI de cefalotina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	104
Figura 35. CMI de cefepima frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	105
Figura 36. CMI de cefotaxima frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	106
Figura 37. CMI de cefuroxima frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	107
Figura 38. CMI de imipenem frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	108
Figura 39. CMI de meropenem frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	109
Figura 40. CMI de penicilina G frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	110
Figura 41. CMI de teicoplanina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	111
Figura 42. CMI de vancomicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	112

Figura 43. CMI de ampicilina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	113
Figura 44. CMI de gentamicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	114
Figura 45. CMI de tobramicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	115
Figura 46. CMI de clindamicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	116
Figura 47. CMI de azitromicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	117
Figura 48. CMI de claritromicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	118
Figura 49. CMI de eritromicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	119
Figura 50. CMI de espiramicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	120
Figura 51. CMI de doxiciclina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	121
Figura 52. CMI de tetraciclina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	122
Figura 53. CMI de tigeciclina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	123
Figura 54. CMI de ciprofloxacina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	124
Figura 55. CMI de levofloxacina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	125
Figura 56. CMI de moxifloxacina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	126
Figura 57. CMI de trimetoprim/sulfametoxazol frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	127
Figura 58. CMI de cloranfenicol frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	128
Figura 59. CMI de daptomicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	129
Figura 60. CMI de rifampicina frente a 131 cepas de <i>R. equi</i>	130

ABREVIATURAS

γ-caroteno	Gamma caroteno
ADN	Ácido desoxrrribonucleico
ARNr 16S	Ácido ribonucleico ribosomal 16S
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAMP	Test de Christie, Atkins y Munch-Petersen
CAZ-NB	Agar ceftazidima-novobiocina
CETAB	Bromuro de cetil-trimetil amonio
<i>choE</i>	Gen que codifica una colesterol oxidasa
<i>cols.</i>	Colaboradores
DAP	Ácido meso-diaminopimélico
DHBA	Ácido 2,5-dihidroxi-benzoico
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
G+C	Guanina + Citosina
<i>gyrB</i>	Subunidad β de la ADN girasa
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
KNO₃	Test de reducción de nitrato

LB	Luria Bertani
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MALDI-MS	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
ONPG	Orto-nitrofenil- β -galactósido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
<i>rpoB</i>	Subunidad β de la ARN polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SA	Ácido sinapínico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SLD	<i>Soft laser desorption</i>
Th	Helper T-cell
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana



1

Introducción

1.1. Género *Rhodococcus*

El nombre del género "*Rhodococcus*" fue propuesto por primera vez por Zopf en 1891 (Zopf, 1891). Desde su redefinición en 1977, se han descrito nuevas especies y algunas cepas han sido transferidas a otros géneros, o reclasificadas en un nuevo género (Goodfellow y Alderson, 1977 ; Bell *y cols.*, 1998).

El hábitat principal de las bacterias incluidas en el género *Rhodococcus* es el suelo, aunque se han encontrado también en sedimentos marinos, estiércol, intestinos de insectos, plantas, animales y humanos (Goodfellow, 1989; Ivshina *y cols.*, 1994).

Las bacterias del género *Rhodococcus* se incluyen en el grupo de los actinomicetos (del que también forman parte *Mycobacterium* y *Nocardia* entre otros). Son Gram-positivos, aerobios, no móviles y productores de catalasa. Adoptan forma de coco o bacilo según su estado de crecimiento y pueden formar micelios de sustrato que dan lugar a la aparición de extensas hifas, aunque sólo en algunas especies es característico un micelio aéreo visible al microscopio. Las colonias de *Rhodococcus* pueden ser aterciopeladas, rugosas o mucosas, de color rojo, naranja, amarillo o crema. Los componentes mayoritarios del peptidoglicano de la pared celular son el ácido meso-diaminopimélico (DAP), la arabinosa y la galactosa. Además, contienen ácidos micólicos de 32-66 átomos de carbono y su contenido en G+C es del 73%. Existen unas 50 especies de *Rhodococcus* bien caracterizadas (Euzéby, 2013). Algunas, como *Rhodococcus equi*, son patógenos para hombres y animales. Otras especies tienen interés medioambiental y biotecnológico, ya que son capaces de degradar herbicidas y otros compuestos, como hidrocarburos clorados y fenólicos (Parekh *y cols.*, 1994; Finnerty, 1992; Briglia *y cols.*, 1996; Yoon *y cols.*, 2000). Después de *Mycobacterium*, *Rhodococcus* es el género de mayor importancia clínica entre los actinomicetos, ya que se han aislado en

muchos casos asociados a enfermedades en diferentes especies de animales y plantas en todo el mundo (Bell *y cols.*, 1998).

1.2. *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi fue aislado por primera vez por Magnusson en 1923, a partir de pulmones de potros con neumonía piogranulomatosa (Magnusson, 1923) y se denominó *Corynebacterium equi*. Más tarde, esta bacteria fue reclasificada como *Rhodococcus equi* mediante taxonomía molecular (Goodfellow, 1987).

Estas bacterias son organismos aeróbicos, quimiorganotróficos, con metabolismo oxidativo, generalmente capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos como única fuente de carbono (Goodfellow *y cols.*, 1998; Goodfellow y Maldonado, 2006; Jones y Goodfellow, 2010).

R. equi no dispone de flagelos, pero produce un número variable de pili (o fimbrias) (figura 1) de considerable longitud (Yanagawa y Honda, 1976).

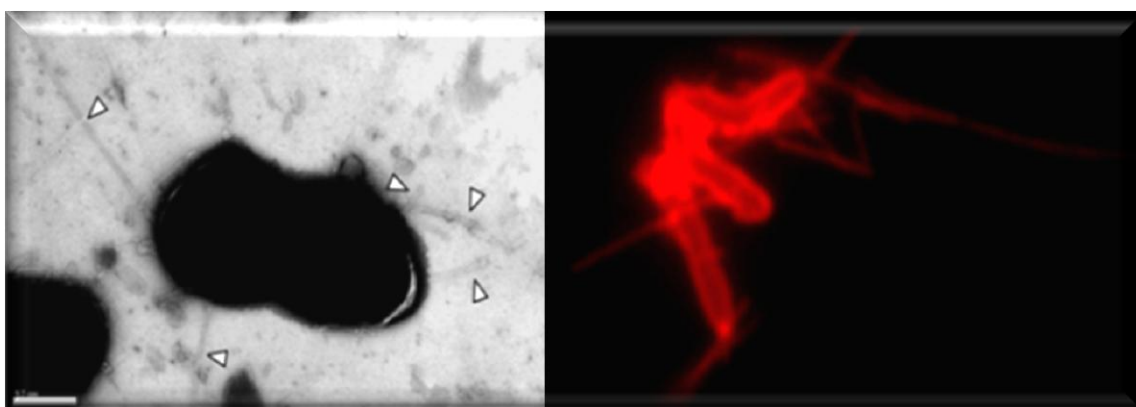


Figura 1. Izquierda: Microfotografía electrónica de transmisión de *R. equi* 103S (las cabezas de flecha indican los pili). Barra=0,5 μ m. Derecha: Pili de *R. equi* 103S visualizado con microscopía de inmunofluorescencia ($\times 1000$) (Letek *y cols.*, 2010).

R. equi crece en un amplio rango de temperaturas (10-40°C), en diferentes medios no selectivos, tales como infusión de cerebro corazón (BHI, '*Brain Heart Infusion*') y Luria Bertani (LB) (Prescott, 1991). Cuando se cultiva durante 24 horas a 37°C en medio no selectivo, las colonias apenas se visualizan. A las 48 horas de incubación, las colonias alcanzan un tamaño de 2-4 mm y han desarrollado su morfología característica: forma de esfera irregular, lisas, semitransparentes, brillantes y mucoides (Prescott, 1991). Después de 4-7 días de incubación, el color rosa asalmonado de las colonias puede intensificarse al aumentar la síntesis del pigmento γ -caroteno, característico de las especies *R. equi*, *R. rubropertinctus*, *R. aichiensis*, *R. sputi*, *R. chubuensis*, *R. obuensis*, *R. bronchialis*, *R. roseus*, *R. rhodochrous*, *R. rhodnii* y *R. terrae* (Ichiyama *y cols.*, 1989; Ashour y Hondalus, 2003).

1.3. *Rhodococcus equi* como patógeno animal

La importancia clínica de *R. equi* radica en su potencial como patógeno animal, principalmente equino, aunque también infecta a otros animales y al hombre. Al vivir en el suelo, *R. equi* puede multiplicarse en el estiércol de los herbívoros, sobre todo durante el verano, en las zonas de clima templado, por lo que se aísla frecuentemente en los animales de pastoreo y su entorno (Prescott, 1987).

La infección es común en potros menores de seis meses de edad, pero ocasional en caballos adultos (Bell *y cols.*, 1998). Coloniza el aparato respiratorio, produciendo una bronconeumonía supurativa que frecuentemente se hace crónica, produciendo abscesos en el pulmón y en los nódulos linfáticos mesentéricos y bronquiales (Prescott, 1991). Las lesiones no tratadas pueden progresar y causar la muerte por asfixia. Además, la infección en los pulmones se puede diseminar y alcanzar los revestimientos intestinales donde produce colitis ulcerativa (Paredes *y cols.*, 2000; Reuss *y cols.*, 2009; Arnold y Chaffin, 2012).

Otras infecciones extra- pulmonares menos comunes causadas por *R. equi* incluyen pericarditis, endocarditis, celulitis, dermatitis, abscesos subcutáneos, linfadenopatía periférica, empiema de las bolsas guturales, pleuritis, sinusitis, linfangitis ulcerosa, miositis, estomatitis, piometra y onfalitis (Reuss *y cols.*, 2009; Janicek *y cols.*, 2006). También se ha aislado *R. equi* ocasionalmente de yeguas infértiles y fetos abortados (Fitzgerald y Yamini, 1995; Szeredi *y cols.*, 2006; Zink *y cols.*, 1986).

Los primeros síntomas clínicos que presentan a menudo los animales sólo consisten en una fiebre leve, tos ocasional, o un ligero aumento de la frecuencia respiratoria que pueden no ser evidentes. Si la neumonía progresa, los signos clínicos más evidentes que se manifiestan incluyen tos (71%), fiebre (68%), letargo (53%), y aumento del esfuerzo respiratorio (43%) (Chaffin *y cols.*, 2011). Un porcentaje menor de los potros afectados presentan una forma subaguda de la enfermedad, con un mal pronóstico a pesar de recibir el tratamiento adecuado. Estos potros pueden morir o comúnmente presentar insuficiencia respiratoria aguda con fiebre alta sin signos previos (Vázquez-Boland *y cols.*, 2013).

R. equi también puede causar enfermedad en otros animales, tales como cerdos, en los que ocasiona principalmente linfadenitis granulomatosa, pero el papel de *R. equi* en esta enfermedad no está claro, ya que también se puede aislar en un 3-5 % de cerdos aparentemente sanos. Además los estudios de infección experimental en cerdos no han logrado reproducir esta linfadenitis granulomatosa (Komijn *y cols.*, 2007; Makrai *y cols.*, 2005; Madarame *y cols.*, 1998; Takai *y cols.*, 1996). También se ha aislado esta bacteria de ganglios linfáticos y mediastínicos en el ganado vacuno, y en un estudio realizado en un matadero en Irlanda entre 1997 y 1998 se determinó que el 4% de los granulomas de los ganglios linfáticos examinados bacteriológicamente contenían *R. equi* (Flynn *y cols.*, 2001). Además, ha sido aislado de ganado vacuno con bronconeumonías, mastitis, metritis,

linfangitis ulcerosa y artritis séptica (Prescott, 1991). En cabras, *R. equi* tiene tendencia a causar abscesos hepáticos con bronconeumonía concurrente, o abscesos pulmonares (Tkachuk-Saad *y cols.*, 1998), aunque también se observan infecciones diseminadas (Jeckel *y cols.*, 2011). En camélidos se observa una forma sistémica grave con neumonía necrotizante y supurativa y múltiples abscesos caseosos en los ganglios linfáticos del mediastino, hígado y bazo (Hong y Donahue, 1995; Kinne *y cols.*, 2011). En perros y gatos se ha aislado *R. equi* de casos de neumonía, así como de infecciones de heridas, abscesos subcutáneos, vaginitis, hepatitis, osteomielitis y miositis (Takai *y cols.*, 2003).

1.4. *Rhodococcus equi* como patógeno humano

R. equi es reconocido como un patógeno oportunista en pacientes trasplantados y en personas que reciben tratamiento inmunosupresor (Arya *y cols.*, 2004). La infección en humanos por *R. equi* fue descrita por primera vez en 1967 en un hombre de 29 años que recibía tratamiento con medicamentos inmunosupresores (Golub *y cols.*, 1967). En los pacientes inmunosuprimidos, las infecciones por *R. equi* se localizan principalmente en los pulmones, causando neumonía cavitaria (Torres-Tortosa *y cols.*, 2003). La infección también puede causar bacteriemia, artritis séptica, abscesos en órganos (se han descrito varios episodios de absceso cerebral), afectar a heridas e incluso al tracto urinario (Prescott, 1991; McNeil y Brown, 1994).

El rol de esta bacteria como patógeno humano ha sido fundamentalmente asociado a casos de individuos inmunodeprimidos, especialmente aquellos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y que presentan el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Bell *y cols.*, 1998; Weinstock y Brown, 2002; Godet *y cols.*, 2012; Perez-Silvestre *y cols.*, 2010; Torres-Tortosa *y cols.*, 2003;

Watanabe *y cols.*, 2000; Donisi *y cols.*, 1996). En estos individuos la infección se presenta como una neumonía similar a la ocasionada por la tuberculosis (Takai *y cols.*, 1994; Muntaner *y cols.*, 1997; Godet *y cols.*, 2012).

Los síntomas habituales son fiebre, tos y dolor de pecho. La aparición de estos síntomas significa que la infección es seria y a menudo puede llegar a ser fatal (Harvey y Sunstrum, 1991). Incluso en los casos en los que se diagnosticó y se inició el tratamiento antibiótico con rapidez, las tasas de mortalidad en pacientes con SIDA alcanzaron el 55% (About *y cols.*, 1996). Estudios recientes demuestran que el diagnóstico rápido, el inicio temprano del tratamiento antirretroviral y el tratamiento antimicrobiano conjunto son eficaces para controlar la infección y mejorar el pronóstico (Topino *y cols.*, 2010).

También se ha señalado a *R. equi* como causante de bacteriemias con diseminación hacia varias partes del cuerpo. Al Akhrass y colaboradores, en un estudio retrospectivo, publicaron que las bacteriemias por *R. equi* en pacientes con cáncer estaban asociadas a la colonización del catéter venoso central y a la formación de biocapas microbianas en la superficie de los catéteres de poliuretano (Al Akhrass *y cols.*, 2012).

Las infecciones por *R. equi* ocurren raramente en individuos con el sistema inmunitario normal (Arlotti *y cols.*, 1996; Harvey y Sunstrum, 1991; Kedlaya *y cols.*, 2001; Weinstock y Brown, 2002; Gabriels *y cols.*, 2006; Torres-Tortosa y cols., 2003). El índice de mortalidad en pacientes inmunocompetentes es aproximadamente del 11% frente al 40-55% de los pacientes infectados por el VIH (Arlotti *y cols.*, 1996; Harvey y Sunstrum, 1991; Kedlaya *y cols.*, 2001).

Los posibles mecanismos de infección en humanos son: la exposición a suelos contaminados, la inoculación en heridas o mucosas, por ingestión y paso a través del tracto digestivo, o la exposición a

animales domésticos infectados, tales como caballos y cerdos (Hondalus, 1997; Weinstock y Brown, 2002; Topino *y cols.*, 2010; Yamshchikov *y cols.*, 2010).

1.5. Identificación y caracterización de *Rhodococcus equi*

1.5.1. Métodos fenotípicos de identificación

R. equi, como la mayoría de los actinomicetos nocardiformes, es de crecimiento relativamente lento. Por ello, es de gran interés disponer de métodos que nos permitan identificarlo en el menor tiempo posible.

Las pruebas fenotípicas que se suelen utilizar para identificar *R. equi* están basadas en la observación de las características morfológicas de las colonias, en el crecimiento diferencial según el medio de cultivo empleado y en el resultado de la tinción de Gram, junto con la descomposición de algunos sustratos específicos, tales como adenina, xantina, caseína, hipoxantina, testosterona, tirosina y urea, entre otros (Biehle *y cols.*, 1996).

Características morfológicas

La evaluación inicial de la morfología en las placas de cultivo primario tiene mucha importancia, debido a que las características clave de una colonia incluyen su tamaño, pigmentación, forma, aspecto de su superficie, cambios morfológicos como resultado del crecimiento y un olor característico, datos que pueden ayudar a la identificación preliminar (Forbes *y cols.*, 2009).

Muchos de estos criterios son subjetivos y los términos calificativos y descriptivos utilizados pueden variar. Aunque es importante la determinación cuidadosa del aspecto de la colonia, no se debe confiar totalmente en la morfología para su primera identificación ya que las

colonias de una especie bacteriana con frecuencia presentan características casi indistinguibles de las de muchas otras especies.

El aislamiento de *R. equi* puede efectuarse en la mayoría de medios de cultivo no selectivos. Sin embargo, con el objeto de eliminar la flora bacteriana acompañante, pueden emplearse medios selectivos como el agar colistina-ácido nalidíxico, agar ceftazidima-novobiocina con suplemento opcional de anisomicina, agar fenil-etanol, o el medio líquido TNAP, que está compuesto por caldo tripticasa-soja, penicilina G, cicloheximida, telurito potásico y ácido nalidíxico. Otros medios son el agar FTO, que incorpora Tween 80, extracto de levadura y nitrofurano, a una base de agar tripticasa soja; y el agar NANAT, que consiste en un agar base suplementado con novobiocina, cicloheximida y telurito potásico. Sin embargo, se ha descrito que estos medios pueden inhibir parcialmente el crecimiento del microorganismo, siendo entre estos el agar ceftazidima-novobiocina (CAZ-NB) el menos inhibitorio de todos ellos (Bermejo, 2001). En agar sangre forma colonias redondas, irregulares y mucosas.

El estudio de los constituyentes mayoritarios de la pared celular de los actinomicetos tiene una importancia taxonómica considerable. El componente fundamental característico de este grupo son los ácidos micólicos (figura 2). Los ácidos micólicos (3-hidroxi-ácidos grasos con un sustituyente alifático de cadena moderadamente larga en la posición 2), son constituyentes únicos y característicos de la pared celular de los géneros *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Tsukamurella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Skermania* y *Williamsia*. Los ácidos micólicos presentan diferentes longitudes, un número variable de dobles enlaces y grupos funcionales, dependiendo de las especies o del género (Baba *y cols.*, 1997, Nishiuchi *y cols.*, 1999).

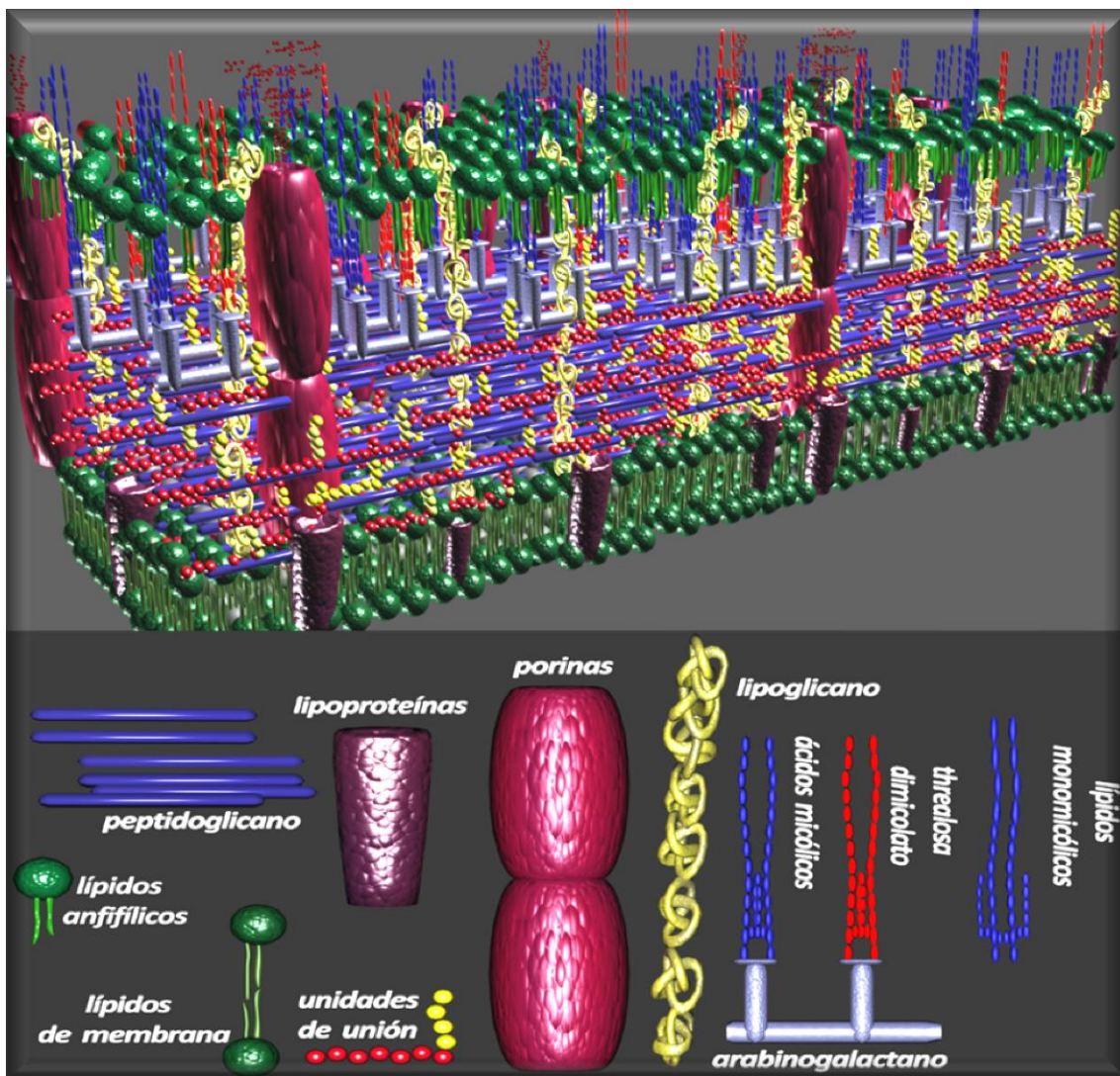


Figura 2. Organización de la envoltura celular en *Rhodococcus*: adaptación de la representación esquemática del modelo propuesto por Sutcliffe (Sutcliffe, 1998).

Identificación basada en pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las especies bacterianas. Algunas de estas pruebas son técnicamente rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y el resultado se obtiene entre unos segundos y varias horas después. Otras pruebas requieren una incubación de 18 a 48 horas para conocer su resultado.

R. equi es poco reactivo desde el punto de vista bioquímico. Es catalasa y ureasa positivo, oxidasa negativo y no fermentador de carbohidratos (Prescott, 1991).

R. equi también produce un factor citolítico que podría estar involucrado en la virulencia. La actividad de este "factor equi" es fácilmente detectable en agar sangre, bajo la forma de una reacción de hemólisis sinérgica (Reacción CAMP) con bacterias productoras de esfingomielinasa, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* o *Listeria ivanovii*, y se usa como un marcador específico para la identificación presuntiva rápida de *R. equi* (Ladrón y cols., 2003; Navas y cols., 2001; Prescott, 1991).

Sistemas comerciales multipuebas

Los sistemas comerciales multipuebas son de gran ayuda en Microbiología por su rapidez, fiabilidad y la gran cantidad de pruebas bioquímicas que se pueden realizar en poco tiempo. La empresa BioMérieux ofrece distintos sistemas para identificar microorganismos, algunos de los cuales se han utilizado frecuentemente en la identificación de actinomicetos nocardiformes. El sistema API Coryne, basado en la fermentación de carbohidratos, está diseñado para corinebacterias y en su base de datos incluye a *Rhodococcus equi*. El sistema API ZYM, que está basado en actividades enzimáticas, no está diseñado para ningún grupo de microorganismos específico, pero ha sido ampliamente utilizado también para caracterizar actinomicetos nocardiformes (Boiron y Provost, 1990; Chun y cols., 1997; Godreuil y cols., 2003; Soddell y Seviour, 1994).

Para evaluar la utilización de fuentes de carbono, se utilizan principalmente los sistemas API ID 32C y API 20C AUX. El sistema API ID 32C diseñado originariamente para levaduras, incluye más substratos que el API 20C AUX por lo que ha sido utilizado para caracterizar

también actinomicetos nocardioformes de interés clínico (Muir y Pritchard, 1997).

En el mercado existen otras galerías multiprueba como las descritas anteriormente, pero cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos dispensados en diferentes concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y el antibiograma del microorganismo. La inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, incorporándose los datos obtenidos a una base de datos que proporciona la identificación del microorganismo con alta fiabilidad. Algunos de los sistemas comerciales en paneles disponibles en el mercado son: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix y MicroLog.

1.5.2. Métodos moleculares de identificación genotípica

Se basan en análisis del ADN y proporcionan resultados más fiables y reproducibles que los métodos convencionales. Uno de los más utilizados es la amplificación del ADN por PCR, que se puede realizar directamente sobre la muestra si los cebadores son específicos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1971 Kleppe y colaboradores sentaron las bases para "copiar" *in vitro* ácidos nucleicos, realizando una síntesis extensiva del ADN catalizada por ADN polimerasas durante la reparación de la replicación (Kleppe *y cols.*, 1971). Pero fue K. Mullis (científico de la compañía Cetus) quien en 1983 desarrolló un proceso de amplificación *in vitro* a partir de oligonucleótidos sintéticos, patentando la técnica en 1987. En 1991, la empresa Hoffmann La Roche adquirió la patente y en 1993, Mullis recibió el Premio Nobel de Química.

La PCR es un proceso de amplificación enzimática *in vitro* de ADN, iniciada por unos fragmentos cortos de ADN llamados iniciadores o cebadores (primers). Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. Cada ciclo está dividido temporalmente en tres fases térmicas: desnaturalización de la doble cadena de ADN, acoplamiento o unión de los cebadores y polimerización mediante la adición de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato) por una polimerasa.

Los productos de la PCR, llamados amplicones, se detectan normalmente mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizan mediante luz ultravioleta. Debido a su sencillez, sensibilidad y rapidez, su uso en laboratorios clínicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección de patógenos.

El proceso de PCR se ha automatizado, permitiendo además la cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real. En la **técnica conocida como "Real-Time PCR" se monitoriza la obtención de los productos de amplificación tras cada ciclo, por lo que no es necesario su análisis posterior.**

Se han utilizado una amplia variedad de genes como dianas moleculares para estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador principal y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación precisa (Clarridge, 2004). Sin embargo, en otras circunstancias, debido a la gran similitud de los genes ARNr 16S entre determinados géneros bacterianos, o a un reciente cambio en su asignación taxonómica, no es posible realizar una identificación a nivel de especie o de género utilizando el ARNr 16S. En estos casos, podemos recurrir a otros genes diana para realizar la asignación de especie.

El ARNr 16S (*rrs*)

El ARN ribosomal 16S es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. De distribución universal, es un componente crítico en la función celular bacteriana. El ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. La secuencia del gen ARNr 16S tiene aproximadamente 1.500 pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas (Bou *y cols.*, 2011).

ARNr 16S-23S y ARNr 23S

También se han utilizado otras zonas del ARNr para la identificación y estudio de relaciones filogenéticas. Entre ellas las regiones del espacio intergénico del ARNr 16S-23S. Estas regiones se presentan en un número variable en función del número de operones ARNr o alelos *rrn*. Las regiones del espacio intergénico presentan un tamaño variable entre las diferentes especies (entre 60 pb en *Thermoproteus tenax* y 1529 pb en *Bartonella elizabethae*). Este polimorfismo en el tamaño también se presenta en cepas pertenecientes a una misma especie, como sucede en *Staphylococcus aureus* (303-551 pb) y *Haemophilus influenzae* (478-723 pb). El elevado grado de diversidad observado en diferentes géneros, especies y cepas constituye la base para su utilización en identificación, filogenia y/o tipificación (Gürtler y Stanisich, 1996).

***rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa)**

La ARN polimerasa es una enzima imprescindible en el proceso de transcripción y constituye la diana final de las diferentes rutas que controlan la expresión génica en los organismos vivos. En bacterias, es responsable de la síntesis del ARNm, ARNr y ARNt. La parte central de la ARN polimerasa (400 kDa) está compuesta de 5 subunidades: el dímero α_2 , β , β' y ω . La subunidad β , codificada por el gen *rpoB*, es el principal

responsable de la actividad catalítica de la ARN polimerasa. Una circunstancia favorable del análisis del gen *rpoB* es su aplicabilidad como instrumento de genotipificación y de filogenia. Este hecho es consecuencia de que las sustituciones nucleotídicas que se producen son silentes (afectan a la tercera posición del codón), y a que por su función como gen básico, probablemente no esté sometido a transferencia horizontal. La secuencia de una parte (300-750 pb) del gen *rpoB* es suficiente para la identificación de la mayoría de los aislamientos clínicos, mientras que para describir nuevas especies es necesario secuenciar el gen completo. El gen *rpoB* constituye uno de los pocos genes candidatos útiles en la identificación bacteriana durante los análisis taxonómicos y filogenéticos de cepas de origen humano, animal y ambiental. El gen *rpoB* permite la identificación a nivel de género, especie y en ocasiones a nivel de subespecie (Karah *y cols.*, 2011).

***gyrB* (subunidad β de la ADN girasa)**

Es el gen codificante de la subunidad β de la ADN girasa o topoisomerasa II y está implicado en la replicación del ADN bacteriano. De distribución universal, la presencia en monocopia de *gyrB* permite la discriminación e identificación de especies estrechamente relacionadas, pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido-lácticas. Es un marcador de gran utilidad en la sistemática bacteriana, al presentar una tasa de sustituciones sinónimas o silentes que se estima en al menos cuatro veces mayor que la del ARNr 16S.

Además de los genes anteriormente mencionados, para la identificación y clasificación de *Rhodococcus equi* se utiliza:

choE

Esta PCR se basa en la amplificación de un fragmento del gen *choE*, que codifica una colesterol oxidasa. El amplicón es de 959 pb y es

específico para *R. equi*. Es un ensayo rápido y fiable para identificar cepas de *R. equi* provenientes de cualquier origen (Ladrón y cols., 2003).

Métodos de genotipado

TRAVAP

Este sistema de tipificación de *R. equi* está basado en 3 marcadores genéticos plasmídicos: el primero de ellos es el gen *traA*, que es una región conservada que codifica proteínas para la transferencia conjugativa, el gen *vapA*, que se encuentra en el plásmido de virulencia (figura 3), asociado a cepas aisladas de caballos y el gen *vapB*, que forma parte de un plásmido típicamente asociado a cepas de origen porcino. Este esquema clasifica los aislados de *R. equi* en 4 categorías: *traA*⁺/*vapA*⁺*B*⁻, *traA*⁺/*vapA*⁻*B*⁺, *traA*⁺/*vapAB*⁻ y *traA*⁻/*vapAB*⁻ (Ocampo-Sosa y cols., 2007).

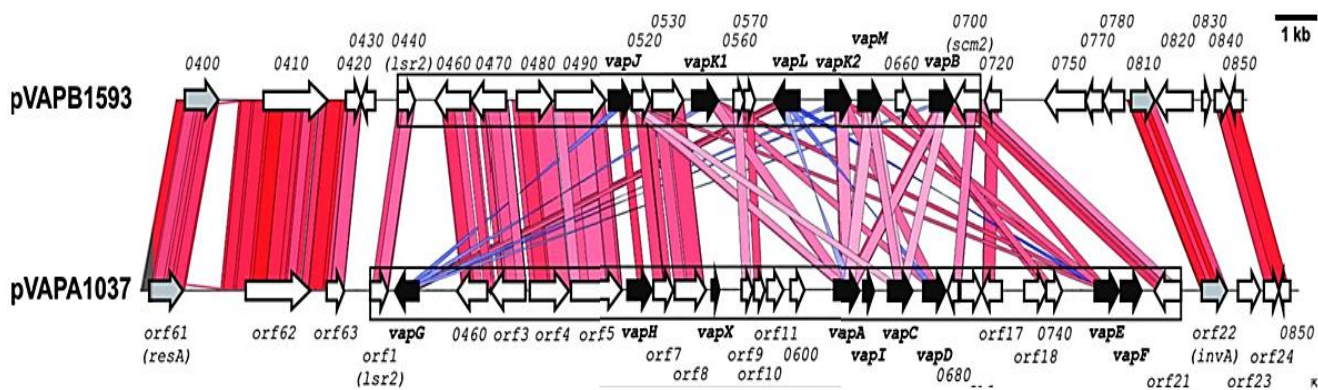


Figura 3. Estructura genética y análisis con Artemis comparison tool (ACT) de la región variable de los plásmidos de virulencia de *R. equi* pVAPB1593 y pVAPA1037. Los genes *vap* asociados a la virulencia se muestran en negro (Letek y cols., 2008).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) fue utilizada por primera vez por Schwartz y Cantor en 1984. La PFGE es el método más usado para la tipificación molecular y vigilancia epidemiológica, y se basa en la fragmentación del genoma bacteriano por restricción enzimática y la posterior separación de los fragmentos, mediante una electroforesis multidireccional. Esta técnica es más resolutive que la electroforesis unidireccional convencional (Tenover *y cols.*, 1995).

Mediante esta técnica se llevó a cabo un estudio genético de poblaciones en la que se tipificó una colección global de más de 1000 aislados de *R. equi* de distintos orígenes geográficos (25 países) y de distintas fuentes (caballos, humanos, porcinos, bovinos, pequeños rumiantes, perro, gato y suelo). Los resultados revelaron un alto nivel de variabilidad genética, pero rastros de un mismo núcleo genético fueron evidentes en todas las cepas, lo que indica que *R. equi* es genéticamente homogéneo y evolucionó mediante la diversificación clonal (Vázquez-Boland *y cols.*, 2008).

1.5.3. Métodos proteómicos de identificación bacteriana

La proteómica es el estudio del conjunto de proteínas (proteoma) expresadas por un genoma. Las técnicas más utilizadas en proteómica se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica ideada a principios del siglo XX. Durante muchos años las aplicaciones de esta técnica se vieron limitadas a compuestos de bajo peso molecular, termoestables y fácilmente volatilizables. En la década de los 70 se describen los primeros experimentos con éxito donde las moléculas termolábiles eran transformadas sin descomposición alguna y en un único paso en iones gaseosos. Estas técnicas de volatilización/ionización

se denominan “técnicas de desorción”. En estos casos el analito no volátil depositado sobre una superficie metálica en condiciones de alto vacío, es bombardeado con un haz de átomos neutros acelerados, o con un haz de átomos iónicos acelerados, o es expuesto a la acción de un fuerte campo eléctrico que induce su volatilización/ionización por efecto túnel, o es expuesto a la acción de un plasma o a la acción de un láser. Si bien estos métodos de ionización ampliaron el uso de la técnica a moléculas termolábiles y a macromoléculas, en la práctica solo podía aplicarse al análisis de compuestos de peso molecular por debajo de 700-800 Da. La introducción de nuevos métodos de ionización, que no requieren de la volatilización previa de la muestra fue el elemento principal que permitió la extensión de la espectrometría de masas al campo de las biomoléculas (Bou *y cols.*, 2011).

Estas técnicas de ionización suave posibilitan la ionización de las grandes biomoléculas como proteínas y péptidos conservándolas intactas, transfiriéndolas a la fase gaseosa y haciéndolas así accesibles al análisis por espectrometría de masas (Abonnenc *y cols.*, 2010).

Las dos técnicas de ionización suave frecuentemente utilizadas en la investigación proteómica son: la ionización por electrospray (ESI '*Electrospray Ionization*'), establecida y aplicada con éxito por Fenn en 1984 (Yamashita y Fenn, 1984), y la ionización/desorción con láser asistida por matriz (MALDI '*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*') introducido por Karas, Hillenkamp y Tanaka, entre 1985 y 1987 (Karas *y cols.*, 1985; Tanaka *y cols.*, 1988).

El proceso MALDI se muestra en la figura 4a. Para el análisis por MALDI, el analito y la matriz se mezclan en solución. Con la vaporización del solvente, las moléculas del analito y de la matriz co-cristalizan, por lo que las moléculas de analito quedan integradas en las moléculas de la matriz. El proceso MALDI en sí consta de dos pasos. El primero es el proceso de desorción donde la energía de un rayo láser es absorbida por

moléculas de la matriz y después se transfiere al analito, que impulsa el proceso de desorción de estas moléculas. El segundo paso es la ionización del analito a través de la protonación o desprotonación. La carga en este proceso se transfiere de nuevo a partir de moléculas de la matriz, por lo que los iones de analito quedan con una sola carga (Knochenmuss y Zenobi, 2003).

La ionización por electrospray (ESI) también es un proceso que conlleva múltiples pasos. Inicialmente, una solución líquida que contiene el analito se hace pasar a través de un capilar, en el que se mantiene una alta tensión eléctrica. Debido al campo eléctrico, el líquido emergente genera un aerosol con gotas de pequeño tamaño y muy cargadas. En una segunda etapa, estas gotas se reducen drásticamente a través de la evaporación del disolvente y finalmente se generan iones en fase gaseosa (figura 4b). La ionización por electrospray proporciona principalmente múltiples iones cargados que luego se pueden dirigir a un analizador de masas.

Ambos métodos de ionización pueden ser asociados a una gran variedad de analizadores de masas. Para la investigación proteómica se utilizan comúnmente cinco diferentes tipos de analizadores: **analizador de masas tipo Cuadrupolo (Q, 'Quadrupole')**, **analizador de masas tipo Trampa de iones (IT, 'Ion Trap')**, **analizador de masas tipo Tiempo de vuelo (TOF, 'Time Of Flight')**, **analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (FTICR, 'Fourier-transform ion cyclotron resonance')** y **el analizador recientemente inventado por Makarov, el Orbitrap (Makarov, 2000)**.

La ejecución de esta técnica analítica requiere del espectrómetro de masas, que produce, separa y detecta iones en fase gaseosa. Los elementos principales que forman un espectrómetro de masas son tres: una fuente de ionización, que es el elemento del espectrómetro que ioniza el material que va a ser analizado; un analizador de masas, que

utiliza un campo eléctrico o magnético para acelerar los iones y separarlos en función de su relación masa/carga (m/z) y un detector, al cual llegan los iones y producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido es el espectro de masas o "huella química" (Bou y cols., 2011).

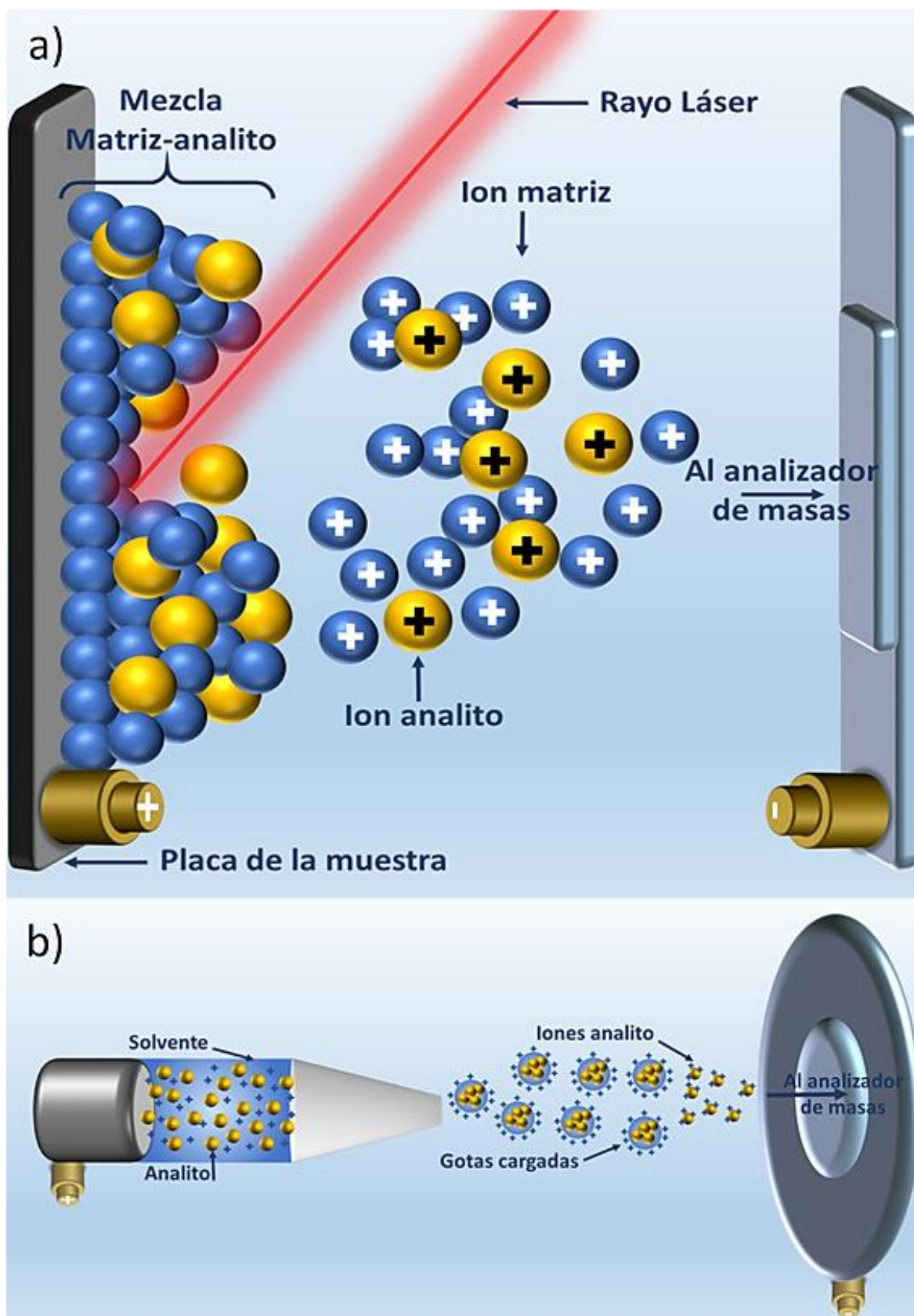


Figura 4. a) Esquema de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) y b) Esquema de ionización por electrospray (ESI). Basado en Jordana-Lluch y cols., 2012.

Identificación bacteriana por espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*)

En 1988 Michael Karas y Franz Hillenkamp, los inventores de MALDI, presentaron el primer espectro de una proteína con una masa superior a 1000 Da en la Conferencia Internacional de Espectrometría de Masas en Burdeos (Hillenkamp y Karas, 2000).

La espectrometría de masas MALDI tiene la ventaja que los procedimientos de vaporización y ionización pueden ser llevados a cabo en un solo paso. En este proceso, la colonia bacteriana es embebida en una matriz. La matriz es un ácido débil que absorbe casi completamente el láser a una determinada longitud de onda. Por lo tanto se produce una fuerte interacción entre la matriz y los componentes de la bacteria. Las matrices empleadas comúnmente pueden estar formadas por ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (DHBA), ácido sinapínico (SA) o ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico (HCCA). Todos estos compuestos tienen una estructura de anillo aromático y contienen un resto de ácido carboxílico (Hillenkamp y Peter-Katalinic, 2007).

La espectrometría de masas MALDI combinada con el analizador de masas tipo TOF (*Time-Of-Flight*) se ha convertido en una de las técnicas indispensables para el avance de la proteómica.

Desde su introducción, la espectrometría de masas MALDI-TOF se ha utilizado para una variedad de aplicaciones como la caracterización de proteínas, la investigación de la organización espacial de péptidos y proteínas en secciones de tejido, la identificación de levaduras de aislados clínicos, y la identificación y caracterización de bacterias (Amiri-Eliasi y Fenselau, 2001; Chaurand *y cols.*, 2002; Deininger *y cols.*, 2008; Marklein *y cols.*, 2009; Giebel *y cols.*, 2008; Ilina *y cols.*, 2009; Mandrell *y cols.*, 2005; Mellmann *y cols.*, 2008; Vila *y cols.*, 2012).

El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF se está convirtiendo rápidamente en una herramienta de uso rutinario en muchos laboratorios de Microbiología Clínica. Este sistema se basa principalmente en la detección de ciertas proteínas ribosómicas bacterianas (de peso molecular comprendido entre 2000 y 20000 Da). Se asume que el 80-90% de las señales del espectro de la bacteria son proteínas ribosomales. Las proteínas liberadas de la bacteria son ionizadas y detectadas por el espectrómetro de masas, el espectro resultante es analizado y su patrón comparado con los de otras bacterias registrados en una base de datos, dando lugar a un grado de coincidencia (Alatoom *y cols.*, 2012, Konrad *y cols.*, 2010).

Esta tecnología se promociona como revolucionaria por su rapidez y porque el costo de consumibles está estimado en menos de 0,5\$ (dólares USA) por muestra, excluyendo el costo del instrumento MALDI-TOF (Gaillot *y cols.*, 2011).

Entre las plataformas comerciales que existen, dos son las más utilizadas: MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) y Axima@SARAMIS (AnagnosTec GmbH, Potsdam, Alemania).

Bruker Daltonics ofrece tanto el espectrómetro de masas o hardware, como el software y la base de datos para la interpretación de los resultados (Biotyper 2.0). En el caso de Axima@SARAMIS, el espectrómetro de masas y el software de interpretación son fabricados por la compañía Shimadzu (Kioto, Japón), mientras que la base de datos SARAMIS ha sido desarrollada por AnagnosTec GmbH. Ambas bases de datos permiten la incorporación de nuevos espectros, permitiendo adaptarla según las necesidades de cada laboratorio (Jordana-Lluch *y cols.*, 2012; Emonet *y cols.*, 2010).

1.6. Género *Dietzia*

Este género fue propuesto para organismos inicialmente conocidos como *Flavobacterium maris* (Harrison, 1929) y después *Rhodococcus maris* (Nesterenko *y cols.*, 1982). Posteriormente se reclasificó como *Dietzia maris* en base a la secuencia del gen codificante para el RNA ribosomal 16S (Rainey *y cols.*, 1995).

El género *Dietzia* está constituido por cocobacilos, Gram-positivos, catalasa positivos, aerobios y no formadores de esporas. Contiene ácidos micólicos de 34-38 átomos de carbono. Su contenido en G+C es del 73 % (Rainey *y cols.*, 1995).

Este género está compuesto por microorganismos que viven en el suelo y en sedimentos acuáticos. Se han aislado también en plantas y en la piel e intestino de carpas (*Cyprinus carpio*) (Nesterenko *y cols.*, 1982; Goodfellow, 1993; Yumoto *y cols.*, 2002). Actualmente se conocen 13 especies validadas de este género, siendo la especie tipo del género *Dietzia maris* (Euzéby, 2013).

Algunos especímenes del género *Dietzia* poseen significancia clínica, presentándose como patógenos oportunistas que infectan a animales y humanos (Bemer-Melchior *y cols.*, 1999; Pidoux *y cols.*, 2001; Reyes *y cols.*, 2006).

Los casos de infecciones producidas en humanos por estos microorganismos afectan a individuos inmunodeficientes, que padecen otras enfermedades o que sufren periodos prolongados de estrés.

El primer caso en donde se demostró la capacidad infectiva de *D. maris* fue su aislamiento de un catéter de un paciente inmunocomprometido con shock séptico y pneumotórax (Bemer-Melchior *y cols.*, 1999). En el año 2001, *D. maris* fue aislada e identificada por secuenciación del gen ARNr 16S a partir de una muestra tomada por biopsia de médula ósea, de un paciente con

prótesis de cadera (Pidoux *y cols.*, 2001). Posteriormente, se describió la implicación de *Dietzia sp.* en un episodio de papilomatosis humana (Natarajan *y cols.*, 2005). También se ha publicado un caso de infección en aorta humana por *D. maris* (Reyes *y cols.*, 2006). Además, *Dietzia cinnamea* fue aislada a partir de una muestra perianal de una paciente que había sufrido trasplante de médula ósea. La identificación del agente patógeno fue realizada por secuenciación parcial del gen ARNr 16S (Yassin *y cols.*, 2006). En el 2012 se publicó que una nueva especie del género *Dietzia*, *Dietzia aurantiaca*, había sido aislada de líquido cefalorraquídeo de una mujer de 24 años en Suecia. La identificación fue realizada mediante secuenciación del gen ARNr 16S (Kämpfer *y cols.*, 2012).

1.7. Diagnóstico diferencial entre *Rhodococcus spp.* y *Dietzia spp.*

La identificación de *R. equi* en los laboratorios clínicos se realiza principalmente mediante la caracterización de la colonia, la morfología microscópica y los test bioquímicos usando el kit comercial API Coryne. Sin embargo su fiabilidad para la identificación de aislados de este género es limitada, dando como resultado una identificación errónea de *R. equi* como otras especies del género o incluso otros actinomicetos (Funke *y cols.*, 1997).

La diferenciación bioquímica entre *Rhodococcus equi* y *Dietzia maris* se basa principalmente en la prueba de orto-nitrofenil- β -galactosido (ONPG), que es utilizada para identificar bacterias que fermentan tardíamente lactosa. *Rhodococcus equi* degrada el ONPG mientras que *Dietzia maris* no lo hace (Bizet *y cols.*, 1997). No obstante, no existen datos comparativos concluyentes en la literatura sobre el comportamiento fenotípico de estos géneros bacterianos (tabla 1).

Prueba	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Dietzia maris</i>
Morfología de la colonia	Mucoide	Mucoide
Color de la colonia	Salmón	Naranja
Tinción de Gram	Coco-bacilo Gram-positivo	Coco-bacilo Gram-positivo
CAMP¹	Positivo	ND ²
Catalasa	Positivo	Positivo
Oxidasa	Negativo	Negativo
Ureasa	Variable	Variable
KNO₃³	Variable	Positivo
ONPG⁴	Positivo	Negativo
Glucosa	Positivo	Variable
Lactosa	Negativo	Negativo
Manitol	Variable	Negativo
Maltosa	Variable	Variable
Ribosa	Positivo	Negativo
Inulina	Variable	Negativo
Salicina	Variable	Negativo
Hidrólisis de la esculina	Negativo	Negativo
GOF⁵	Negativo	Negativo

Tabla 1. Características morfo-fisiológicas de *Rhodococcus equi* y *Dietzia maris*. CAMP¹: Test de Christie, Atkins, Munch-Petersen; ND²: No determinado; KNO₃³: Test de reducción de nitrato; ONPG⁴: ortho-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside; GOF⁵: Glucosa oxidativa-fermentativa. Fuente: Quinn *y cols.*, 1994; Murray *y cols.*, 2007; Bizet *y cols.*, 1997; Pidoux *y cols.*, 2001 y Yumoto *y cols.*, 2002.

Una herramienta importante para la diferenciación entre las especies de los géneros *Rhodococcus* y *Dietzia* es la técnica de PCR, la cual se muestra muy eficiente en comparación al mero aislamiento bacteriano. No obstante, se resalta la importancia de la confirmación del diagnóstico por secuenciación de ADN, cuando la caracterización fenotípica y molecular es discrepante.

1.8. Inmunidad frente a *Rhodococcus equi*

Se considera que tanto la inmunidad humoral como la mediada por células desempeñan un papel en la respuesta del hospedador a la infección por *R. equi*. Generalmente, los potros están en riesgo de enfermedad en una edad en la que su sistema inmunitario no se ha desarrollado completamente. Por otra parte, la enfermedad por *R. equi* en caballos adultos y en humanos está frecuentemente asociada con la inmunosupresión (Capdevila *y cols.*, 1997; Freestone *y cols.*, 1987; Portocarrero *y cols.*, 2012).

La mayor parte de la información relativa a la inmunidad de potros frente a *R. equi*, en particular la relacionada con cuantificación de citoquinas y otros indicadores de respuesta inmunitaria, proviene de estudios en el modelo murino. Sin embargo, ratones inmunocompetentes no desarrollan una enfermedad parecida a las infecciones en potros tras la exposición a aerosoles con cepas virulentas de *R. equi* (Bowles *y cols.*, 1987). Se han utilizado por lo tanto otras vías de inoculación para establecer un modelo de infección eficaz en ratones: la vía intravenosa, que induce una infección sistémica en ratones. Este modelo, aunque imperfecto (ya que no imita la ruta natural de la exposición a *R. equi* observada en potros), es el que se emplea en la mayoría de los estudios inmunológicos (Takai *y cols.*, 1991).

Distintos trabajos sugieren que la respuesta mediada por células en potros es protectora, y ayuda al hospedador a superar con éxito una infección por *R. equi* (Bowles *y cols.*, 1987; Hines *y cols.*, 1997; Yager *y cols.*, 1991). Se trata de una respuesta de tipo Th1 (*Helper T-cell subset1*) (Nordmann *y cols.*, 1992b). Las células Th1 liberan predominantemente citoquinas tales como interferón γ (IFN- γ) e interleuquina 12 (IL-12) (Kanaly *y cols.*, 1995). Es importante destacar que estos estudios han demostrado que las citoquinas producidas por macrófagos y linfocitos T inmediatamente después de la infección,

pueden afectar la progresión de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la producción de IL-10 causa una disminución de la respuesta Th1, mientras la producción de IL-12 causa una progresión para la respuesta Th1 (Giguère y Prescott, 1998).

1.8.1. Respuesta inmunitaria humoral

Los caballos producen una gran cantidad de anticuerpos contra *R. equi*. Estos anticuerpos pueden contribuir a la inmunidad, alterando la ruta por la que las bacterias entran en los macrófagos, lo que interfiere con la habilidad de *R. equi* para inhibir la maduración del fagosoma dentro de estas células (Speert, 1992). También *in vitro*, el suero inmune ha demostrado promover la eliminación de *R. equi* por macrófagos equinos (Hietala y Ardans, 1987). Anticuerpos anti-*R. equi* transferidos pasivamente han mostrado además un efecto protector contra la neumonía, reduciendo la morbilidad y mortalidad en cuadradas afectadas endémicamente (Meijer y Prescott, 2004). Esto sugiere que los anticuerpos juegan un papel importante en la interacción de *R. equi* con su hospedador.

1.8.2. Respuesta inmunitaria mediada por células

La naturaleza intracelular facultativa de *R. equi* sugiere que los mecanismos inmunológicos mediados por células pueden desempeñar un papel esencial en la resistencia y eliminación de la infección. Los dos principales mecanismos por los cuales los linfocitos T eliminan los patógenos intracelulares son, por citotoxicidad directa de la célula infectada (usualmente mediada por moléculas MHC de clase I) o por la secreción de citoquinas. Los linfocitos T CD4⁺ pueden estar divididos dentro de los subconjuntos Th1 y Th2, basados en la producción de citoquinas: las células Th1 producen IFN- γ e IL-2, y las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10. El equilibrio relativo de la respuesta de Th1 o Th2 determina la capacidad de los animales infectados para controlar las infecciones (Scott, 1991; Yamamura *y cols.*, 1991). En 1993 Kanaly

y colaboradores demostraron el rol de los linfocitos T CD4⁺ en la eliminación de las infecciones por *R. equi*, ya que ratones transgénicos MHV-I deficientes en células T CD8⁺ eliminaban las bacterias virulentas de los pulmones, mientras que los ratones transgénicos MHC-II deficientes en células T CD4⁺ no lo hacían. Ratones inmunocompetentes infectados experimentalmente con cepas virulentas de *R. equi* desarrollaron una respuesta Th1 que eliminó la infección. En cambio, en ratones en los cuales la respuesta Th2 fue inducida, desarrollaron granulomas pulmonares, sugiriendo que la respuesta Th1 es protectora en ratones, y que una respuesta Th2 no protectora está involucrada en el desarrollo de la enfermedad (Kanaly *y cols.*, 1995, 1996). IFN- γ es el factor principal de la activación del macrófago y es capaz de regular la eliminación microbiana por estas células (Mosmann y Coffman, 1989), estimulando la formación de fago-lisosomas y mejorando la expresión de los receptores Fc (Nathan *y cols.*, 1983). Los datos obtenidos con ratones infectados experimentalmente sugieren que, al menos en ratones, el IFN- γ es esencial para la eliminación de *R. equi*, y que la respuesta Th1 es necesaria para promover la inmunidad protectora (Hines *y cols.*, 1997). La infección de los potros con cepas virulentas de *R. equi* evidenció la producción de un efecto inmunomodulador que desencadena una respuesta ineficaz, como la respuesta Th2, reduciendo la producción de IFN- γ por los linfocitos CD4⁺ (Giguère *y cols.*, 1999). Sin embargo la eliminación de *R. equi* virulentos de los pulmones de caballos adultos infectados experimentalmente fue asociada con un mayor número de linfocitos productores de IFN- γ (Hines *y cols.*, 2003). Esta diferencia de la respuesta inmunitaria entre potros y caballos adultos puede reflejar las características únicas del sistema inmune de los potros (menos desarrollado), así como diferencias entre animales inmunes y no inmunes (Meijer y Prescott, 2004).

Interacción de *Rhodococcus equi* con células fagocíticas

La infectividad de *R. equi* en animales parece limitarse casi exclusivamente a los macrófagos (Hondalus, 1997), ya que los neutrófilos de los potros son capaces de eliminar los rodococos internalizados (Meijer y Prescott, 2004). La entrada de *R. equi* en los macrófagos requiere factores del complemento y se produce a través del receptor del complemento CR3 (CD11b/CD18), también denominado Mac-1 (Hondalus y Mosser, 1994). *R. equi* también podría utilizar el receptor de manosa de los macrófagos, reconociendo los residuos de α -D-manosaP del lipoarabinomanano (LAM) (Garton *y cols.*, 2002). La entrada a través de estos mecanismos evita que la bacteria sea destruída por los anticuerpos (*antibody mediated receptor pathway*) y favorece su supervivencia intracelular. Si se opsoniza con anticuerpos específicos antes de la infección, la bacteria no resiste las condiciones intracelulares y muere (Hietala y Ardans, 1987) (Darrah *y cols.*, 2000).

La replicación de *R. equi* dentro del macrófago parece conducir a la muerte celular por necrosis (Lührmann *y cols.*, 2004), y probablemente se desencadena una cascada de factores pro-inflamatorios que producen la formación de abscesos y la destrucción del tejido.

R. equi posee la capacidad de modificar la vacuola de los macrófagos, evitando su acidificación y la posterior fusión con los lisosomas (Fernández-Mora *y cols.*, 2005; Toyooka *y cols.*, 2005; von Bargen *y cols.*, 2009; Zink *y cols.*, 1987). La bacteria se replica dentro de este fagosoma modificado y parece que incorpora el marcador endosomal tardío Rab7, pero no la ATPasa vacuolar, ni hidrolasas lisosómicas. Los mecanismos moleculares precisos por los que *R. equi* altera el tráfico en el fagosoma no se conocen aún. Recientemente se ha publicado que los micolípidos de la pared celular podrían estar implicados, ya que un mutante en el gen *kasA*, codificante para β -cetoacil-sintasa A, una enzima clave del complejo FAS-II, implicado en la

síntesis de ácidos micólicos de cadena larga, tiene disminuída su capacidad para impedir la formación del fagosoma (Sydor *y cols.*, 2013). Las proteínas codificadas por el plásmido de virulencia, en especial VapA, deben jugar un papel crucial, dado que los fagosomas que contienen cepas de *R. equi* que carecen del plásmido de virulencia o presentan una mutación en el gen *vapA*, siguen su vía normal de maduración, que incluye las etapas de acidificación, formación del fagolisosoma (Fernández-Mora *y cols.*, 2005) y eliminación de la bacteria (von Bargen y Haas, 2009). En consecuencia, las cepas de *R. equi* que han perdido el plásmido de virulencia no son tóxicas para los macrófagos del hospedador (figura 5).

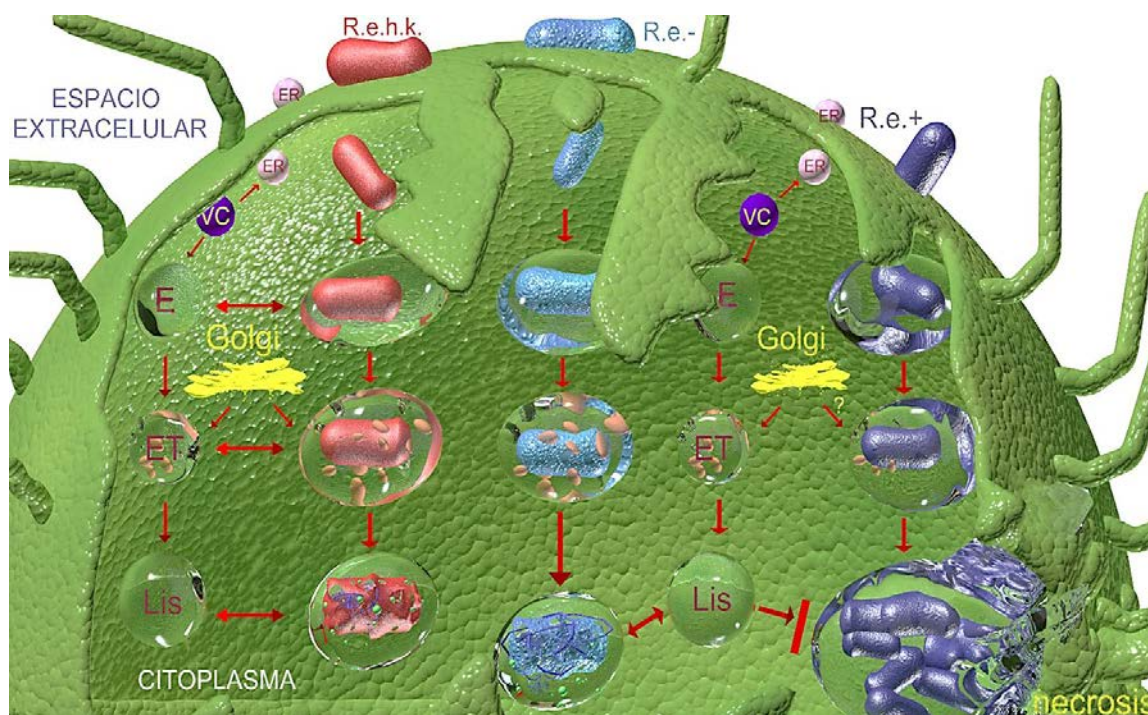


Figura 5. Tráfico intracelular de *R. equi* en macrófagos. La maduración de los fagosomas que contienen *R. equi* no virulento siguen la misma vía que los que contienen *R. equi* muertos por calor. Los fagosomas que contienen *R. equi* virulento, al inicio maduran normalmente y adquieren y liberan marcadores típicos durante su interacción con endosomas tempranos. Sin embargo, no se produce una fusión con los lisosomas y las enzimas degradadoras lisosomales como la CathD no son adquiridas. *R. equi* se multiplica en una vacuola no acidificada, con numerosas vesículas internas, y la célula hospedadora es finalmente destruida en un proceso de necrosis. Basado en el esquema propuesto por von Bargen y Haas, 2009. R.e.h.k.: *R. equi* muerto por calor. R.e.-: *R. equi* no virulento plásmido (-). R.e.+ : *R. equi* virulento plásmido (+). Lis: Lisosoma. E: Endosoma. ET: Endosoma tardío. ER: Endosoma reciclado. VC: Vesícula cubierta con clatrina.

Interacción de *R. equi* con células no fagocíticas

La información sobre la interacción de *R. equi* con células no fagocíticas es muy escasa. Sin embargo, las células epiteliales juegan un papel muy importante como barrera entre las superficies mucosas del hospedador y el medio ambiente que lo rodea, por lo que son emplazamientos ideales para la colonización por patógenos bacterianos (Casadevall, 2008; Ehrt y Schnappinger, 2009).

La invasión de células no fagocíticas puede ser explotada por las bacterias para evitar la exposición a las defensas inmunitarias del hospedador y por lo tanto, puede facilitar su diseminación. La invasión bacteriana de células epiteliales o de otro tipo, no fagocíticas, es también considerada una importante propiedad patogénica de muchas bacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* o *E. coli*. (Goosney *y cols.*, 1999; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006).

1.9. Agentes antimicrobianos en el tratamiento de las infecciones causadas por *R. equi*

Tratamiento de la infección por *R. equi* en equinos

El tratamiento estándar para la infección por *R. equi* en potros es una combinación de eritromicina y rifampicina, administrados por vía oral (Hillidge, 1987). Antes de la utilización de esta terapia, el pronóstico de la enfermedad por *R. equi* era bastante malo, con un 80% de mortalidad en potros (Elissalde *y cols.*, 1980). Otras drogas como trimetoprim, neomicina y sulfametoxazol también han sido utilizadas con cierto éxito (Barton, 1986; Prescott y Hoffman, 1993).

R. equi es sensible a muchos antibióticos *in vitro*, incluyendo algunas fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Barton y Fulton, 1980; Giguère y Prescott, 1997). Sin embargo, sólo los antibióticos rifampicina y eritromicina son capaces de entrar en los macrófagos infectados. Ambos fármacos son bacteriostáticos y lipofílicos, por lo tanto, capaces de penetrar directamente en las lesiones o sitios de infección a los que muchos otros antibióticos no acceden (Giguère y Prescott, 1997; Nordmann y Ronco, 1992).

Además, otros estudios han demostrado que eritromicina y rifampicina son sinérgicos y alcanzan altas concentraciones dentro de los macrófagos (Maurin y Raoult, 1993; Prescott y Nicholson, 1984).

Se cree que el uso de esta terapia combinada reduce la probabilidad de que aparezcan resistencias (Prescott y Hoffman, 1993). La monoterapia con rifampicina en potros puede dar lugar a la aparición de cepas resistentes (Takai *y cols.*, 1997). A este respecto, los estudios indican que además de la resistencia asociada a monoterapia, algunos aislados equinos, humanos y ambientales poseen una resistencia innata a este fármaco, y tienen la capacidad de inactivar la rifampicina por un proceso de descomposición (Andersen *y cols.*, 1997; Dabbs, 1998; Nordmann *y cols.*, 1992a).

Esta resistencia está asociada al gen *iri*, que codifica una proteína de 479 aminoácidos similar a las monoxigenasas que actúan sobre compuestos fenólicos o están involucradas en la síntesis de antibióticos poliketídicos (Andersen *y cols.*, 1997). Fines y colaboradores atribuyeron la resistencia a rifampicina de *R. equi* a una mutación o mutaciones en el gen *rpoB* (Fines *y cols.*, 2001).

Además, algunas micobacterias y nocardiformes muestran otros mecanismos de resistencia a rifampicina, que incluyen la fosforilación (Yazawa *y cols.*, 1994), glicosilación (Yazawa *y cols.*, 1993) y ribosilación (Dabbs *y cols.*, 1995). Sin embargo, *R. equi* sólo presenta la fosforilación (Tanaka *y cols.*, 1996).

Esta terapia combinada causa algunos efectos secundarios como diarrea y cólicos leves, pero ha resultado ser muy eficaz, reduciendo significativamente la infección por *R. equi* en potros (Sweeney *y cols.*, 1987).

Se han estudiado antimicrobianos como claritromicina, azitromicina, eritromicina, rifampicina, ampicacina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, cefazolin, ceftazidima, ceftiofur, cloranfenicol, clindamicina, doxiciclina, enrofloxacin, florfenicol, gentamicina, imipenem, nitrofurantoína, oxacilina, penicilina, tetraciclina y trimetoprim-sulfadiazina (1:5) contra *R. equi*, siendo la claritromicina un compuesto

más activo que la azitromicina, obteniéndose unas CMI₉₀ de 0,12 y 1,0 µg/ml respectivamente. La rifampicina, gentamicina e imipenem mostraron una alta actividad contra el 90% de los aislados de *R. equi* (Jacks *y cols.*, 2003).

Tratamiento de la infección por *R. equi* en humanos

Rhodococcus equi es un patógeno poco común en humanos, y la infección se produce principalmente en individuos inmunodeprimidos. Se han llevado a cabo estudios para evaluar las combinaciones más óptimas de antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones por *R. equi* de cuatro aislados clínicos humanos. Los antimicrobianos que mostraron mayor actividad *in vitro* fueron amicacina, gentamicina, netilmicina, eritromicina, claritromicina, roxitromicina, ciprofloxacina, sparfloxacina, rifampicina, vancomicina, teicoplanina, doxiciclina, minociclina, imipenem, meropenem y trimetoprim/sulfametoxazol. Los únicos antimicrobianos que mostraron actividad bactericida fueron los aminoglucósidos, ciprofloxacina, sparfloxacina y vancomicina. Según lo que determinaron los índices CIF (Concentración Inhibitoria Fraccional), cuatro combinaciones fueron sinérgicas: rifampicina-eritromicina, rifampicina-minociclina, eritromicina-minociclina e imipenem-amicacina (Nordmann y Ronco, 1992).

No hay estudios controlados que comparen la eficacia relativa de los diversos tratamientos para *R. equi* en seres humanos. Como resultado, la terapia se basa en la susceptibilidad *in vitro* (figura 6). Se han utilizado varios agentes antimicrobianos incluyendo beta-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, sulfonamidas potenciadas, rifamicinas y glicopéptidos solos o en varias combinaciones (Nordmann *y cols.*, 1992a; Kedlaya *y cols.*, 2001; Yamshchikov *y cols.*, 2010).

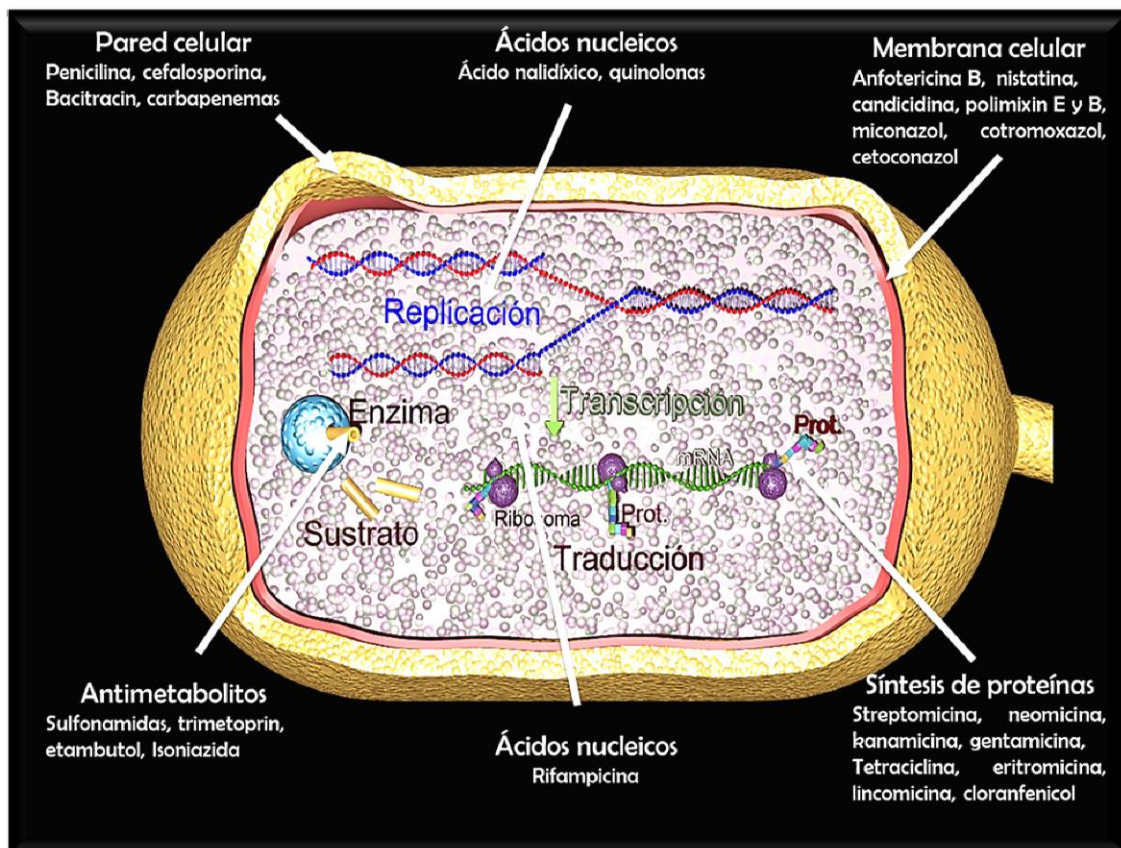
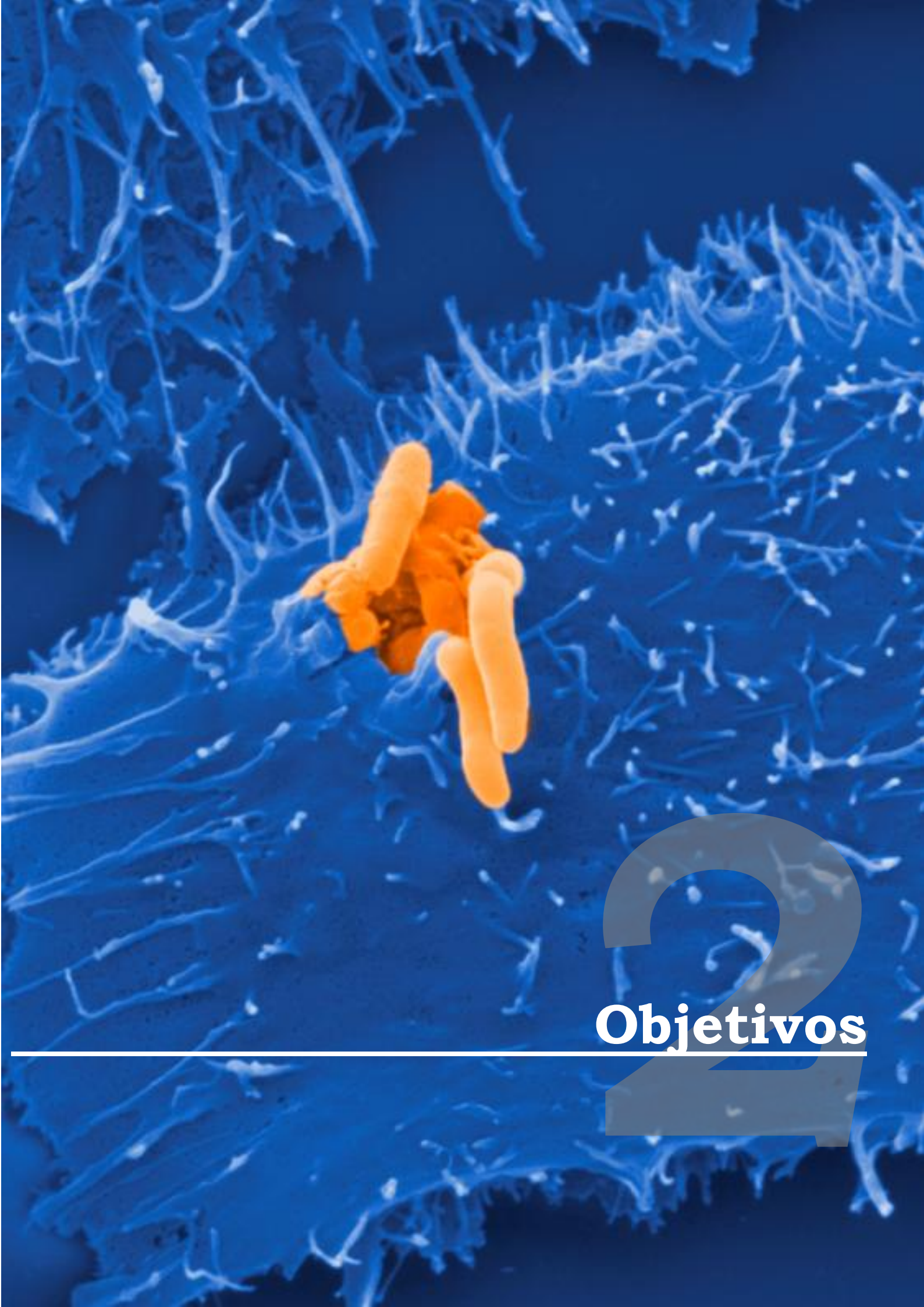


Figura 6. Sitios de acción de agentes antimicrobianos.



Objetivos

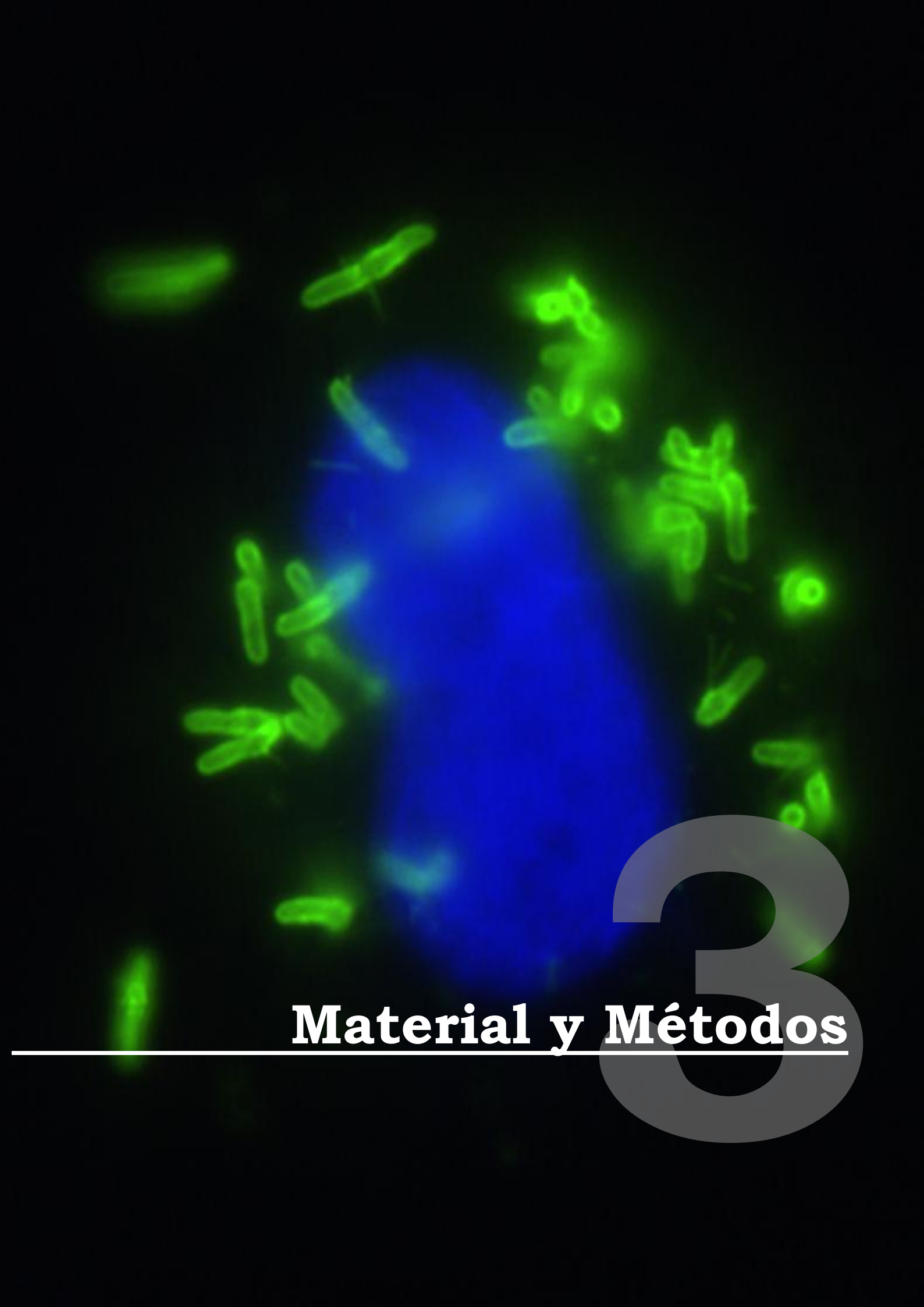
2

2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis hay que situarlos dentro del Programa de Becas MAEC-AECID (Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo).

En este contexto, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 2.1. Poner a punto la tecnología MALDI-MS para la identificación de *R. equi* y aplicarla a la identificación a nivel de especie de aislamientos de *R. equi* causantes de infección en humanos, procedentes de diferentes centros hospitalarios españoles.
- 2.2. Estudiar la interacción de cepas de *R. equi* aisladas de pacientes de diferentes hospitales con células epiteliales pulmonares humanas.
- 2.3. Evaluar "*in vitro*" la susceptibilidad de cepas de *R. equi* de distinto origen a 29 agentes antimicrobianos.



Material y Métodos

3

3.1. Cepas bacterianas incluidas en este estudio

En este estudio se recopilaron y manipularon un total de 165 cepas bacterianas (tabla 2). De ellas, 144 se identificaron en origen como *R. equi* y proceden de distintas áreas geográficas (España, Francia, Alemania, República Dominicana y Australia). Treinta y siete fueron aisladas de potros con neumonía, 60 de pacientes humanos infectados por el VIH y 47 de aislamientos ambientales (44 de suelo y 3 de heces de potros). Las cepas de origen humano proceden del servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, del Hospital 12 de Octubre de Madrid y de otros hospitales españoles. Además, se utilizaron 3 cepas de referencia: *R. equi* 103, *R. equi* ATCC 6939 (cepa tipo también conocida como cepa Magnusson) y *R. equi* ATCC 33701. Se han incluido también cepas de referencia de *Dietzia* (DSM 43984, DSM 44904, DSM 44748, DSM 44820, DSM 44860, DSM 44907, DSM 44961, DSM 45074, DSM 45139, DSM 45140).

3.2. Caracterización fenotípica

3.2.1. Medios de cultivo

Las bacterias se cultivaron en caldo BHI (Difco) a 30°C o a 37°C durante 24-48 horas con agitación. Como medios sólidos se utilizaron BHI con agar (1.3%) o placas comerciales de agar sangre (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

3.2.2. Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas se conservaron almacenadas a -80°C en tubos esterilizados. Se partió de un cultivo en placa de 48 horas y se resuspendieron varias colonias en caldo BHI con 20% de glicerol.

Cepa	Origen	Ensayo	Cepa	Origen	Ensayo	Cepa	Origen	Ensayo
RE3	H	A C	RE62	H	A B C	RE121	Am	A C
RE4	H	A C	RE63	H	A C	RE122	Am	A C
RE5	H	A C	RE64	H	A C	RE123	Am	A C
RE6	H	A B C	RE65	H	A C	RE124	Am	A C
RE7	H	A B C	RE66	H	A C	RE125	Am	A C
RE8	H	A C	RE68	H	A C	RE126	Am	A C
RE9	H	A B C	RE69	H	A C	RE127	Am	A C
RE11	H	A	RE70	H	A B C	RE128	Am	A C
RE12	An	A C	RE71	H	A C	RE129	Am	A C
RE13	An	A C	RE73	H	A C	RE130	Am	A C
RE14	An	A C	RE74	H	A C	RE131	Am	A C
RE15	An	A C	RE75	H	A C	RE132	Am	A C
RE16	An	A C	RE76	H	A C	RE133	Am	A C
RE17	H	A C	RE77	H	A C	RE138	H	A A1
RE18	An	A C	RE78	H	A C	RE140	An	A C
RE19	An	A C	RE79	H	A C	RE142	An	A C
RE20	H	A	RE80	H	A C	RE144	An	A C
RE21	H	A	RE81	H	A C	RE145	An	A C
RE23	H	A B C	RE82	H	A C	RE149	H	A A1
RE24	H	A C	RE83	Am	A C	RE150	H	A A1
RE25	H	A C	RE84	Am	A C	RE152	H	A C
RE26	An	A C	RE85	Am	A C	RE153	H	A C
RE27	An	A C	RE86	Am	A C	RE154	H	A C
RE28	An	A	RE87	Am	A C	RE155	H	A A1
RE29	An	A C	RE88	Am	A C	RE156	H	A B C
RE30	An	A	RE89	Am	A C	RE157	H	A C
RE31	An	A C	RE90	Am	A C	RE158	H	A B C
RE32	An	A C	RE91	Am	A C	RE159	H	A C
RE33	An	A C	RE92	Am	A C	RE160	H	A A1
RE34	An	A C	RE93	Am	A C	RE161	H	A A1
RE35	An	A C	RE94	Am	A C	RE162	An	A C
RE36	H	A C	RE95	Am	A C	RE163	H	A B
RE37	H	A B C	RE96	Am	A C	RE164	An	A C
RE38	H	A B C	RE98	Am	A C	RE165	H	A A1
RE39	H	A B C	RE99	Am	A C	RE166	H	A
RE40	H	A B C	RE100	Am	A C	RE167	H	A A1
RE41	An	A C	RE101	Am	A C	103⁺	An	A
RE42	An	A C	RE102	Am	A C	103⁻	An	A
RE43	An	A C	RE103	Am	A C	ATCC 6939	ATCC	A

(Continuación)

Cepa	Origen	Ensayo	Cepa	Origen	Ensayo	Cepa	Origen	Ensayo
RE44	An	A C	RE104	Am	A C	ATCC 33701	ATCC	A B
RE45	An	A C	RE105	Am	A C	ATCC 33701	ATCC	A B
RE46	An	A C	RE106	Am	A C	ATCC 616106	ATCC	A
RE47	An	A C	RE107	An	A C	ATCC 19119	ATCC	A
RE48	An	A C	RE108	Am	A C	ATCC 29212	ATCC	C
RE49	An	A C	RE110	Am	A C	ATCC 29213	ATCC	C
RE50	An	A C	RE111	Am	A C	DSM 43984	DSMZ	A
RE52	An	A C	RE112	Am	A C	DSM 44904	DSMZ	A
RE53	An	A C	RE113	Am	A C	DSM 44748	DSMZ	A
RE55	H	A B C	RE114	Am	A C	DSM 44820	DSMZ	A
RE56	H	A B C	RE115	Am	A C	DSM 44860	DSMZ	A
RE57	H	A C	RE116	Am	A C	DSM 44907	DSMZ	A
RE58	H	A C	RE117	An	A C	DSM 44961	DSMZ	A
RE59	H	A C	RE118	Am	A C	DSM 45074	DSMZ	A
RE60	H	A C	RE119	Am	A C	DSM 45139	DSMZ	A
RE61	H	A B C	RE120	Am	A C	DSM 45140	DSMZ	A

Tabla 2. Cepas incluidas en este estudio.

- H : Cepas aisladas de pacientes humanos con VIH.
 An : Aislamientos de potros con neumonía.
 Am : Aislamientos ambientales.
 A : Cepas incluidas en los ensayos de identificación (MALDI-TOF).
 A1 : Cepas identificadas por secuenciación del gen ARNr 16S.
 B : Cepas incluidas en los ensayos de interacción con células epiteliales A549.
 C : Cepas incluidas en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana.
 ATCC: *American Type Culture Collection*.
 DSMZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*.

3.2.3. Análisis morfológico de las colonias

La descripción morfológica de los aislados de *R. equi* está basada en la descripción de Mutimer y Woolcock (Mutimer y Woolcock, 1981).

El análisis morfológico consistió en la descripción del tamaño, forma, estructura, y color de la colonia.

3.2.4. Identificación por la prueba API-Coryne

La prueba API-Coryne consiste en una serie de reacciones bioquímicas que se realizan con un dispositivo comercial (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France). Se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante, examinándose los resultados de las reacciones después de incubar a 37 °C durante 24 horas y con la ayuda de un programa informático, se asignó un taxón determinado a cada aislamiento. En la tabla 3 se detallan los ensayos incluidos en el kit.

Ensayos	Reacciones/Enzimas
NIT	Reducción de nitratos
PYZ	Pirazinamidasa
PYRA	Pirolidonil arilamidasa
PAL	Fosfatasa alcalina
βGUR	β-Glucuronidasa
βGAL	β-Galactosidasa
αGLU	α- Glucosidasa
βNAG	N-Acetil-β-Glucosaminidasa
ESC	Esculina
URE	Ureasa
GEL	Gelatina
O	Control fermentación
GLU	Fermentación (Glucosa)
RIB	Fermentación (Ribosa)
XYL	Fermentación (Xilosa)
MAN	Fermentación (Manitol)
MAL	Fermentación (Maltosa)
LAC	Fermentación (Lactosa)
SAC	Fermentación (Sacarosa)
GLYG	Fermentación Glicógeno)
CAT	Catalasa

Tabla 3. Reacciones incluidas en la galería de API-Coryne

3.2.5. Reacción CAMP

Esta prueba de hemólisis sinérgica, también llamada test CAMP (El acrónimo CAMP representa las iniciales de los tres autores que idearon

esta prueba: Christie, Atkins y Munch-Petersen) (Christie *y cols.*, 1944), se realizó sembrando en estría en una placa de agar-sangre de carnero (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) *Listeria ivanovii* ATCC 19119 y en estrías perpendiculares *R. equi* o la bacteria que se somete a la prueba. Cuando el resultado es positivo se aprecia un halo de hemólisis característico en forma de flecha tras 24 horas de incubación a 37°C.

3.3. Caracterización genotípica

3.3.1. Extracción de ADN genómico bacteriano

El ADN genómico fue preparado utilizando una modificación del protocolo descrito previamente por Ausubel y colaboradores (Ausubel *y cols.*, 1987). Se tomaron 5 ml de cultivo en fase estacionaria y se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos; el precipitado se lavó con agua destilada y se resuspendió en 0,25 ml de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA) con lisozima (20 mg/ml) y proteinasa K (50 mg/ml). Se incubó durante 2 horas a 37°C. Las bacterias se lisaron añadiendo 0,25 ml de Tris 0,1 M con SDS 1 % y con proteinasa K (400 mg/ml) y se incubó durante 1 hora a 55°C. Se mezcló el lisado con 0,1 ml de NaCl 5M y con 0,1 ml de CETAB-NaCl; se incubó 10 minutos a 65°C. Se añadieron 0,75 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) se mezcló y se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos recogiendo la fase acuosa. Se realizaron tres extracciones más con fenol-cloroformo. Posteriormente se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g y se lavó el precipitado con etanol al 70%. Finalmente, una vez secado el precipitado, se resuspendió el ADN en 100 µl de agua destilada. La concentración y la pureza del DNA se determinaron cargando una alícuota en un gel de agarosa y midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Nanodrop.

3.3.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles horizontales se utilizó para el análisis cuantitativo y cualitativo del ADN. En todos los casos se utilizó como matriz separadora agarosa (Pronadisa) a concentraciones comprendidas entre 0,8% y 1,2%.

Como tampón de electroforesis se utilizó TBE 0,5× (0,09 M Tris-borato pH=8, 1 mM EDTA). Como marcador de peso molecular se empleó el marcador comercial 1kb DNA Ladder Plus (Invitrogen).

Para la tinción de los geles se utilizó RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000×) y se visualizaron con luz ultravioleta de 254 nm en un equipo Gel-Doc (Bio-Rad).

3.3.3. Amplificación del gen codificante para el ARNr 16S

Para la amplificación por PCR se mezclaron 100 ng de ADN, 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline), 1,5 mM de MgCl₂, 5 µl de tampón de amplificación 10×, 25 pmoles de cada cebador, 0,2 mM de cada deoxinucleosido trifosfato y agua destilada hasta un volumen final de 50 µL.

Se programaron los siguientes ciclos de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos con las condiciones específicas para cada par de oligonucleótidos y finalmente un ciclo de 10 minutos a 72°C para terminar la extensión de las cadenas de ADN. Las secuencias de los cebadores y las condiciones específicas de amplificación se muestran en la tabla 4.

3.3.4. Amplificación del gen *choE* específico para *R. equi*

Esta PCR es específica para la identificación de *R. equi* procedente de cualquier origen y está basada en la amplificación de un fragmento del gen *choE* que codifica una colesterol oxidasa. El tamaño del amplicón es de 959 pb.

La mezcla para reacción de PCR consistió en 100 ng de ADN, 4 U de *Taq* polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 10µl de tampón de amplificación 10× (160 mM de (NH₄)₂SO₄, 670 mM de Tris pH=8,8, 0.1% de Tween 20), 40 pmol de cada cebador, 0,2 mM de deoxinucleósidos trifosfato y agua destilada hasta un volumen final de 100 µL, y las condiciones de amplificación fueron 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de amplificación según se muestra en la tabla 4, y un ciclo final de 10 minutos a 72°C.

Cebador	Secuencia	Referencia	Condiciones de amplificación		
			D	A	E
PA PL06-R	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-GCGCTCGTTGCGGGACTTAACC-3'	Lane, 1991	1 min. 94°C	1 min. 50°C	1 min. 72°C
PH PL06	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' 5'-GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGA-3'	Lane, 1991	1 min. 94°C	1 min. 50°C	1 min. 72°C
COX-F COX-R	5'-GTCAACAACATCGACCAGGCG-3' 5'-CGAGCCGTCCACGACGTACAG-3'	Ladrón y cols. 2003	1 min. 95°C	1min. 55°C	1 min. 72°C

Tabla 4. Cebadores utilizados en las reacciones de amplificación por PCR para el gen ARNr 16S y *choE*. D: Desnaturalización. A: Anillamiento. E: Extensión.

3.3.5. Purificación de productos obtenidos mediante PCR

Los productos de PCR se purificaron con el kit GenElute TM PCR Clean-Up (Sigma). El método está basado en la utilización de columnas rellenas con un polímero que retiene el ADN de tamaño comprendido entre 100pb y 10kb. La utilización de este método está sujeta a las especificaciones del fabricante, eluyendo finalmente el ADN en agua destilada estéril. El rendimiento que se obtuvo después de purificar los productos de PCR fue de 30 ng/µl (valor medio).

3.3.6. Secuenciación del ADN

El ADN fue secuenciado en un secuenciador capilar 3730 DNA Analyzer en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

3.3.7. Análisis informático

Para la lectura de los cromatogramas correspondientes a las secuencias de ADN se utilizó el programa ChromasPro versión 2.33 (Technelysium Pty Ltd). Para buscar las homologías entre las distintas secuencias de ADN se empleó el programa Blastn (Altschul *y cols.*, 1990) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI 'National Center for Biotechnology Information'). La construcción del árbol filogenético se basó en el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987).

3.3.8. Tipificación molecular

La tipificación molecular de las cepas de *R. equi* fue realizado utilizando el sistema TRAVAP, descrito previamente (Ocampo-Sosa *y cols.*, 2007).

3.4. Caracterización proteómica

3.4.1. Preparación de las muestras

Para este estudio se utilizaron 144 cepas de *R. equi* y 10 cepas de *Dietzia* spp. (tabla 2), que fueron inoculadas en placas de agar sangre (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) a partir de un vial conservado a -80°C, y cultivadas a 37°C.

Para la identificación de los microorganismos con el sistema Vitek-MS™ (figura 7), se siguieron las recomendaciones del fabricante: se

aplicó una sola colonia directamente sobre el soporte metálico y se lisó por suspensión en 0,6 μL de ácido fórmico al 28,9% (VITEK MS-FA). Se dejó evaporar a temperatura ambiente y se cubrió con 1 μL de la matriz VITEK®MS-CHCA (solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo/etanol/agua en proporción 1:1:1 acidificado con ácido trifluoroacético 3% v/v), dejándose evaporar de nuevo al aire. Se analizaron dos muestras de cada cepa, que fueron leídas en dos rondas.

Para optimizar los resultados se realizó un procesamiento de las muestras, consistente en recolectar colonias con un asa de siembra y mezclarlas con 300 μL de api®suspension Medium (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) en un tubo de Eppendorf de 1,5 ml. Se agitó en vórtex y posteriormente se agregaron 900 μL de etanol absoluto (Merk, Darmstadt, Germany) y se agitó en vórtex de nuevo. Se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 2 minutos en centrífuga de mesa. Se descartó el sobrenadante, excepto la última gota. Se resuspendió el pellet en esa última gota. Posteriormente, se colocaron 2,5 μl de la suspensión en el portaobjetos, dejando secar a temperatura ambiente y añadiendo finalmente ácido fórmico y acetonitrilo.

3.4.2. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Las mediciones fueron realizadas en el equipo Vitek-MS™ y los resultados se analizaron con la base de datos SARAMIS MS-ID v2 (AnagnosTec GmbH, bioMérieux) en modo linear positivo. La intensidad del láser de nitrógeno 50-Hz se controló mediante el software de adquisición, con la configuración recomendada por el fabricante. Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* ATCC®8739™ como estándar de masa molecular (rango de masas 2-20 kDa). Para la identificación los porcentajes de confianza se generaron por comparación con los superespectros de la base de datos del sistema. Sólo los porcentajes del 99% se consideraron válidos para asignar el género y la especie.

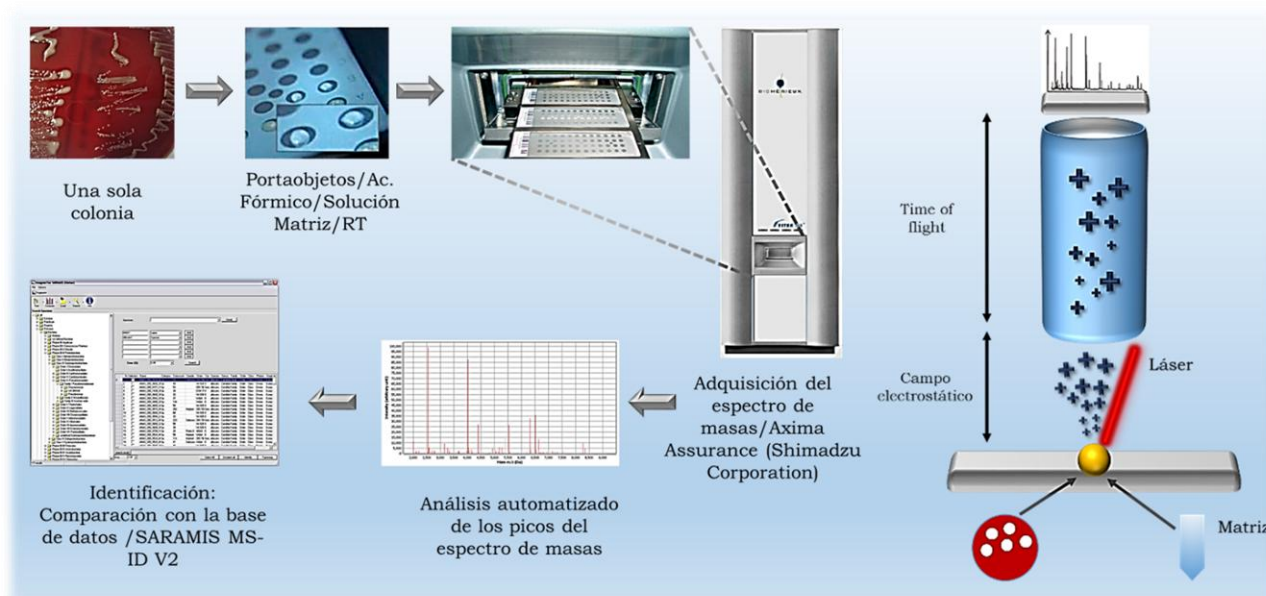


Figura 7. Proceso de la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS

3.5. Interacción de *R. equi* con células epiteliales

3.5.1. Líneas celulares

La línea celular A549 (ATCC®CCL-185™) tiene su origen en un adenocarcinoma pulmonar humano (Giard *y cols.*, 1973). Son células alveolares con morfología epitelial, adherentes. La línea fue cedida por el Dr. Javier Pizarro Cerdá (Institut Pasteur, París). Estas células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma) o en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco, Invitrogen) suplementados con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco) y con 2 mM de L-Glutamina (Gibco). Se eligió esta línea celular debido a que representa el principal tipo celular pulmonar, donde se localizan la mayoría de los casos de infección en humanos.

Las células epiteliales se conservaron por congelación a -80°C en criotubos (Nunc) en medio RPMI-1640 (Sigma) o en medio DMEM (Invitrogen) conteniendo un 5% de dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma). Para descongelar las células, el criotubo se colocó en un baño de agua a

37°C. Seguidamente, se centrifugaron las células y el pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo atemperado a 37°C, para su posterior distribución en frascos de cultivo.

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ utilizando el incubador Forma Scientific Inc. Modelo 311. Para la propagación del cultivo se despegaron las células de la placa de cultivo añadiendo tripsina-EDTA (0,5/0,2%) (Sigma) e incubando durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Seguidamente, se realizaron diluciones con medio de cultivo y se sembraron a la confluencia adecuada.

3.5.2. Producción de un anticuerpo policlonal frente a *R. equi*

Se utilizó la cepa *R. equi* RE70 como antígeno para la obtención de un antisuero de conejo según los protocolos descritos por Padilla y colaboradores (Padilla *y cols.*, 2008). La bacteria se cultivó durante 24 horas a 37°C. Se tomaron 100 ml de cultivo y se centrifugaron (en centrífuga de mesa a 4000 rpm, 30 min y a 4°C). El pellet resultante se resuspendió en un matraz en 100 ml de solución de formaldehído al 1% (v/v). Esta suspensión se mantuvo en agitación durante 16 horas a 4°C. Se centrifugó la suspensión de bacterias muertas y se lavó el pellet 3 veces con tampón PBS. Posteriormente, se resuspendieron en 4 ml de PBS y 1 ml de esta suspensión se mezcló con 1 ml de adyuvante incompleto de Freund. Con esta mezcla, se procedió a inocular por vía subcutánea a 2 conejos de la raza New Zealand. Una segunda inyección se administró de igual manera a las 6 semanas. A las 8 semanas de la primera inyección, se procedió a la eutanasia de los conejos y a la extracción de la sangre mediante punción cardíaca (Harlow y Lane, 1988). El suero se separó del coágulo sanguíneo por centrifugación (2000 g, 30 min, 4°C) y se almacenó a -20°C.

3.5.3. Ensayos de inmunofluorescencia

Para determinar si el suero anti-*R. equi* reaccionaba contra las distintas cepas de *R. equi* utilizadas en el presente trabajo, se realizó una titulación del mismo. Para ello, se cultivaron las distintas cepas a 37°C durante 24 o 48 horas, tanto en placa como en medio líquido. Diez microlitros de cultivo líquido, o una suspensión de bacterias cultivadas en medio sólido suspendidas en tampón PBS se dispensaron sobre un cubreobjetos de vidrio redondos. Esta suspensión se dejó secar en campana, y se fijó mediante una solución fría de paraformaldehído al 3.2% en tampón PBS durante 15-20 minutos, a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con tampón PBS. Posteriormente se cubrieron las bacterias con 50µl de diluciones seriadas del anticuerpo policlonal para determinar su potencia. El anticuerpo se diluyó en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) (0,1% en PBS). Este anticuerpo primario se mantuvo en los cubreobjetos durante 20 minutos, en cámara húmeda. Después se lavaron las preparaciones con tampón PBS y se añadió anticuerpo de cabra anti-conejo Alexa-488 o Alexa-594 (Invitrogen). Este anticuerpo secundario se preparó también en BSA-PBS y se incubó durante 20 minutos en cámara húmeda, en oscuridad. Tras este tiempo, se lavaron las preparaciones con PBS y se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje ProLong® Gold (Invitrogen). Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Axiovert 200 (Zeiss) y las fotografías se tomaron con una cámara digital AxioCam HRc (Zeiss).

3.5.4. Microscopía confocal

Las muestras para microscopía confocal fueron preparadas de igual forma que las muestras para microscopía de inmunofluorescencia. Las series de secciones ópticas fueron obtenidas con un microscopio electrónico láser confocal TCS-SP5 (Leica), o con un microscopio NIKON A1R con láseres de 403nm, 488nm, y 561nm. Las reconstrucciones

tridimensionales de las secciones ópticas (distancia de 0.2 μm en el eje vertical) se ensamblaron mediante el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) o mediante el programa Nis elements Ar 3.2 (<http://www.nis-elements.com>).

3.5.5. Adherencia e invasión de células epiteliales A549

Los experimentos de adherencia e invasión fueron basados en los ensayos cuantitativos de protección con antibióticos descritos por Isberg y Falkow (1985).

Brevemente, las células humanas epiteliales de pulmón se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con un 10% de FBS. Se sembraron $1,8 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 24 pocillos (Nunc). Las cepas de *R. equi* se cultivaron en 10 ml de medio BHIB a 37°C con agitación suave (175 rpm) en tubos de polipropileno (Iwaki) durante 24 o 48 horas. A partir de estos cultivos, se prepararon alícuotas conteniendo aproximadamente 4×10^9 UFCs por ml. Diez microlitros de esta suspensión fueron añadidos a cada pocillo. Posteriormente, las placas se centrifugaron a 200 g durante 4 minutos a temperatura ambiente, para promover la adherencia bacteriana a las células y para sincronizar las infecciones. Como control se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 en el que no se habían cultivado células A549. De esta manera se comprobó que el tratamiento antibiótico eliminaba eficazmente las bacterias extracelulares.

El número de unidades formadoras de colonia por ml se determinó mediante recuento en placa, realizando diluciones seriadas en PBS y siembras en Agar Sangre. El inóculo de infección contenía 200 bacterias por cada célula eucariota [MOI (*multiplicity of infection*) = 200:1]. Las células así infectadas se incubaron a 37°C en estufa con un 5% de CO₂.

Las bacterias no adheridas se eliminaron mediante 4 lavados con PBS. Inmediatamente, los cultivos infectados se incubaron durante 2

horas adicionales con medio de cultivo RPMI conteniendo vancomicina (50 µg/ml). Tras las 4 horas totales de infección, las monocapas celulares infectadas se lisaron mediante la adición de Tritón X-100 (1% en PBS). Se prepararon diluciones seriadas en PBS de los lisados, y se procedió al recuento mediante siembra en placas de agar sangre. Las placas para el recuento se incubaron durante 48 horas a 37°C.

Para cuantificar el número de bacterias extracelulares adheridas a las células epiteliales (ensayo de adherencia), se restó el número de bacterias intracelulares (determinado por recuento en placa), obtenido tras el tratamiento con antibiótico para eliminar las bacterias extracelulares (ensayo de invasión), del número total de bacterias obtenido tras las infecciones donde no se aplicó el antibiótico. Esto se puede resumir mediante la fórmula:

$$\text{Bacterias adheridas} = (\text{bacterias totales} - \text{bacterias intracelulares}).$$

Para estudiar la cinética de las interacciones entre *R. equi* y las células A549 se realizaron infecciones durante 30, 60, 90 y 120 minutos. Como la invasión celular se mostró dependiente del tiempo, el tiempo de infección de los siguientes experimentos se fijó en 120 minutos, para conseguir la máxima eficiencia de entrada del patógeno.

Para determinar el efecto de la concentración bacteriana en la eficiencia de invasión (% del inóculo inicial que permanece intracelular), se realizaron infecciones variando el volumen del inóculo bacteriano (5, 10, 15 y 20 µl), y un tiempo de infección de 120 minutos. Para ensayos de infección y supervivencia intracelular, tras la eliminación de las bacterias extracelulares con vancomicina (50 µg/ml), las células se lavaron y se cultivaron hasta las 24 horas con medio de cultivo suplementado con vancomicina (5 µg/ml). Posteriormente se lisaron y se procedió al recuento de UFCs. Se calculó el índice de proliferación intracelular (I_{pro}) (Cano *y cols.*, 2001; Segura *y cols.*, 2004). Este índice se calculó como la relación entre las bacterias viables intracelulares

presentes tras 24 horas de infección, respecto a las presentes a las 2 horas de infección. En todos los experimentos, la eficiencia de invasión se expresó en porcentaje, como el número total de bacterias intracelulares respecto a las bacterias presentes en el inóculo inicial. La integridad de las monocapas celulares infectadas durante 24 horas se comprobó mediante el ensayo de exclusión del colorante azul de tripán, tras observación en microscopio de contraste de fase. Como control de invasión, se utilizó la cepa no invasiva de *Escherichia coli* DH10B a una MOI similar a la de *R. equi*. En estos experimentos, se utilizó gentamicina (100 µg/ml) en lugar de vancomicina. Todos los ensayos de invasión y supervivencia intracelular se realizaron por triplicado (3 pocillos en placa de 24 pocillos), y en 3 experimentos independientes.

3.5.6. Visualización de la entrada de *R. equi* en células A549 mediante SEM

La entrada de *R. equi* en células epiteliales de pulmón humanas se analizó cualitativamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM 'Scanning Electron Microscopy'). Para ello, se procedió a la infección de monocapas como se indicó anteriormente, a una MOI de 100:1. El tiempo de infección fue de 2 horas. Tras las infecciones, se retiró el medio de cultivo, y tras 3 lavados con PBS, se fijaron las monocapas con glutaraldehído frío al 3% en agua destilada. Este fijador se dejó actuar durante 20 minutos a 4°C. Se retiró el fijador, y se realizó una deshidratación en gradiente de acetona (30, 50, 70, 90, y 100%) de 10 minutos cada una. Luego la muestra se secó por el método del punto crítico. Posteriormente se realizó un pulverizado con oro coloidal en un aparato JFC-1100 (JEOL, Ltd). Las muestras se observaron en un microscopio Inspect S (FEI Company). Las microfotografías se pseudocolorearon utilizando el programa Adobe Photoshop CC.

3.5.7. Infecciones bacterianas

Para diferenciar las bacterias extracelulares de las intracelulares se realizó una tinción doble de *R. equi* por inmunofluorescencia. Las células A549 fueron sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro que habían sido colocados previamente dentro de placas de 24 pocillos. Se utilizaron 10 µl de cultivo bacteriano para la infección. Después del periodo de incubación (120 minutos o 24 horas), las células fueron lavadas cuatro veces y fijadas con una solución fría de paraformaldehído al 3.2% en PBS, durante 20 minutos, a temperatura ambiente (Padilla y cols., 2009).

Los anticuerpos primarios y secundarios fueron diluidos en una solución al 1% de seroalbúmina bovina (Sigma) en tampón PBS. Se realizaron diluciones seriadas, utilizándose finalmente la dilución 1:1000. Los cubreobjetos fueron lavados cuatro veces en PBS y a continuación se incubaron durante 20 minutos con el antisuero policlonal de conejo anti-*R. equi*, en cámara húmeda. A continuación los cubreobjetos fueron lavados otra vez e incubados durante 20 minutos con un anticuerpo anti-conejo Alexa-488. Una vez finalizado este marcaje inicial, las células fueron permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 al 0,1% en tampón PBS durante 4 minutos, a temperatura ambiente y lavadas cinco veces con tampón PBS. Para marcar las bacterias intracelulares, los cubreobjetos fueron incubados con los anticuerpos primarios y secundarios como se describe anteriormente, pero usando un anticuerpo anti-conejo Alexa 594 en lugar de Alexa 488. Para identificar las fibras y los filamentos de actina en los experimentos con vancomicina, se utilizó faloidina marcada con fluorescencia (Alexa Fluor 488 phalloidin, Invitrogen). La faloidina es un compuesto que se une a la actina F polimerizada. Después del lavado, las preparaciones se montaron en un portaobjetos utilizándose el reactivo ProLong®Gold con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Invitrogen).

3.5.8. Infecciones con bacterias muertas

Para establecer la relación entre la invasividad y la viabilidad de *R. equi*, se realizó un ensayo de infección con bacterias muertas. Se utilizaron tres procedimientos para matar las bacterias: tratamiento con calor, con luz ultravioleta y con formalina.

Se calentaron 400 μ l del cultivo bacteriano a 80°C durante 25 minutos. Para verificar que el tratamiento había sido eficaz, se inocularon alícuotas de 100 μ l en placas de agar sangre (por triplicado). Se utilizaron 10 μ l del cultivo inactivado para realizar las infecciones.

Por otra parte, cultivos bacterianos cultivados durante 48 horas en placas de agar sangre se expusieron a la luz UV (254 nm) durante 2 horas. Después de este tratamiento, se recogieron las bacterias muertas, se lavaron dos veces con tampón PBS y se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. Alícuotas de esta suspensión se inocularon en placas de agar sangre para confirmar que las bacterias estaban muertas. Se utilizaron 10 μ l de la suspensión para las infecciones.

Se utilizó además formalina para matar las bacterias. Se recogieron bacterias cultivadas durante 24 horas en medio líquido mediante centrifugación a 2500 g durante 30 min, se lavaron tres veces y se resuspendieron en tampón PBS. Se añadió formaldehído a la suspensión [concentración final 0,35% (v/v)] y se incubó a 4°C durante 16 horas con agitación. Después se lavó dos veces con tampón PBS y se ajustó a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. La suspensión también fue inoculada en agar sangre para confirmar que las bacterias no eran viables. Se usaron 10 μ l de esta suspensión para las infecciones.

Todas las preparaciones fueron examinadas por microscopia de epifluorescencia usando un microscopio Zeiss Axiovert 200 Microscope. Se capturaron las imágenes mediante una cámara digital Zeiss AxioCam

HRc y se mezclaron los colores utilizando el programa Adobe Photoshop CS3.

3.5.9. Formación de biocapas

Se analizó la capacidad de *R. equi* para formar biocapas mediante **ensayos cuantitativos siguiendo el método de O'Toole y Kolter (1998)**, con ligeras modificaciones. Se cultivó *R. equi* en placas de agar sangre durante 36 horas a 37°C. Se resuspendieron varias colonias en tampón PBS y se ajustó la densidad óptica (DO_{600}) a 0.05. Veinte microlitros de esta suspensión se dispensaron en los pocillos de placas de microtitulación (96 pocillos) que contenían 130 μ l de medio de cultivo BHIB. Las placas se sellaron con cinta adhesiva y fueron introducidas en bolsas de plástico para evitar evaporación (en las que venían empaquetadas las placas) y se incubaron durante 48 horas a 37°C. El medio de cultivo se descartó y las bacterias fueron lavadas 3 veces con agua destilada (200 μ l/pocillo). Las bacterias adheridas en cada pocillo se tiñeron con 170 μ l de una solución de Cristal Violeta (CV) al 0,7% (w/v) en agua destilada, durante de 12 minutos. El exceso de colorante se retiró mediante lavados con agua destilada (3 lavados, 200 μ l/pocillo). El CV fue extraído mediante solución de etanol-acetona (80:20 v/v). Las placas se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente en un agitador orbital, a 400 rpm, para solubilizar el colorante. Se transfirieron alícuotas de 100 μ l desde cada pocillo a otra placa de 96 pocillos con fondo plano. La cantidad de colorante (proporcional a la cantidad de célula adheridas) se cuantificó midiendo la absorbancia a 620_{nm} en un lector de microplacas. Para cada experimento, se corrigió el error de fondo, restando al valor obtenido en pocillos inoculados, los valores obtenido en los pocillos controles no inoculados. Cada ensayo fue repetido 3 veces, con 8 pocillos por cepa en cada placa. El mismo ensayo se repitió en placas de 48 pocillos, modificando los volúmenes proporcionalmente.

Además, se estudió la capacidad de *R. equi* de formar biocapas mediante un ensayo cualitativo por microscopía electrónica de barrido. Para ello, se procedió a la formación de la biocapas en placas de 24 pocillos. Tras la retirada del medio de cultivo, y de 3 lavados con tampón PBS, se añadió una solución al 3% de glutaraldehído frío en agua destilada para fijar las bacterias. Se dejó actuar 20 minutos a 4°C. Se retiró el fijador, y se realizó una deshidratación en gradientes de etanol (30, 50, 70, 90, y 100%) de 10 minutos cada uno. Se lavó con acetona y se secó por el método del punto crítico. Finalmente se realizó un pulverizado con oro coloidal en un aparato JFC-1100 (JEOL, Ltd). Las muestras se observaron en un microscopio Inspect S (FEI Company) a 20 KV.

3.5.10. Detección de citoquinas solubles en sobrenadantes de células infectadas

Se determinó cuantitativamente la producción de citoquinas pro-inflamatorias por las células infectadas por *R. equi* mediante un ensayo de citometría de flujo (CBA '*Cytometric Beads Array*'). Las células fueron infectadas con *R. equi* durante 2 horas. Posteriormente, se eliminaron las bacterias extracelulares mediante tratamiento con antibiótico, y se continuó la infección durante 22 horas. Al cabo de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares, se filtraron a través de membranas de 0,22µm, y se congelaron para su posterior análisis. Para cuantificar las citoquinas presentes en dichos sobrenadantes, se utilizó el *kit* "*Human Inflammation Kit*" (BD Biosciences, San Diego, CA). Este *kit* permite medir en un único análisis las siguientes citoquinas: Factor de Necrosis Tumoral (TNF '*Tumor Necrosis Factor*') y las interleuquinas (IL)12p70, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1β.

En este ensayo se utilizan perlas de diferentes intensidades de fluorescencia, cubiertas con anticuerpos de captura. El sistema se revela

con anticuerpos anticitoquinas conjugados con PE (*Phycoerithrin*) para el TNF y para las interleuquinas IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 β .

La fluorescencia producida por las esferas se midió en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences) y analizó con el software CBA Folder Excel 98 (BD Biosciences). Los sobrenadantes de 3 experimentos independientes se analizaron por duplicado.

3.5.11. Análisis de la expresión de genes de citoquinas mediante PCR en tiempo real

Para los análisis de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa se realizaron infecciones *in vitro* como las descritas en la sección 3.5.10. Tras 24 horas, se retiró el medio de cultivo celular y se lavaron las células con tampón PBS. Posteriormente, se añadió 1 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen) a cada pocillo y se procedió a extraer y purificar el ARN total mediante el siguiente protocolo:

Se homogeneizó el lisado celular con micropipeta y se transfirió a un tubo Eppendorff de 2 ml. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente. Se incubó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g, durante 15 min, a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se precipitó con 0,5 ml de isopropanol. Se mezcló bien y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g, durante 10 min, a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración, utilizando un dispositivo conectado a una bomba de vacío. Se lavó con 1 ml de etanol al 75% (v/v) preparado con agua libre de RNAsas y se agitó en vórtex. Se centrifugó a 12000 g, durante 5 min, a 4°C. Se retiró el sobrenadante por aspiración y se dejó secar al aire durante varios minutos. El precipitado se disolvió en agua libre de RNAsas y se congeló a -80°C.

Antes de la reacción de PCR en tiempo real las preparaciones de ARN se trataron con el reactivo TURBO DNA-*free* (Ambion) para eliminar posibles trazas de ADN contaminante.

Posteriormente, se obtuvo el ADN complementario (cDNA) por retrotranscripción de 200 ng de ARN, utilizando el kit iScript™ cDNA synthesis (BioRad). La amplificación y marcaje del cDNA se realizó utilizando el kit Sso Fast Evagreen MasterMix (BioRad), en un termociclador CFX96 (BioRad). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la RT-PCR se muestran en la tabla 5. Como controles internos, se utilizaron los genes humanos codificantes para gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y β -actina.

Gen	Cebadores	Referencia	Tamaño del Amplicón
IL-6	(5'→3')- CAATCTGGATTCAATGAGGAGAC (3'→5')- CTCTGGCTTGTTCTCACTACTC	Girault y cols., 2002	118 bp
IL-8	(5'→3')- GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA (3'→5')- CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC	Birkenkamp-Demtroder y cols., 2002	129 bp
GAPDH	(5'→3')- GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG (3'→5')- GAGCCCCAGCCTTCTCCATG	West y cols., 2004	120 bp
β-actina	(5'→3')- GCCAACC GCGAGAAGATGA (3'→5')- CATCACGATGCCAGTGGTA	Este trabajo	120 bp

Tabla 5. Cebadores usados para la RT-PCR

Para el diseño de cebadores complementarios al gen de β -actina se utilizó el programa PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>). La especificidad de los productos de PCR se determinó mediante el análisis de las curvas de melting, y por electroforesis en geles de agarosa al 2%, para confirmar que el tamaño de los productos era el esperado.

3.5.12. Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los experimentos de adherencia, invasión y supervivencia intracelular fueron analizados utilizando los test de Tukey o T de Student y ANOVA. Dependiendo del ensayo, la significancia se estableció en $p < 0.05$ o $p < 0.01$.

Para los ensayos de PCR cuantitativa, el ciclo umbral [Ct (*cycle threshold*)] de cada muestra y la adquisición de los datos se llevó a cabo mediante el software CFX-Manager (BioRad), y el punto de corte para considerar un resultado positivo se estableció en un valor Ct de 35. Se utilizó el método (Δ Ct) para todos los análisis de datos. Un valor de *P* menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

3.5.13. Tratamiento con inhibidores

Se estudió el efecto de los compuestos Citocalasina-D, Wortmanina, y Nocodazol sobre la internalización de *R. equi* en las células epiteliales de pulmón A549. Dichos compuestos se utilizaron a concentraciones de 1,97 μ M, 20 μ M y 100nM, respectivamente, durante 30 minutos. Las infecciones con bacterias se mantuvieron durante 2 horas.

El efecto del metabolismo celular sobre la entrada de las bacterias se estudió mediante la incubación de las células infectadas a 4°C, basándonos en el protocolo de Jotwani y Cutler (2004). Para ello, las placas del cultivo celular se incubaron 15 minutos a 4°C antes de ser infectadas, se realizó la infección y enseguida se volvieron a colocar a 4°C dejándose a esta temperatura durante todo el tiempo de infección (2 horas).

3.6. Sensibilidad a los antimicrobianos

En Europa existen entidades diferentes que estudian criterios para definir la actividad de los antimicrobianos contra las bacterias

patógenas. Los países que no han creado un comité nacional se remiten a los criterios publicados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Estados Unidos de América). Las divergencias en la interpretación de los diámetros de zona y los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para definir un aislado bacteriano como susceptible (S), intermedio (I) o resistente (R) han sido importantes. Dado que los criterios diferían entre países, ha sido difícil comparar los índices de resistencia a antimicrobianos. Para lograr la armonización de los métodos de prueba de los antimicrobianos usados y los puntos de corte, los Comités Nacionales (tabla 6) han constituido el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (<http://www.eucast.org>).

El EUCAST propone puntos de corte tanto para el método de difusión por disco como para la determinación de las CMI. Los puntos de corte clínicos se establecen de acuerdo a la distribución de las CMI de los aislados pertenecientes a especies específicas, a las relaciones de dosis-efecto obtenidas de estudios *in vitro*, en animales y en humanos, y a los datos clínicos relativos a las CMI obtenidas (<http://www.eucast.org>).

País	Nombre del Comité	Abreviatura
Reino Unido	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i>	BSAC
Francia	<i>Comité de l'antibiogramme de La Société Française de Microbiologie</i>	CA-SFM
Países Bajos	<i>Commissie richtlijnen gevoeligheidsbepalingen</i>	CRG
Alemania	<i>Deutsches Institut für Normung</i>	DIN
Noruega	<i>Norwegian Working Group on Antibiotics</i>	NWGA
Suecia	<i>Swedish Reference Group for Antibiotics</i>	SRGA

Tabla 6. Comités Nacionales del Antibiograma

Un microorganismo es definido como clínicamente susceptible cuando su CMI está por debajo del nivel de actividad del agente microbiano asociada a una alta probabilidad de éxito terapéutico. Un microorganismo es definido como clínicamente intermedio por un nivel de la actividad del agente antimicrobiano asociado con efecto terapéutico incierto. Un microorganismo es definido como resistente cuando el nivel de la actividad antimicrobiana está asociado con una alta probabilidad de fracaso terapéutico.

3.6.1. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) se realizó en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Para la determinación de las CMIs se utilizaron 131 cepas de *R. equi* y las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (tabla 2). Las cepas fueron cultivadas en placas agar sangre (bioMérieux) durante 18-24 horas a 37°C. Se ensayaron un total de 29 antimicrobianos.

3.6.1.1. Método de microdilución en caldo

Se realizó la aplicación del método de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI '*Clinical and Laboratory Standards Institute*'), documento M07-A9 (CLSI, 2012a) (figura 8).

Para el ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en U (Deltalab). Se prepararon éstas placas de microtitulación siguiendo las recomendaciones del CLSI, de modo que contenían las distintas concentraciones de los antibióticos (tabla 7) y fueron almacenadas a -80°C, descongelándose a temperatura ambiente unos minutos antes de su utilización.

Los aislamientos se cultivaron previamente en placas de agar sangre (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) a una temperatura de

incubación de 37°C durante 18-24 horas. El inóculo se ajustó a 0.5 U de la escala MacFarland, utilizando un densitómetro (Densimat, bioMérieux). Esta cantidad de inóculo corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Se prepararon soluciones **stock** a una concentración de 4096 mg/L de los siguientes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulánico (Sigma/GlaxoSmithKline), ampicilina (Sigma), cefalotina (Sigma), cefepima (Bristol-Myers Squibb, S.L), cefotaxima (Sigma), cefuroxima (Sigma), imipenem (Discovery Fine Chemicals), meropenem (Astra Zeneca Pharmaceuticals), penicilina G (Fluka Analytical Sigma-Aldrich), teicoplanina (Aventis Pharma), vancomicina (Sigma), amicacina (Sigma), gentamicina (Sigma), tobramicina (Sigma), clindamicina (Sigma), azitromicina (Sigma), claritromicina (Sigma), eritromicina (Sigma), espiramicina (Sigma), doxiciclina (Sigma), tetraciclina (Sigma), tigeciclina (Wyeth Pharmaceuticals), ciprofloxacina (Fluka BioChemika), levofloxacina (Aventis Pharma), moxifloxacina (Discovery Fine Chemicals), trimetoprim/sulfametoxazol (Sigma), cloranfenicol (Sigma) y daptomicina (Chiron Corporation Limited). El **stock** de rifampicina (Sigma) se preparó a una concentración máxima de 640 mg/L. Los **stocks** de trimetoprim y sulfametoxazol consistieron en soluciones iniciales de 512 mg/L y 9728 mg/L respectivamente.

Los solventes y diluyentes que se utilizaron fueron los indicados por el fabricante en cada caso. Los cálculos de los volúmenes y concentraciones se realizaron teniendo en cuenta que se debía obtener un volumen final de 100 μ L en cada pocillo de la placa de microdilución.

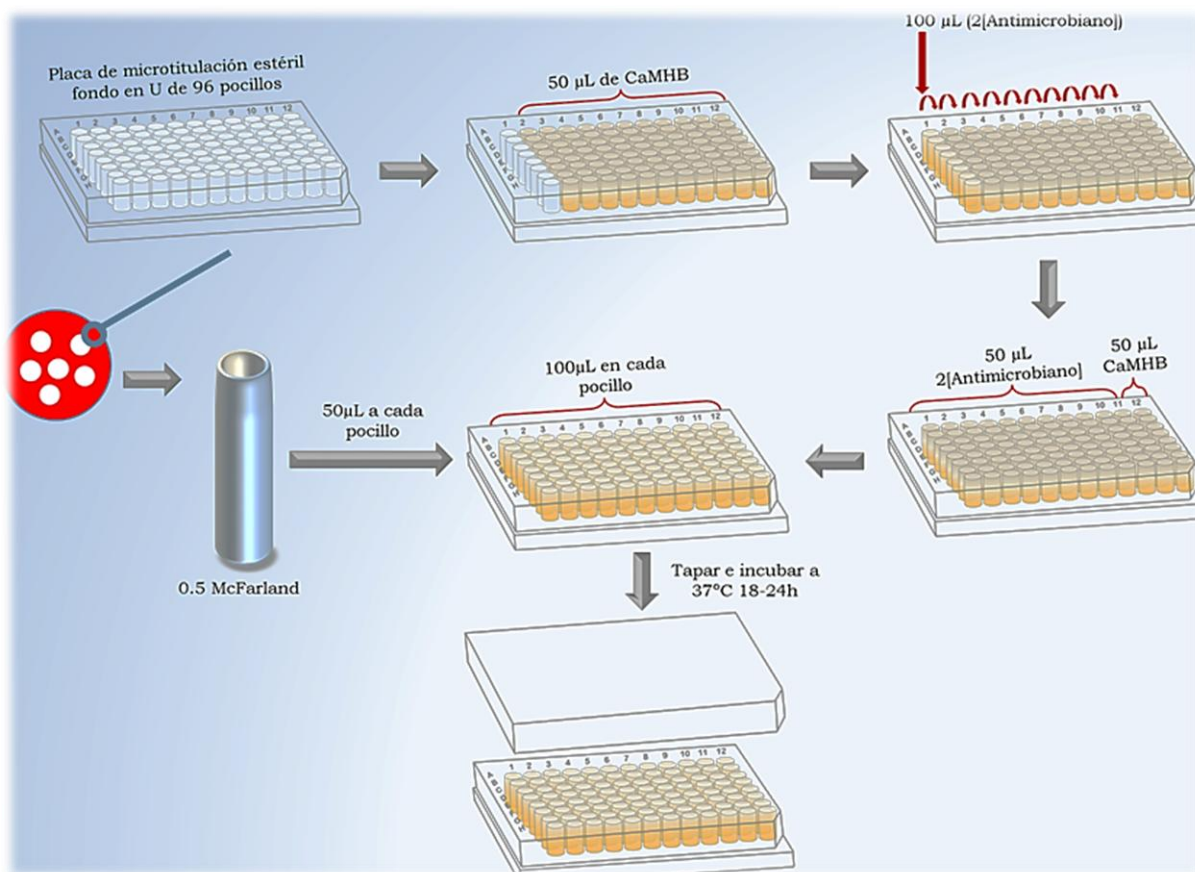


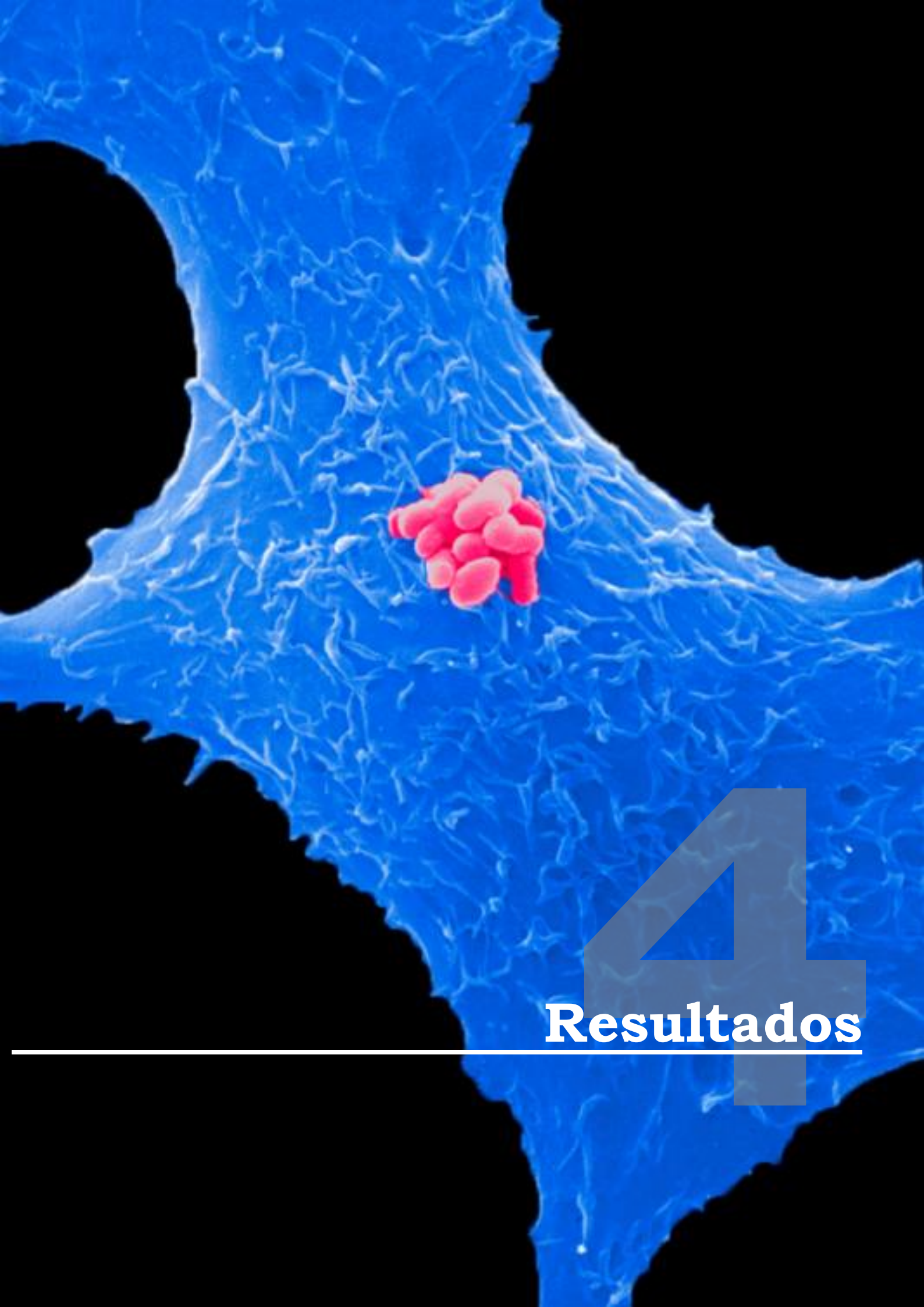
Figura 8. Proceso del método de microdilución en caldo aplicado a las cepas del estudio.

Antimicrobiano	Abreviatura ^c	Rango de diluciones (mg/L)
Amoxicilina/ác. clavulánico^a	AMX/CLV	0,125-256
Ampicilina	AMP	0,125-256
Cefalotina	CTN	0,125-256
Cefepima	CPM	0,125-256
Cefotaxima	CTX	0,125-256
Cefuroxima	FUR	0,125-256
Imipenem	IMI	0,03-64
Meropenem	MRP	0,03-64
Penicilina G	PEN	0,03-64

(Continuación)

Antimicrobiano	Abreviatura ^c	Rango de diluciones (mg/L)
Teicoplanina	TEI	0,03-64
Vancomicina	VAN	0,03-64
Amicacina	AMK	0,125-256
Gentamicina	GEN	0,125-256
Tobramicina	TOB	0,125-256
Clindamicina	CLI	0,03-64
Azitromicina	AZM	0,125-256
Claritromicina	CLR	0,125-256
Eritromicina	ERY	0,125-256
Espiramicina	ESP	0,125-256
Doxiciclina	DOX	0,03-64
Tetraciclina	TET	0,03-64
Tigleciclina	TGC	0,008-16
Ciprofloxacina	CIP	0,008-16
Levofloxacina	LEV	0,008-16
Moxifloxacina	MXF	0,008-16
Trimetoprim/sulfametoxazol^b	TMP/SXT	0,03/0,59-64/1216
Cloranfenicol	CHL	0,125-256
Daptomicina	DAP	0,03-64
Rifampicina	RIF	0,008-16

Tabla 7. Rangos de dilución de los antimicrobianos. ^a: Concentración fija de 2 mg/L de ácido clavulánico. ^b: Relación trimetoprim/ sulfametoxazol (1:19). ^c: Basado en el documento M100-S22 (CLSI, 2012b).



4

Resultados

4.1. Identificación basada en características fenotípicas y genotípicas

Durante el período 2005-2010 se aislaron en el laboratorio de Microbiología Clínica del hospital Marqués de Valdecilla 15 cepas que fueron identificadas como *R. equi* mediante el test API Coryne. De los 15 aislados, 8 presentaban unas propiedades morfológicas distintas a las típicas de *R. equi* (tabla 8).

Aislado	Tipo de colonia	Pigmentación	Superficie
RE 138	Lisa	Salmonado	Mucoide, brillante
RE 149	Lisa	Naranja	Mucoide, brillante
RE 150	Lisa	Naranja claro	Mucoide, brillante
RE 155	Lisa	Amarillo	Mucoide, brillante
RE 160	Lisa	Naranja claro	Mucoide, brillante
RE 161	Lisa	Naranja intenso	Mucoide, brillante
RE 165	Lisa	Naranja intenso	Mucoide, brillante
RE 167	Lisa	Naranja	Mucoide, brillante
DSMZ 43672	Lisa	Naranja	Mucoide, brillante
ATCC 616106	Lisa	Naranja	Mucoide, brillante
ATCC 6939	Lisa	Salmonado claro	Mucoide, brillante

Tabla 8. Características fenotípicas de 8 aislados diferentes a *R. equi*

Reacción CAMP

Se ensayó la capacidad hemolítica de los 8 aislados atípicos frente a *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* mediante la reacción CAMP (figura 9). Los resultados se muestran en la tabla 9.

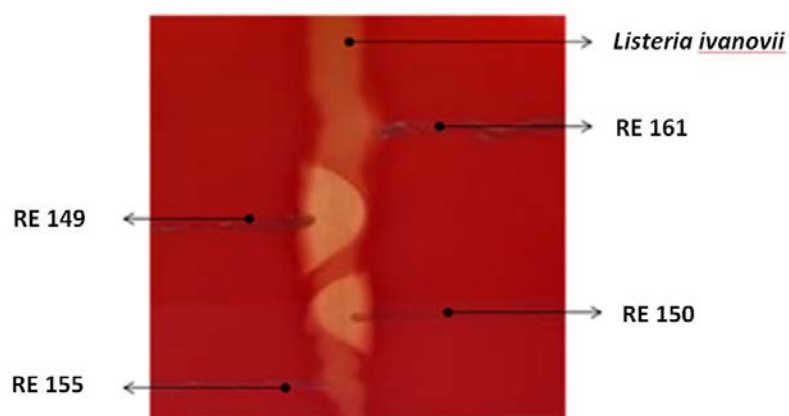


Figura 9. Fotografía de la reacción CAMP entre *L. ivanovii* y los 8 aislados atípicos.

Aislado	Test CAMP	
	<i>L. ivanovii</i> vs	<i>L. monocytogenes</i> vs
RE 138	+	+
RE 149	+	+
RE 150	+	+
RE 155	-	-
RE 160	-	-
RE 161	-	-
RE 165	-	-
RE 167	-	-
DSMZ 43672	-	-
ATCC 616106	-	-
ATCC 6939	+	+

Tabla 9. Resultados test CAMP

Test API Coryne

Los resultados del test API-Coryne pueden resumirse de la siguiente manera: todos los aislados dieron reacción positiva para catalasa y fosfatasa alcalina y negativa para utilización de glucosa, ribosa, xilosa,

manitol, maltosa, lactosa, sacarosa, glicógeno, ureasa y esculina. En la **reducción de nitratos y α -glucosidasa** se obtuvieron resultados variables. Los resultados completos de 5 aislados se muestran en la tabla 10 y en la figura 10 se observa una galería del test API Coryne.

Aislado	NIT	PYZ	PYR A	PAL	β GUR	β GAL	α GLU	β NAG	ESC	URE	GEL
RE 149	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
RE 150	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
RE 155	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RE 160	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
RE 161	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Aislado	O	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLY G	CAT	CODIGO
RE 149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1110004
RE 150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1110004
RE 155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0100004
RE 160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1110004
RE 161	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0110004

Tabla 10. Test API Coryne

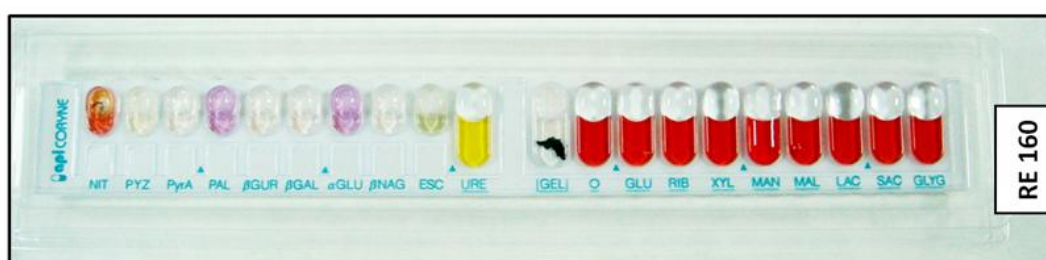


Figura 10. Galería de API Coryne con perfil numérico 1110004

Los resultados de las pruebas realizadas a los aislados corresponden a un perfil numérico. Los perfiles numéricos obtenidos como resultado de las pruebas fueron introducidos en el programa informático API CORYNE V3.0, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 11.

Aislado	Api Coryne V3.0
RE 138	98.1% <i>Rhodococcus equi</i>
RE 149	98.1% <i>Rhodococcus</i> spp
RE 150	98.1% <i>Rhodococcus</i> spp
RE 155	Posibilidad de <i>Gordonia</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Nocardia</i> o <i>Rhodococcus equi</i>
RE 160	98.1% <i>Rhodococcus</i> spp
RE 161	94.7% <i>Rhodococcus</i> spp
RE 165	98.1% <i>Rhodococcus equi</i>
RE 167	98.1% <i>Rhodococcus equi</i>

Tabla 11. Resultados de la identificación por API CORYNE V3.0

Amplificación por PCR con los cebadores COX-F y COX-R

Algunas bacterias Gram positivas con un alto contenido en G+C en su genoma, como *Rhodococcus* spp., tienen actividad colesterol oxidasa (MacLachlan *y cols.*, 2000). Este hecho sugirió que puede existir un determinante genético común para colesterol oxidasa distribuido entre los actinomicetos y otras bacterias relacionadas. La búsqueda del gen codificante para la colesterol oxidasa de los aislamientos estudiados se inició realizando una PCR con los oligonucleótidos COX (Ladrón *y cols.*, 2003). Con estos oligonucleótidos se ensayaron los 15 aislados y dos cepas de *R. equi* incluidas como controles positivos (ATCC 6939 y RE 70). Las cepa clínica RE 155, y las cepas de referencia *D.maris* DSMZ 43672 y *Dietzia* spp. ATCC 616106 dieron un producto de amplificación de 1 Kb, al igual que los controles positivos de *R. equi*, mientras que las demás cepas no se amplificaron.

Los productos de amplificación con los cebadores COX de las cepas DSMZ 43672 y ATCC 616106 fueron purificados y secuenciados. Al

comparar las secuencias mediante el programa BLASTn, se observó que había un 83% de homología con el gen *choE* de *R. equi*.

Identificación por secuenciación del gen ARNr 16S

Se secuenció el gen ARNr 16S completo de las cepas RE 138, RE 149, RE 150, RE 155, RE 160, RE 161, RE 165 y RE 167. Se trata de los aislamientos clínicos cuya identificación era dudosa por discrepancias entre los resultados de los análisis fenotípicos y la PCR con los cebadores COX. Las secuencias fueron comparadas con las de otros microorganismos depositadas en Genbank utilizando la herramienta BLASTn. En todos los casos se observó una identidad mínima del 94% con *Dietzia sp.* o con diversas especies del género *Dietzia* (tabla 12).

Aislado	Secuencia del gen RNAr 16S (pb)	Identificación basada en el gen RNAr 16S (% identidad)	Número de acceso en el GenBank
RE 138	1 424	<i>D. maris</i> DSM 43672 (99,8)	GU247959
RE 149	1 467	<i>D. schimae</i> YIM 65001 (94,6)	GQ870422
RE 150	1 468	<i>D. maris</i> DSM 43672 (99,7)	GQ870423
RE 155	1 472	<i>D. timorensis</i> ID05-A0528 (99,6)	GQ870424
RE 160	1 465	<i>D. maris</i> DSM 43672 (99,9)	GQ870425
RE 161	1 433	<i>D. natronolimnaea</i> CV46 (99,5)	GQ870426
RE 165	1 451	<i>D. natronolimnaea</i> CV46 (100)	GQ870427
RE 167	1 373	<i>D. maris</i> DSM 43672 (100)	GQ870428
ATCC 616106	-	<i>D. maris</i>	-
ATCC 6939	-	<i>R. equi</i>	-

Tabla 12. Homologías del gen ARNr 16S de las cepas estudiadas con las secuencias registradas en GenBank.

Construcción de un árbol filogenético de las cepas estudiadas basado en las secuencias de los genes ARNr 16S

El análisis filogenético basado en los genes ARNr 16S representa la relación entre los ocho aislados de *Dietzia* y *R. equi* (figura 11). El aislado RE 149 forma una rama independiente en el árbol, mientras los otros aislados se agrupan con una cepa representativa de *Dietzia*.

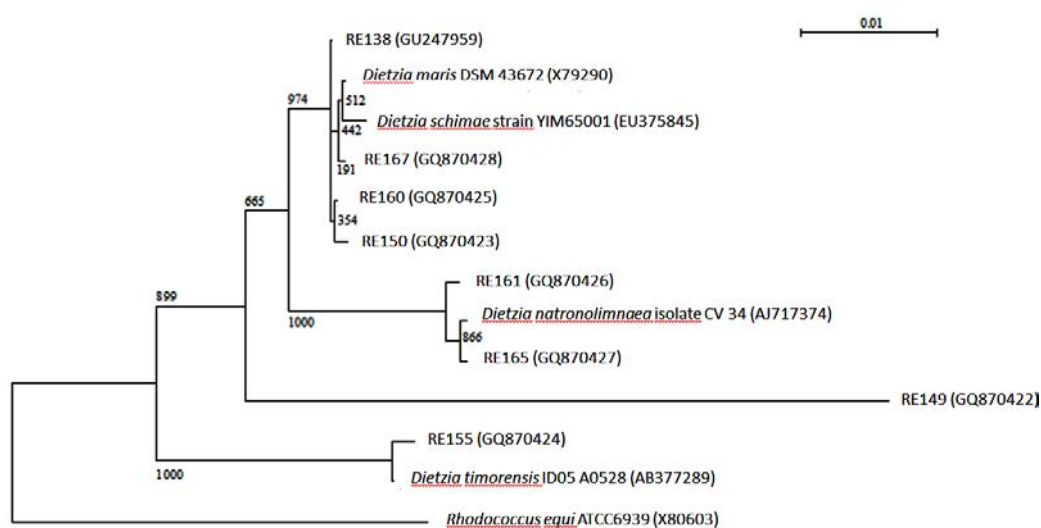


Figura 11. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ARNr 16S mostrando la relación filogenética entre los aislados identificados como *Dietzia* y las cepas representativas de *Dietzia* y *R. equi*.

4.2. Identificación mediante proteómica

Para el estudio de proteómica se utilizaron 144 cepas que en origen fueron identificadas como *R. equi*, de las cuales 60 corresponden a aislados clínicos humanos, 37 a cepas aisladas de potros con neumonía y 47 a cepas de origen ambiental.

De las 60 cepas de origen humano, 50 se confirmaron como *R. equi*; de las 37 cepas aisladas de potros con neumonía, 36 se confirmaron como *R. equi*; de las 47 cepas ambientales, 46 se confirmaron como *R. equi*. Las identificaciones se comprobaron mediante

la secuenciación del ARNr 16S y la amplificación del gen *choE* (Ladrón y cols. 2003).

Con el objetivo de poner a punto la tecnología MALDI-TOF MS para la identificación de *R. equi*, desarrollamos dos metodologías para la preparación de la muestra, y los resultados obtenidos son los que se muestran en la tabla 13.

	Método de colonia directa		Método de extracción	
	Primera lectura	Segunda lectura	Primera lectura	Segunda lectura
Score 99,9%	35(22,7%)	27(17,5%)	117(75,9%)	119(77,2%)
P201^a	88(57,1%)	72(46,7%)	6(3,8%)	5(3,2%)
P150^b	1(0,6%)	2(1,2%)	18(11,6%)	22(14,2%)
P2^c	6(3,8%)	1(0,6%)	0(0%)	0(0%)
Score menos de 99,9%	13(8,4%)	22(14,2%)	7(4,5%)	5(3,2%)
Otras posibilidades	11(7,1%)	30(19,4%)	6(3,8%)	3(1,9%)

Tabla 13. Comparación del método de colonia directa con el método de extracción para la identificación de *Rhodococcus* spp. mediante MALDI-TOF MS. ^a: Mal espectro durante la adquisición. ^b: Sin identificación. ^c: No presenta suficientes picos

Según estos resultados, los resultados del análisis por MALDI-TOF son más fiables cuando se realiza un tratamiento previo de los cultivos bacterianos con etanol.

4.3. Interacción de *R. equi* con células epiteliales

Se estudió la interacción de *R. equi* con las células epiteliales de la línea A549 utilizando 16 cepas aisladas de pacientes humanos (tabla 14). Como controles se usaron las cepas de ATCC 33701 y su derivada ATCC 33701-, en la que se ha eliminado el plásmido de virulencia.

4.3.1. Análisis TRAVAP de los aislados de *R. equi*

En las cepas estudiadas se observaron las cuatro categorías TRAVAP, los resultados de la presencia de los marcadores *traA* y *vapA/vapB* se muestran en la tabla 14. Ocho aislados pertenecen a la categoría *traA*⁺/*vapA*⁺*B*⁻, cuatro aislados a *traA*⁺/*vapA*⁻*B*⁺, dos aislados a *traA*⁺/*vapAB*⁻ y dos aislados *traA*⁻/*vapAB*⁻. Estos resultados confirman estudios previos (Ocampo-Sosa *y cols.*, 2007) en los que las cepas de *R. equi* de origen humano presentan una completa variedad de tipos TRAVAP.

4.3.2. Morfología de las colonias

Las morfologías de los 16 aislados se muestran en la tabla 14. Cuatro cepas fueron clasificadas como de mucosidad alta (Fenotipo A), diez cepas fueron mucoides (Fenotipo B) y dos no mucoides (Fenotipo C).

4.3.3. Formación de Biocapas

Se estudió la capacidad de las cepas de *R. equi* de formar biocapas, para establecer si esta propiedad está relacionada con la adherencia a células epiteliales. De las cepas estudiadas, ninguna formó una biocapa robusta, excepto la cepa RE55, que formó una biocapa consistente y

fácilmente visualizable como un anillo de bacterias adheridas a la pared del pocillo, tanto en las placas de 48 pocillos, como en las placas de 24 pocillos.

Esta película se formó únicamente en la interfase aire-líquido, y se observó tanto por tinción con CV (figura 12) como por SEM (figura 13). Por otra parte, todas las cepas mucoides mostraron autoaglutinación, mientras que las cepas no mucoides no lo hicieron (figura 14).

Cepa	<i>traA</i>	<i>vapA</i>	<i>vapB</i>	Tipo de colonia ^a
RE6	+	+	-	B
RE7	+	-	+	B
RE9	+	+	-	B
RE23	+	-	-	A
RE37	+	-	-	C
RE38	+	+	-	B
RE39	+	+	-	A
RE40	+	+	-	B
RE55	-	-	-	C
RE56	-	-	-	B
RE61	+	-	+	B
RE62	+	-	+	A
RE70	+	+	-	B
RE156	+	-	+	A
RE158	+	+	-	B
RE163	+	+	-	B
ATCC 33701	+	+	-	B
ATCC 33701⁻	-	-	-	B

Tabla 14. Cepas bacterianas usadas en este estudio y sus características TRAVAP.

^a Clasificación ABC: el tipo A son colonias mucoides y coalescentes; el tipo B son colonias mucoides y no coalescentes; el tipo C fueron colonias no mucoides y de aspecto seco.

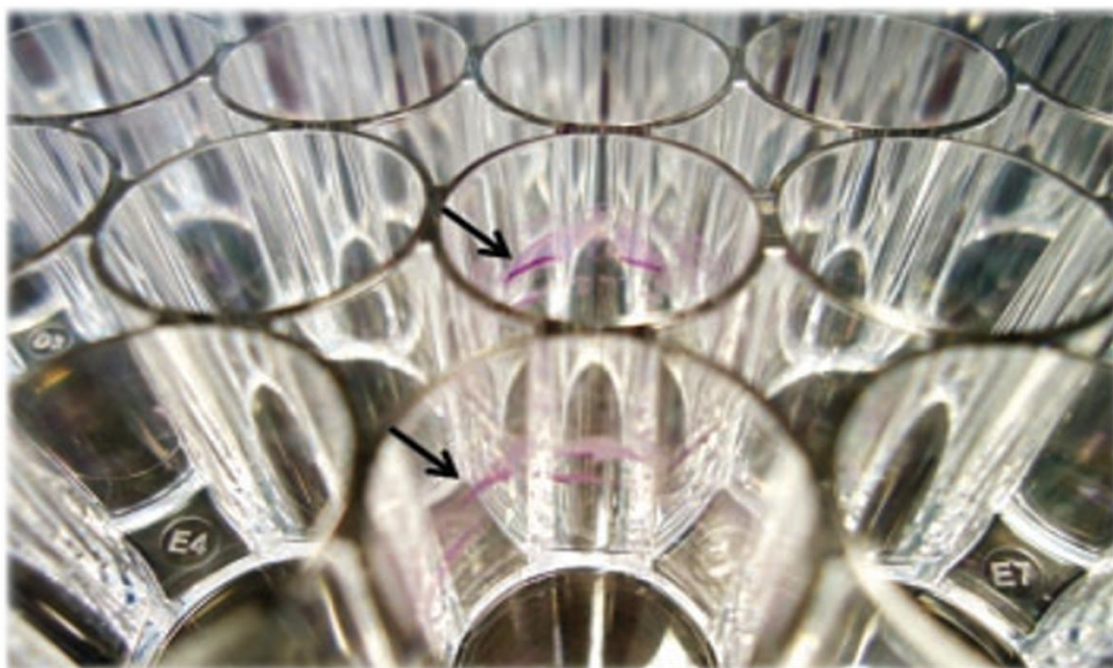


Figura 12. Tinción con CV de las biocapas formadas por la cepa *R. equi* RE55 en placas de 48 pocillos (las flechas indican el anillo de bacterias teñido con CV).

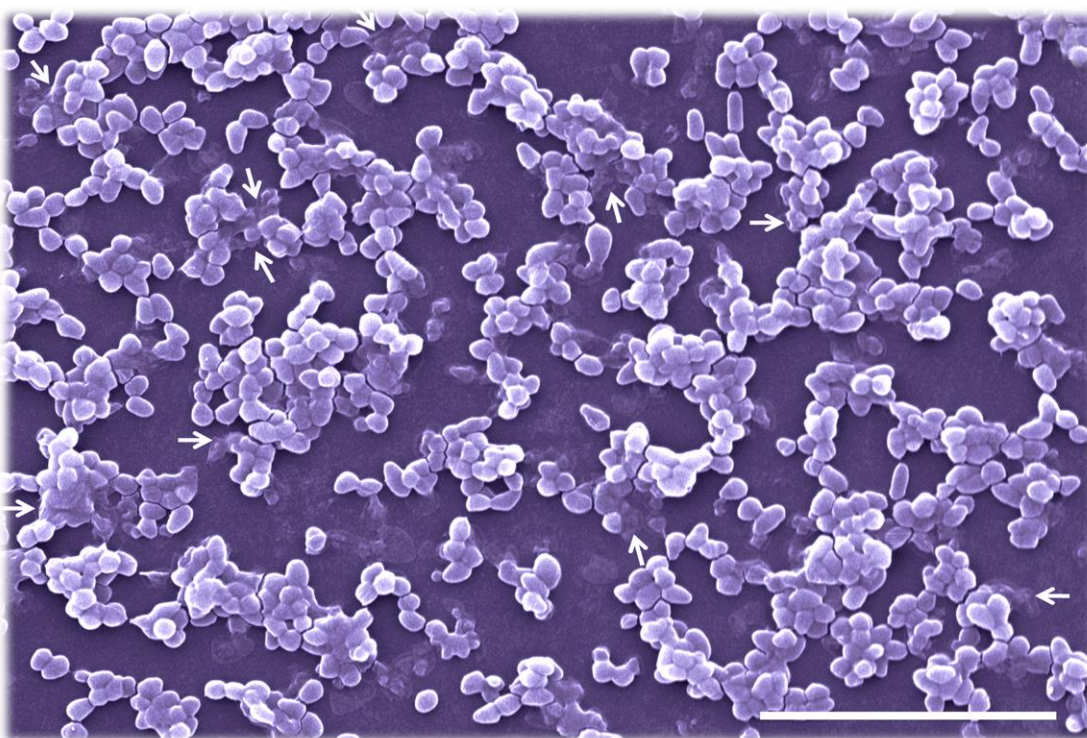


Figura 13. Microfotografía de SEM de las biocapas formadas por *R. equi* *in vitro*. Se observan formas cocoides y bacilares que parecen fusionadas entre sí y con la matriz de la biocapa, la cual a su vez está firmemente unida al soporte de plástico (indicado por las flechas). Magnificación $\times 8000$. Barra = 10 μm .

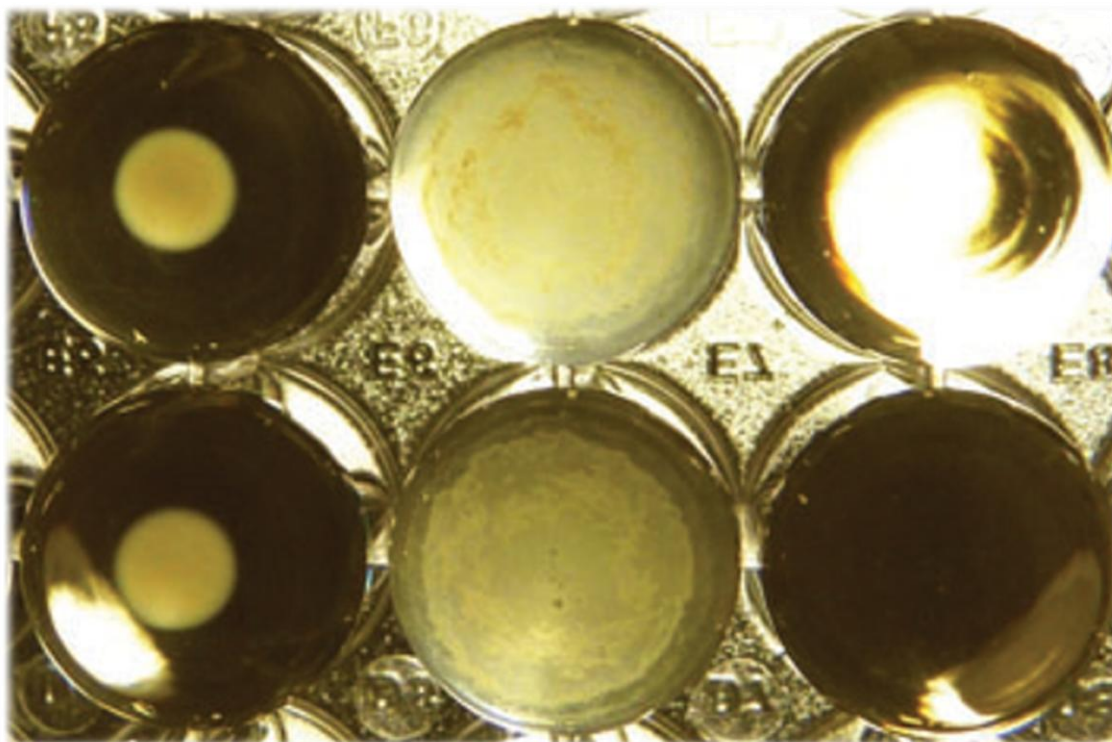


Figura 14. Autoaglutinación de *R. equi*. Las cepas mucoides mostraron autoaglutinación cuando se incubaron en BHIB en placas de 96 pocillos, mientras que las cepas no mucoides no mostraron esta autoaglutinación. Los pocillos de la izquierda se inocularon con la cepa 103⁺, los pocillos del centro con la cepa RE55 y los pocillos de la derecha son los controles sin inóculo.

En cuanto a la adherencia, las cepas RE23, RE37 y 103⁺ mostraron un grado de adherencia a las células epiteliales medio o bajo. Las cepas RE55 y 103⁻ mostraron un alto grado de adherencia. Decidimos utilizar estas dos cepas no mucoides para los siguientes ensayos de adherencia e internalización.

Las células epiteliales fueron colonizadas en algunos casos por grupos de bacterias, que mostraron un patrón localizado de adherencia, o por bacterias individuales, con un patrón de adherencia difuso. El proceso de adhesión de *R. equi* está mediado por el contacto íntimo entre las bacterias y las microvellosidades celulares, las cuales parecían entrar en contacto primeramente con un polo de las bacterias, y posteriormente, extendiéndose a toda la longitud bacteriana (figuras 15 y 16).

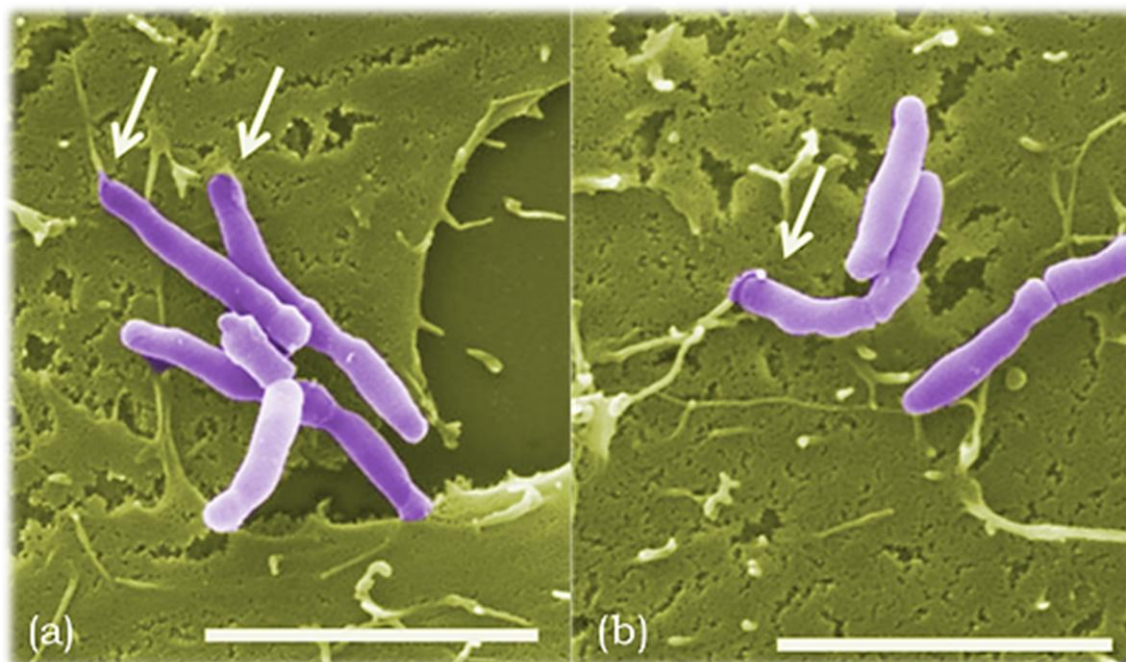


Figura 15. Microfotografías de SEM de células A549 infectadas con la cepa *R. equi* RE55. (a y b) Se observa la presencia de microvellosidades celulares que están en estrecho contacto con un polo de las bacterias (indicado por las flechas). Las microfotografías fueron originalmente capturadas a una magnificación de $\times 15000$. Barra = 5 μm .

Figura 16.

Microfotografía de SEM de células A549 infectadas con la cepa *R. equi* RE55. Este contacto parece inducir el proceso de entrada donde las protuberancias celulares envuelven a la bacteria. Las microfotografías fueron capturadas originalmente a una magnificación de $\times 20000$. Barra = 5 μm .



4.3.4. Adherencia e internalización de *R. equi* en las células A549

La interacción de las cepas de *R. equi* con las células A549 se estudió mediante ensayos de protección con vancomicina, microscopía confocal, de barrido y de inmunofluorescencia. Mediante estas técnicas se observó que todas las cepas de *R. equi* mostraban adherencia a las células A549 y que las bacterias eran capaces de penetrar las mismas (figura 17).

Los niveles de adherencia variaban dependiendo de la cepa de *R. equi* usada y la fase de crecimiento bacteriano. Las bacterias recogidas a las 48 horas fueron más adherentes que aquellas recogidas a las 24 horas (figura 18). La microscopía confocal indicó que las bacterias intracelulares están rodeadas del citoesqueleto de actina de las células pulmonares, y se localizan de forma dispersa en el citoplasma y también en la región perinuclear (Anexo 8.1).

En los ensayos de protección con vancomicina, la cepa RE55 mostró la máxima eficiencia de invasión (figura 19). En otra serie de experimentos, la internalización de las cepas se evaluó con diferentes concentraciones bacterianas y un número fijo de células A549 por pocillo. Para este ensayo se recogieron bacterias tras 48 horas de crecimiento, y el número de bacterias intracelulares aumentó proporcionalmente al número de bacterias añadidas (figura 20).

Los experimentos realizados con las células A549 tratadas con citocalasina-D y posteriormente infectadas con las cepas de *R. equi* demostraron que este compuesto no inhibe la invasión de *R. equi* en las células de pulmón (figura 21).

La internalización de las cepas de *R. equi* tampoco fue totalmente dependiente del metabolismo celular como se evidenció en los experimentos llevados a cabo a 4°C (figura 21).

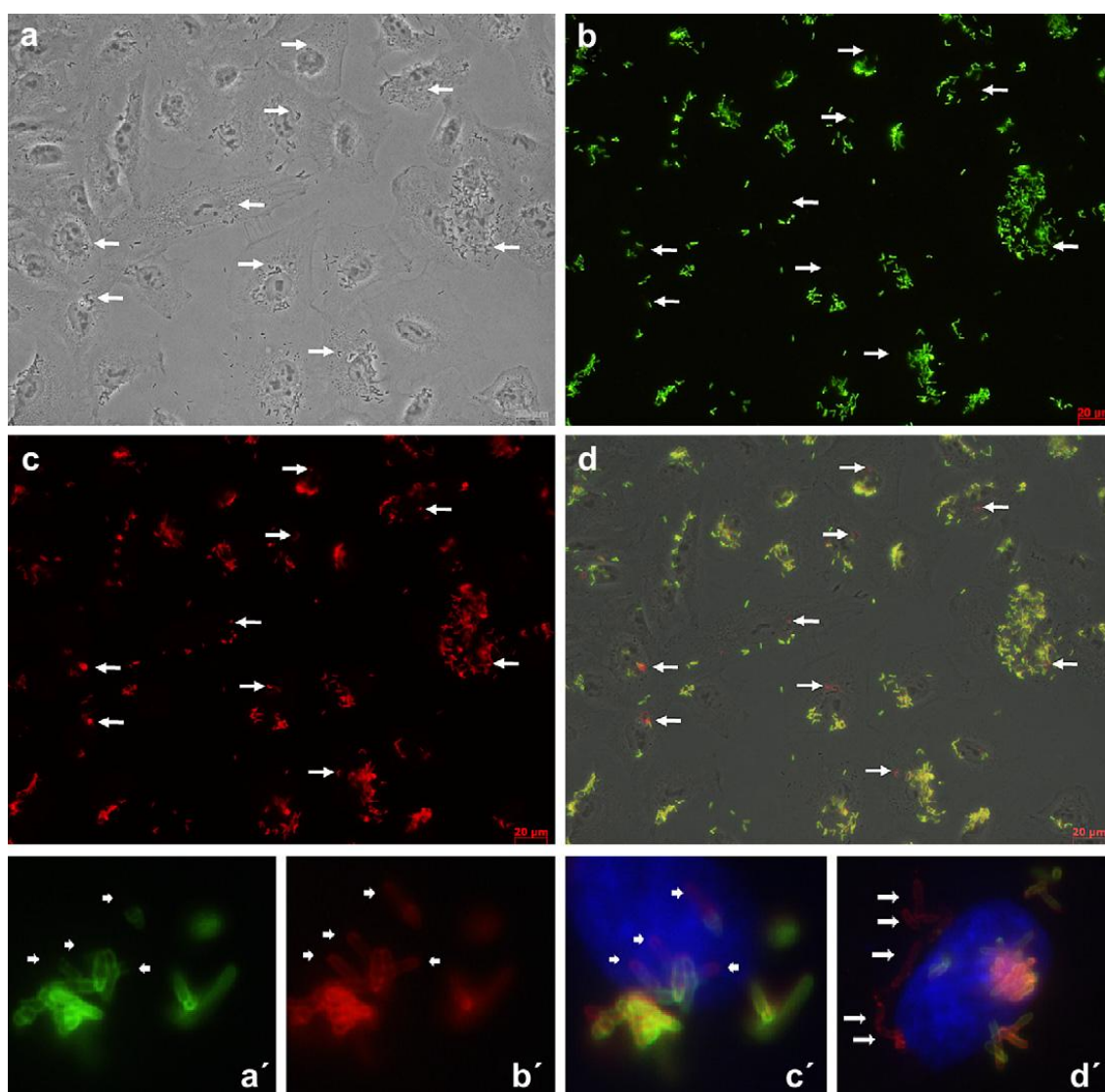


Figura 17. Adherencia e internalización de *R. equi* en las células A549. Las células A549 fueron infectadas durante 120 minutos con la cepa RE55 (cepa muy adherente), fijadas y procesadas por inmunofluorescencia doble. Microfotografía en contraste de fases de las células A549 después de la infección y pasos de lavado (a). Las bacterias extracelulares fueron detectadas con anticuerpo de conejo anti-*R. equi* en células no permeabilizadas (b, a´). Las bacterias totales (extracelulares + intracelulares) fueron detectadas con el mismo anticuerpo en células permeabilizadas (c, b´). Al superponer las imágenes, las bacterias extracelulares se muestran en color verde o amarillo y las bacterias intracelulares en rojo (d, c´, d´). Las flechas indican algunas bacterias intracelulares (a, c, d, d´) o su localización (b). Las flechas en los paneles inferiores (a´, c´) muestran algunas bacterias penetrando en las células y/o que ya están dentro (d´). La tinción del núcleo celular con DAPI se observa en azul (c´, d´). Las microfotografías fueron originalmente capturadas con un aumento de $\times 400$ (a-d) o de $\times 1000$ (a´-d´). Las barras de escala representan una longitud de $20 \mu\text{m}$.



Figura 18. Experimentos de adherencia. Las células A549 fueron infectadas con las cepas de *R. equi* durante 120 minutos. Las cepas de *R. equi* fueron cultivadas durante 24 horas (barras celestes) o 48 horas (barras azules) y se usaron 10 μ L del cultivo bacteriano para las infecciones. *Indica una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) entre los resultados obtenidos con la cepas crecidas durante 48 horas con respecto a las crecidas durante 24 horas.

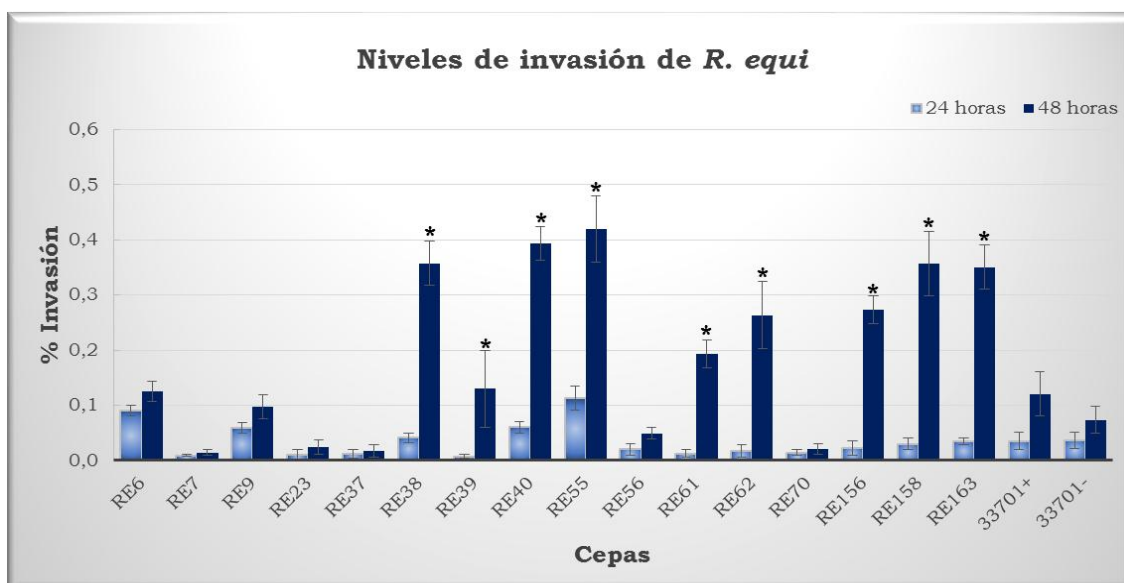


Figura 19. Relación entre los niveles de invasión de *R. equi* y la fase de crecimiento. Las células A549 fueron infectadas con las cepas de *R. equi* durante 120 minutos. Las cepas de *R. equi* fueron cultivadas 24 horas (barra celeste) o 48 horas (barra azul) y se usaron 10 μ L del cultivo bacteriano para las infecciones. *Indica una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) entre los resultados obtenidos con la cepas crecidas durante 48 horas con respecto a las crecidas durante 24 horas.

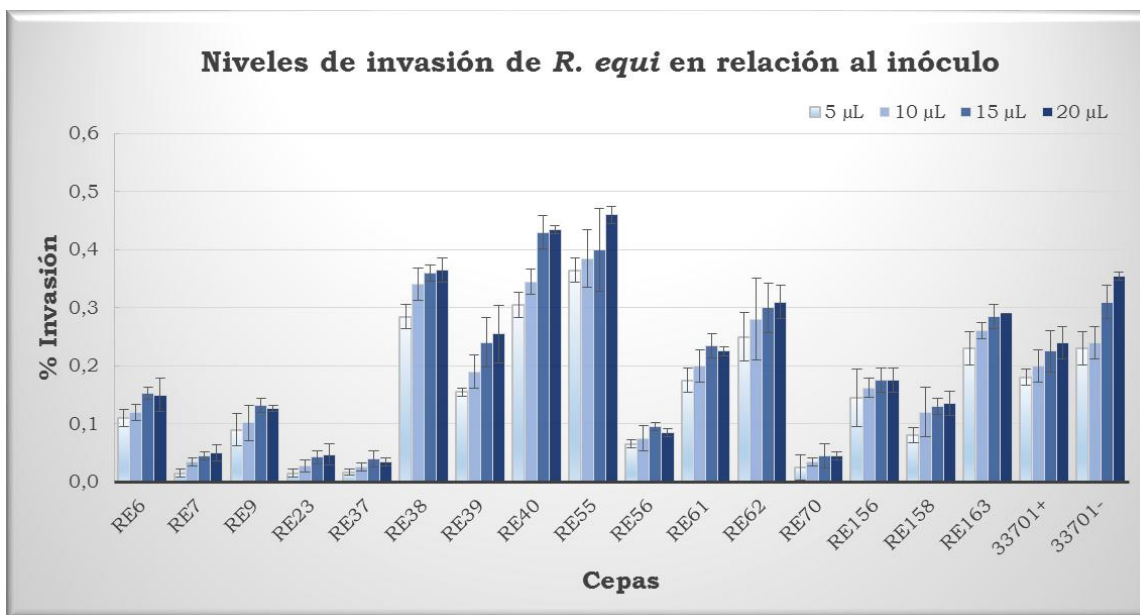


Figura 20. Relación entre los niveles de invasión de *R. equi* y el número de bacterias inoculadas. Las células A549 fueron infectadas con *R. equi* durante 120 minutos. Las cepas de *R. equi* fueron cultivadas por 48 horas. Los experimentos de invasión fueron realizados con 5, 10, 15 y 20 µL del cultivo bacteriano.

Se realizaron una serie de experimentos destinados a determinar si la viabilidad de la bacteria era necesaria para su internalización. Para ello, los cultivos bacterianos se trataron con calor, luz UV y formalina. Las bacterias tratadas no aparecieron dentro de las células, demostrando que la internalización requiere de la viabilidad bacteriana.

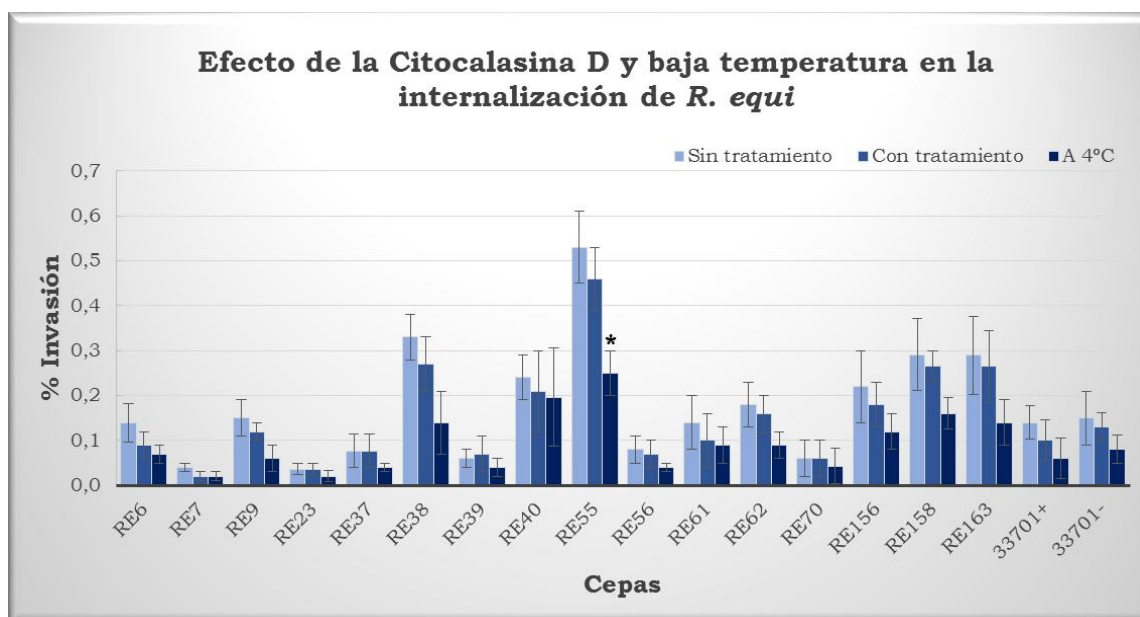


Figura 21. Efecto de la citocalasina D y del frío en la internalización de *R. equi*. Las cepas fueron crecidas 48 horas. Las células A549 fueron infectadas 10 μ L de cultivo de *R. equi* durante 120 minutos. Cada ensayo de invasión fue realizado por triplicado. *Indica diferencia altamente significativa ($P < 0.01$).

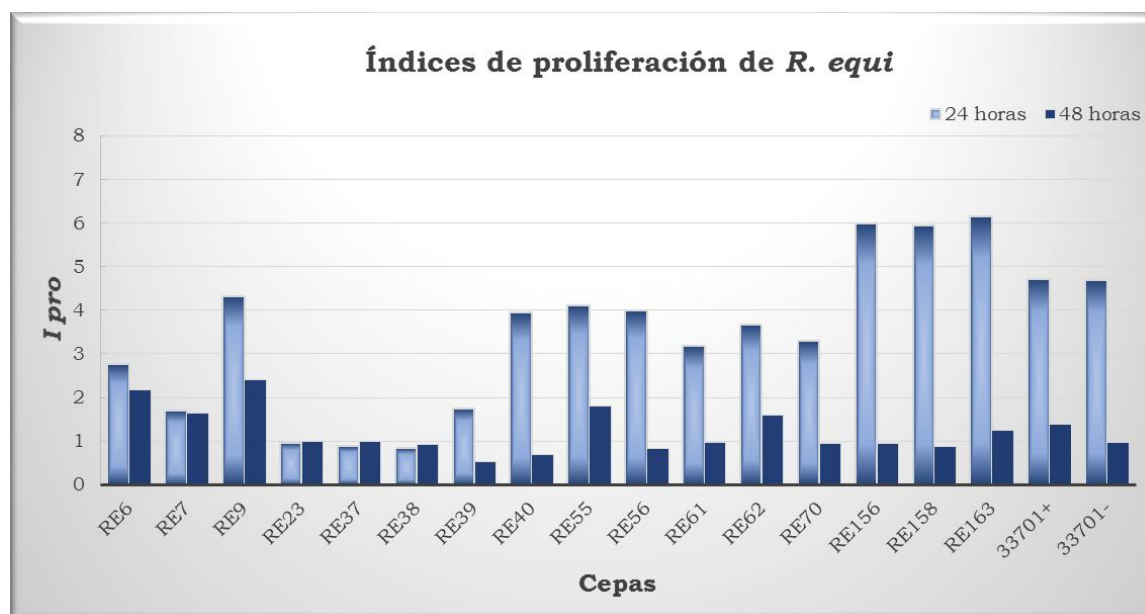


Figura 22. Índices de proliferación de *R. equi* después de 24 horas de infección de las células A549. Las cepas de *R. equi* fueron cultivadas durante 24 Horas (barras celestes) o 48 horas (barras azules). Las células A549 fueron infectadas con las cepas de *R. equi* durante 120 minutos y mantenidas hasta 24 horas. $I_{pro} > 1$ indica proliferación celular. $I_{pro} = 1$ indica que no hubo proliferación ni muerte de bacterias. $I_{pro} < 1$ indica muerte intracelular.

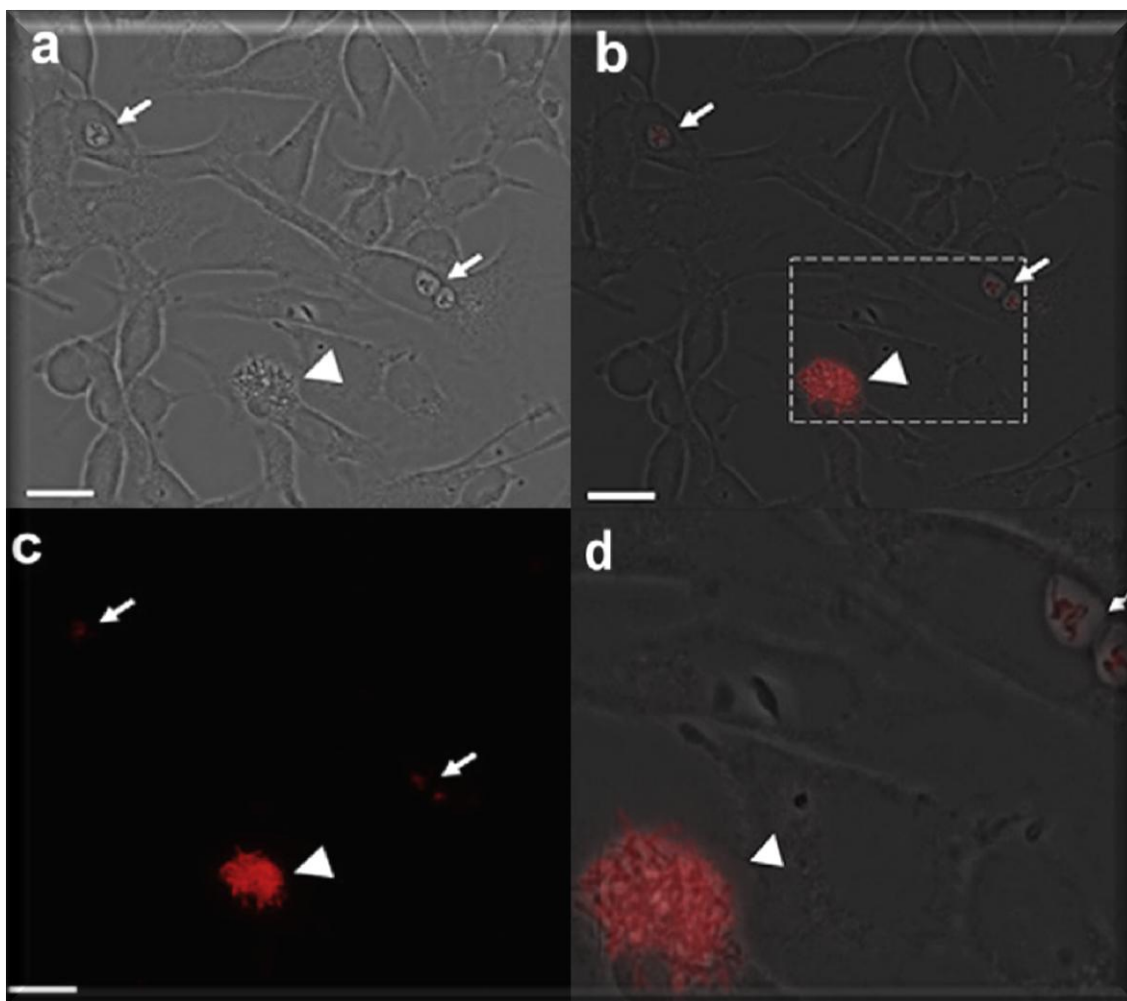


Figura 23. Células A549 infectadas durante 120 minutos con la cepa *R. equi* RE55 y mantenidas hasta las 24 horas. Las células fueron lavadas, fijadas y procesadas para el marcaje de fluorescencia. Las bacterias intracelulares fueron marcadas con el antisuero de conejo anti-*R. equi* y con el anticuerpo secundario Alexa 594. Panel (a) contraste de fase. En el panel (b) se observa la mezcla con el canal fluorescente. En el panel (c) se observa solo el canal fluorescente con las bacterias en rojo. El panel (d) muestra una ampliación del panel (b), donde se observa una microcolonia de bacterias (cabeza de flecha). Las flechas indican bacterias que están dentro de vacuolas. Barra (a-c)=20µm.

La mayoría de las cepas invasivas fueron capaces de proliferar después del periodo de supervivencia intracelular inicial y sobrevivieron durante al menos 24 horas (figura 22). Las bacterias recogidas a las 24 horas de crecimiento fueron más proliferativas que las recogidas a las 48 horas de cultivo.

La mortalidad celular fue menor del 2% tanto en los cultivos no infectados como en los infectados con la mayoría de cepas de *R. equi*, tras 24h de infección. Pero, cuando se realizaron las infecciones con la cepa RE55 que, no posee plásmido de virulencia, la citotoxicidad fue de hasta el 6 %. Las otras cepas sin plásmido (RE56 y ATCC 33701⁻) no produjeron citotoxicidad significativa con respecto a los controles. Después de 24 horas de infección, bacterias de la cepa RE55 se encontraban en el interior de vacuolas, o en multiplicación activa dentro de las células. Mediante microscopía se observó en algunos casos la destrucción de las células epiteliales (figura 23).

4.3.5. Mecanismos de entrada de *R. equi* en las células epiteliales

Las microfotografías de SEM mostraron que las cepas RE55 y 103⁻ fueron capaces de penetrar en las células A549 con facilidad. La morfología más frecuente mostró un mecanismo de entrada tipo *zipper* (cremallera), bien definido. Durante el proceso de entrada, la membrana de la célula hospedadora envolvía a modo de bolsillo a la bacteria (figura 24). Se observó otra morfología menos frecuente, con grandes **invaginaciones, que parecían "agujeros" en la membrana de la célula hospedadora** (figura 25). Después de 2 horas tras las infecciones, algunas bacterias ya se localizaban bajo la membrana plasmática de las células A549 (figura 26).

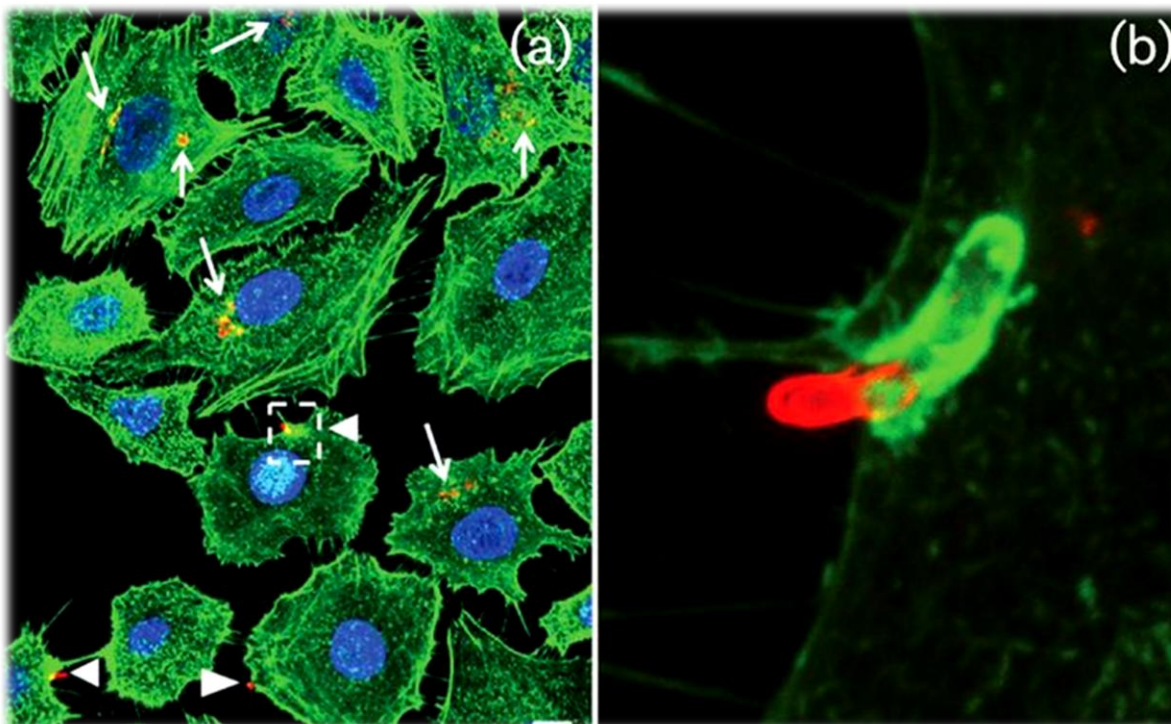


Figura 24. Internalización de *R. equi* en las células A549. Las células A549 se infectaron durante 120 minutos con la cepa RE55, se fijaron y se procesaron para inmunofluorescencia. (a) En las células permeabilizadas las bacterias fueron detectadas con anticuerpos de conejo anti-*R. equi*. Las flechas indican los grupos de bacterias y las puntas de flecha indican las bacterias individuales en estrecho contacto con las células epiteliales, los núcleos de las células están marcados en azul, con DAPI. (b) Imagen ampliada de la zona del cuadrado punteado en (a), se observa una bacteria que penetra en una célula y está parcialmente rodeada por la actina celular (en verde). Las microfotografías fueron originalmente capturadas con una ampliación de $\times 400$ (a) y $\times 600$ (b). Barra = 10 μm .

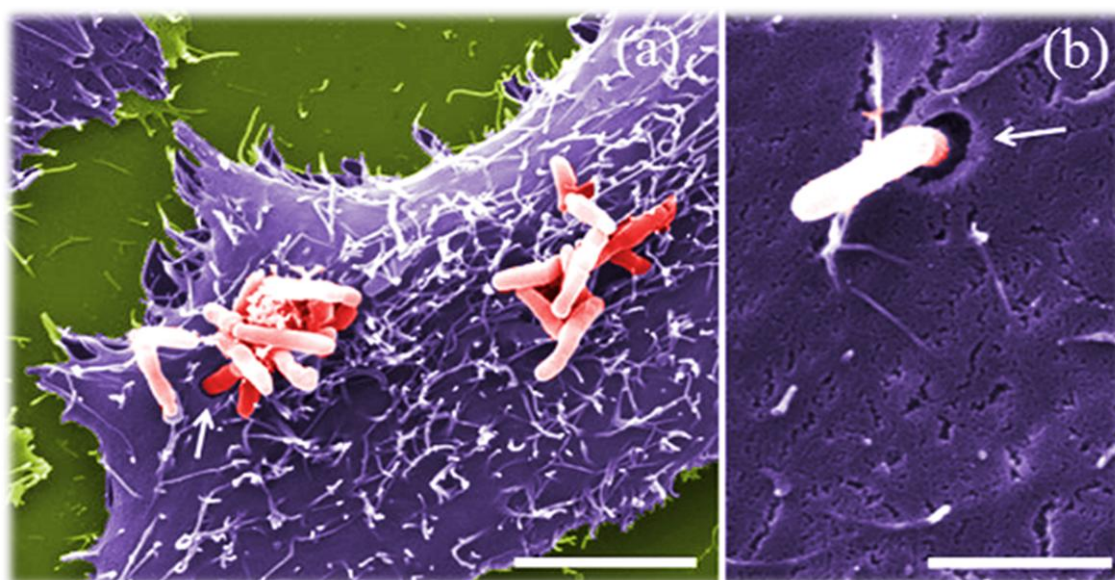


Figura 25. Internalización de *R. equi* en las células A549. Las células A549 se infectaron durante 120 minutos con la cepa RE55 se fijaron y procesaron para SEM. En (a) y (b) se observan bacterias en el proceso de invasión (indicado por las flechas), después de la generación de invaginaciones de la membrana celular a nivel del área de contacto con la bacteria. Las microfotografías fueron originalmente capturadas con una magnificación de $\times 15\ 000$ (a) y $\times 18\ 000$ (b). Barras = $5\ \mu\text{m}$.

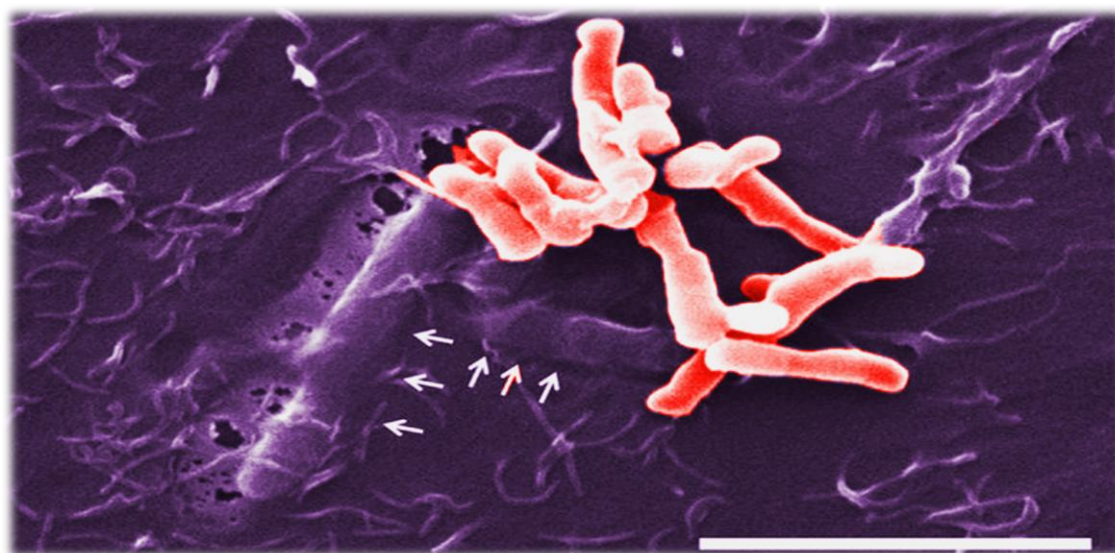


Figura 26. Internalización de *R. equi* en las células A549. Las células A549 se infectaron durante 120 minutos con la cepa RE55 se fijaron y procesaron para SEM. La microfotografía muestra bacterias que ya han entrado en la célula hospedadora. La membrana de la célula se encuentra alrededor de varias bacterias envolviéndolas completamente (señalado con las flechas). Las microfotografías fueron tomadas originalmente con una magnificación de $\times 10\ 000$. Barra = $5\ \mu\text{m}$.

De nuevo se realizaron nuevos ensayos de infección para cuantificar la supervivencia intracelular, que fue muy variable en las cepas estudiadas (figura 27). Después de 24 horas de infección, las cepas RE55 y 103⁻ se observaron con frecuencia en el interior de estructuras de tipo vacuolar (figura 28). En algunos casos, se observaron células epiteliales destruidas después de la infección con la cepa RE55 (figura 28 y 29), 103⁺ y 103⁻, pero no con las cepas RE23 y RE37.

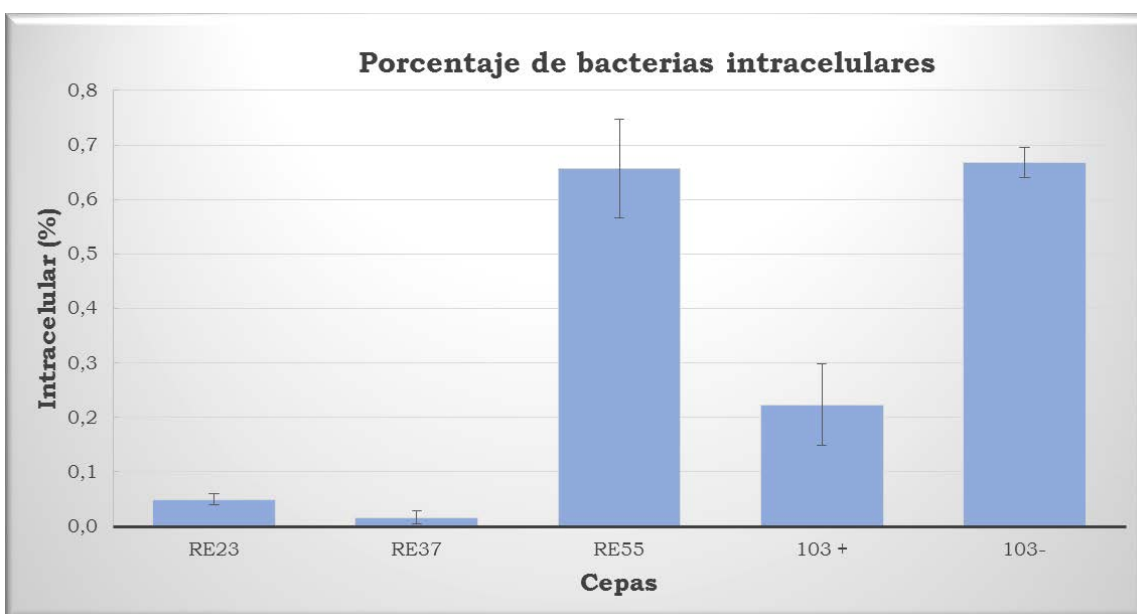


Figura 27. Cuantificación de la supervivencia intracelular. Las células A549 se infectaron con las cepas de *R. equi* durante 120 minutos. Después de 24 horas, se lisaron y se cuantificó el número de bacterias intracelulares. Los datos se expresan como el promedio \pm SD (desviación estándar) de tres experimentos independientes.

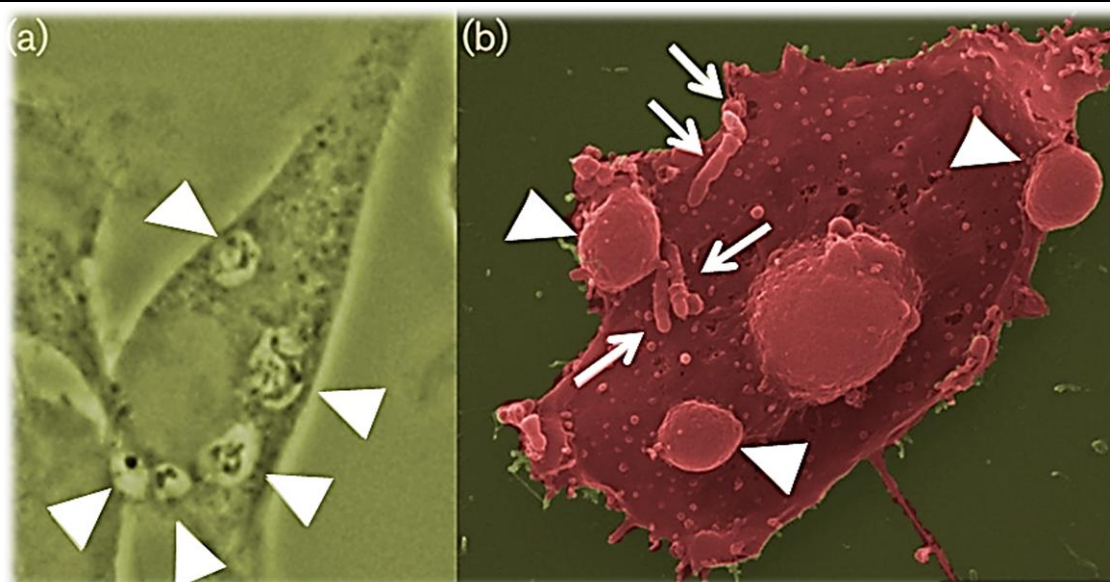


Figura 28. Células A549 infectadas con la cepa *R. equi* RE55 durante 24 horas. En la microfotografía (a) se observa una célula epitelial con varios compartimentos de tipo vacuolar llenos de bacterias intracelulares (puntas de flecha). En (b) se observa una célula epitelial dañada con protuberancias (puntas de flecha) y bacterias que posiblemente están emergiendo del interior celular (flechas). Magnificación (a) $\times 400$ y la (b) $\times 15000$. Barra = 5 μm .

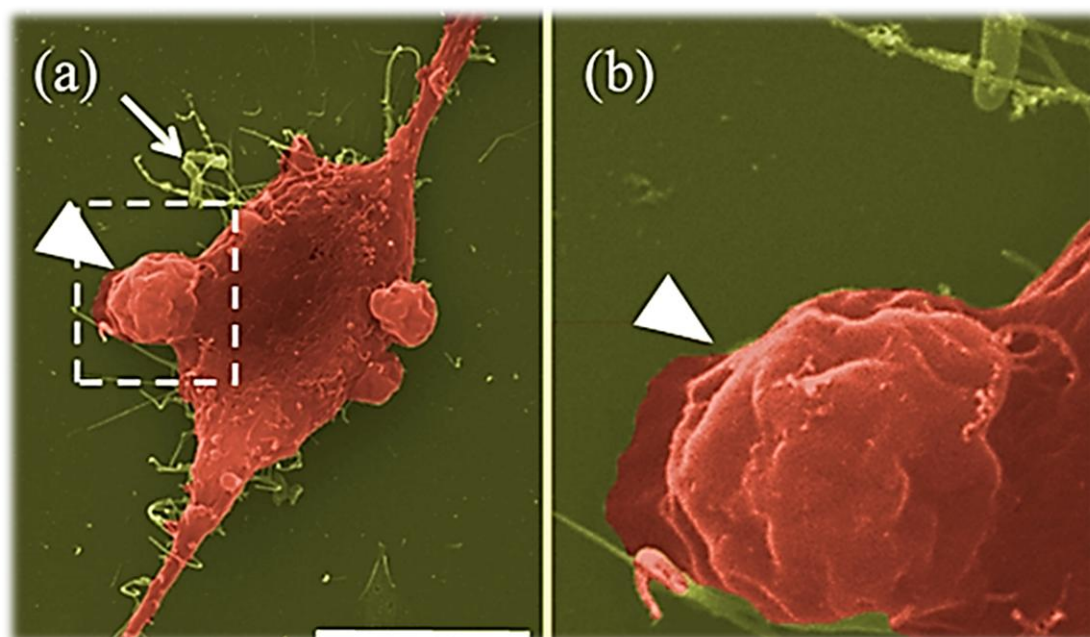


Figura 29. Células A549 infectadas con la cepa *R. equi* RE55 durante 24 horas. En la microfotografía (a) se observa una célula epitelial con protuberancias que están ocupadas por bacterias intracelulares (punta de flecha). La flecha indica bacterias libres en estrecho contacto con las células dañadas. En la microfotografía (b) se amplía el recuadro de la microfotografía (a). Las microfotografías fueron tomadas originalmente a una ampliación de $\times 8000$. Barra = 10 μm .

Con el fin de determinar el mecanismo celular necesario para la entrada de bacterias, las células fueron tratadas antes de las infecciones con nocodazol, para inhibir la polimerización de los microtúbulos, o con wortmanina, para inhibir la formación de macropinosomas. La invasión de bacterias de la cepa RE55 se redujo con el tratamiento previo con nocodazol (reducción hasta el $40,6 \pm 17,7$ % de la entrada respecto a las células no tratadas previamente) y con wortmanina (reducción hasta el $56,8 \pm 4,2$ % de la entrada respecto a las células no tratadas previamente).

Además, la pre-incubación de la cepa RE55 con antisuero policlonal de conejo anti-*R. equi* dio como resultado una reducción drástica en la invasión (reducción hasta el $23,8 \pm 12,2$ % de la entrada respecto a la cepa no tratada previamente).

4.3.6. Inducción de citoquinas proinflamatorias en células A549

La expresión de la interleuquinas IL-8 e IL-6 aumentó en las células epiteliales de pulmón A549 después de la infección con *R. equi*. No se detectó una modificación en la secreción de IL-1 β , IL-12p70, TNF e IL-10. El aumento en la producción de IL-6 e IL-8 fue mayor en los sobrenadantes del cultivo de células infectadas con las cepas no mucoides, en comparación con los controles de células no infectadas, o con las células infectadas con cepas mucoides (figura 30).

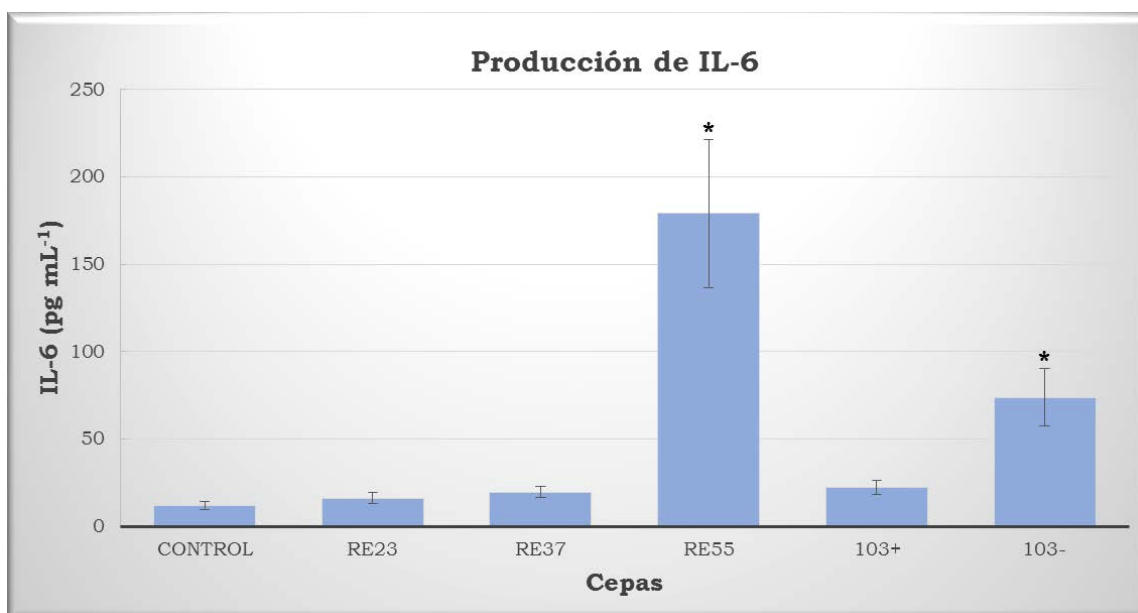


Figura 30. Inducción por *R. equi* de la secreción de IL-6 en las células epiteliales A549. Los ensayos se realizaron por triplicado, y los resultados mostrados son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes. *Indica diferencia significativa, $p < 0.05$ en comparación con los controles y de 103^- vs 103^+ .

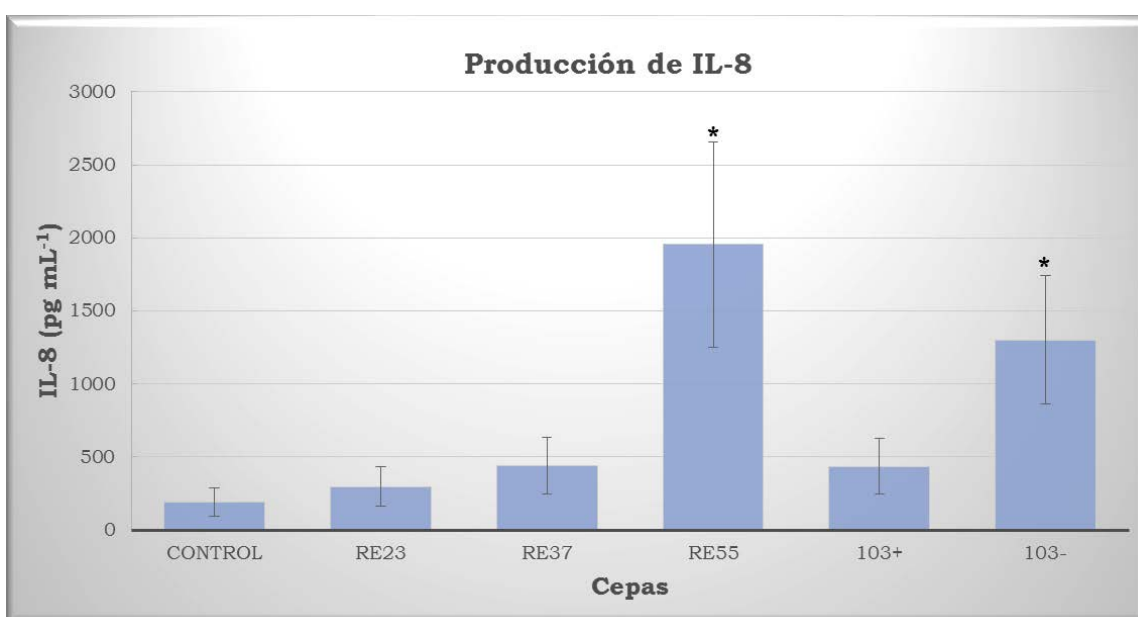


Figura 31. Inducción por *R. equi* de la producción de IL-8 en las células epiteliales A549. Los ensayos se realizaron por triplicado, y los resultados mostrados son el promedio \pm SD de tres experimentos independientes. *Indica Diferencia significativa, $p < 0.05$ en comparación con los controles y 103^- Vs 103^+ .

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos al analizar la expresión de IL-6 e IL-8 por PCR en tiempo real (tabla 15). En las células infectadas con cepas no mucoides, el aumento de la expresión génica de estas citoquinas en comparación con los controles fue mayor y estadísticamente significativo ($p < 0.05$ y un *fold change* > 2). Una cepa mucoide (RE37) mostró un aumento del nivel de transcripción moderado pero estadísticamente significativo tanto para la IL-6 como para la IL-8 con una $p < 0.05$ y *fold change* > 2 .

Cepa	Gen	Promedio C_t		SD		$2^{-[\text{Promedio } (\Delta C_t)]}$		Fold change	Valor de P
		Células control	Células infectadas	Células control	Células infectadas	Células control	Células infectadas		
RE 23	IL-6	35	35	0	0	0	0	1,0401	0,469662
	IL-8	28,18	28,21	0,092916	0,121244	0,092916	0,121244	1,0163	0,887103
RE37	IL-6	35	32,98	0	0,085049	0,00006	0,000279	4,6268	0,00001
	IL-8	28,18	25,55	0,092916	0,119304	0,006833	0,047917	7,0128	0,000027
RE55	IL-6	35	30,85	0	0,075076	0,00006	0,001106	18,3368	0,000737
	IL-8	28,18	24,83	0,092916	0,106927	0,006833	0,071463	10,459	0,001686
103+	IL-6	35	35	0	0	0,00006	0,000036	0,5987	0,004183
	IL-8	28,18	27,02	0,163707	0,092916	0,006833	0,009121	1,3348	0,111035
103-	IL-6	35	25,04	0	0,15	0,00006	0,078836	1306,6587	0
	IL-8	28,18	20,51	0,092916	0,136504	0,006833	1,817136	265,9479	0,00011

Tabla 15. Expresión de los genes que codifican para IL-6 e IL-8 por las células epiteliales A549 después de 24 horas de infección con las cepas de *R. equi*. Los valores de *fold change* mayor que 1 indican un resultado positivo o una sobre-expresión de los genes para IL-6 e IL-8.

4.4. Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos de *R. equi*

Para los estudios de susceptibilidad a antimicrobianos se estudiaron un total de 131 cepas, 49 cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH, 35 correspondientes a aislamientos de potros con neumonía y 47 aislados de muestras ambientales. En la tabla 45, se recogen los resultados de la actividad *in vitro* de 29 antimicrobianos frente a las cepas de *R. equi*. En el anexo 8.2 se presenta una tabla suplementaria con los datos de las CMI de cada cepa. En la tabla 46 se recogen los resultados de la interpretación de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* y en el anexo 8.3 se presenta una tabla suplementaria con las interpretaciones de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de cada cepa.

4.4.1. CMI de amoxicilina-ácido clavulánico para *R. equi*

En la figura 32 se observa que un 51,02% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=8 µg/mL, un 48,57% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=8µg/mL y un 40,43% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=16 µg/mL. En la tabla 16 se observa que el valor de la CMI₅₀ de amoxicilina-ácido clavulánico frente a *R. equi* no varía entre los distintos grupos de cepas, mientras que el valor de CMI₉₀ es mayor en los grupos 2 y 3.

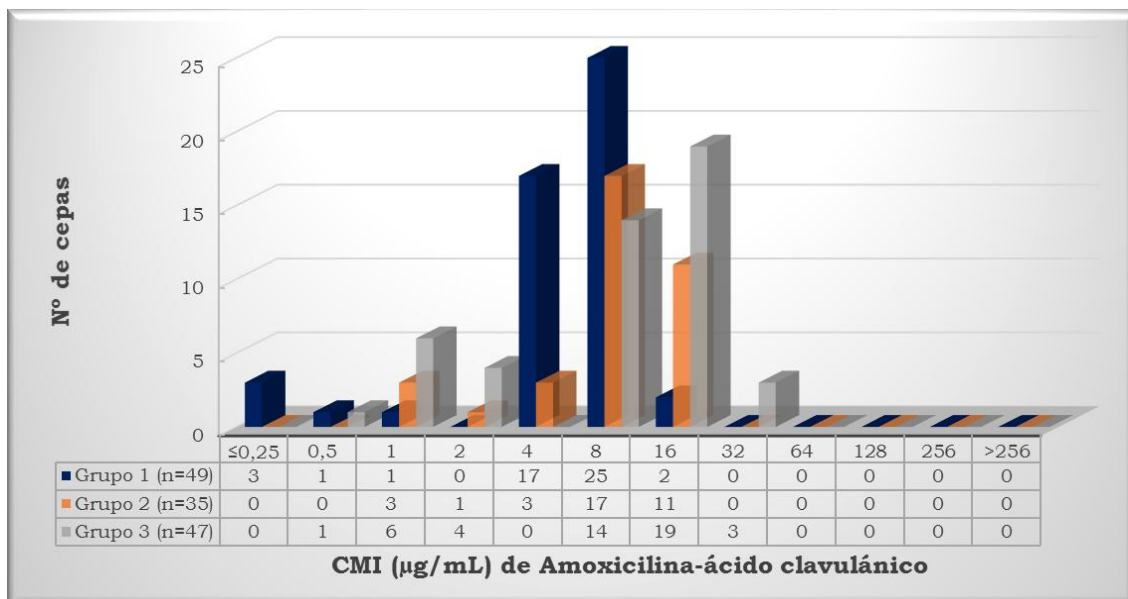


Figura 32. CMI_s de amoxicilina-ácido clavulánico frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,25-16	8	8
Grupo 2^b (n=35)	1-16	8	16
Grupo 3^c (n=47)	0,5-32	8	16

Tabla 16. Rango de CMI_s, CMI₅₀ y CMI₉₀ de AMX-CLV frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.2. CMI de ampicilina para *R. equi*

En la figura 33 se muestra que un 36,73% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, un 51,43% de las cepas de origen animal tienen una CMI=16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un 40,43% de las cepas de origen ambiental tienen una CMI=16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

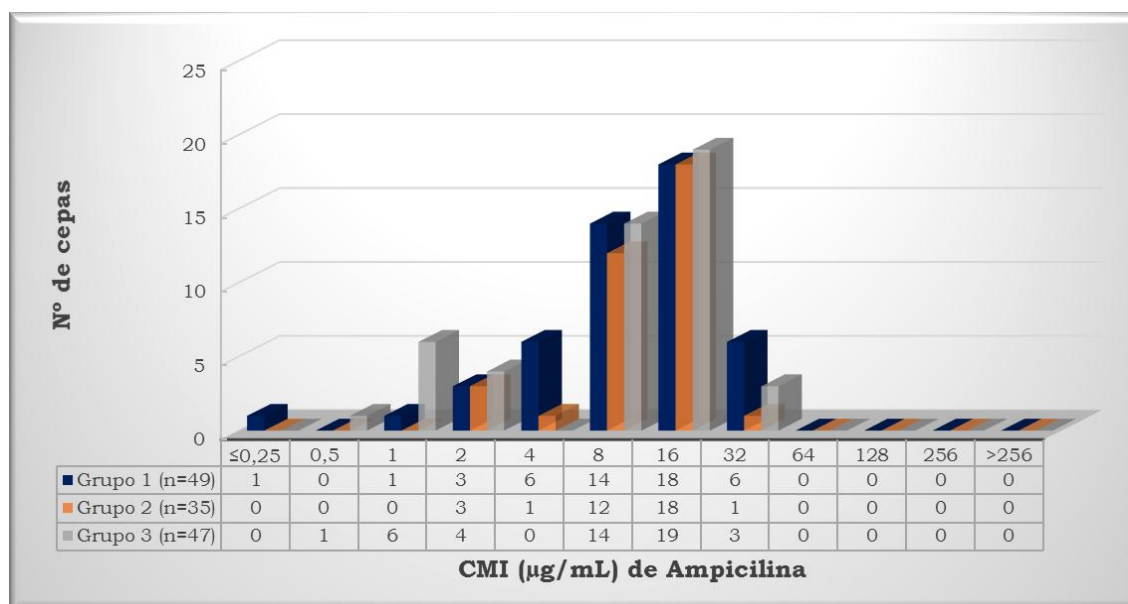


Figura 33. CMI de ampicilina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI ₉₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,25-32	8	32
Grupo 2^b (n=35)	2-32	16	16
Grupo 3^c (n=47)	4-64	32	64

Tabla 17. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.3. CMI de cefalotina para *R. equi*

En la figura 34 se observa que un 24,49% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=256µg/mL, un 37,14% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=256µg/mL y un 46,81% de los aislamientos ambientales tienen una CMI >256µg/mL.

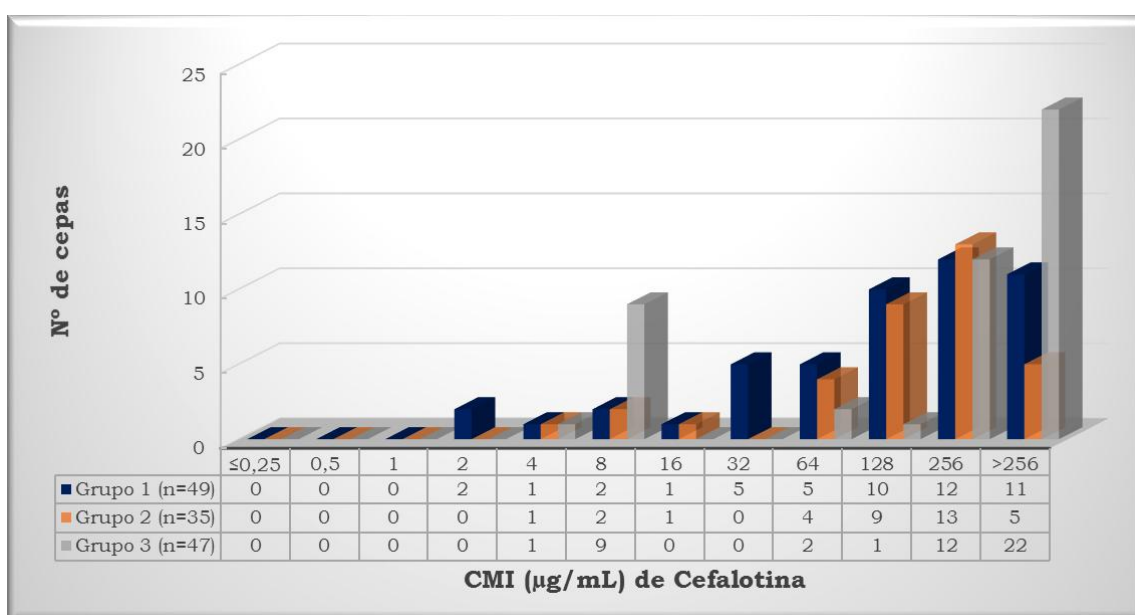


Figura 34. CMI de cefalotina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	2->256	128	>256
Grupo 2^b (n=35)	4->256	256	>256
Grupo 3^c (n=47)	4->256	256	>256

Tabla 18. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de cefalotina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.4. CMI de cefepima para *R. equi*

En la figura 35 se observa que un 65,31% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI >256 µg/mL, un 54,29% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI >256 µg/mL y un 53,19% de los aislamientos ambientales tienen una CMI >256 µg/mL.

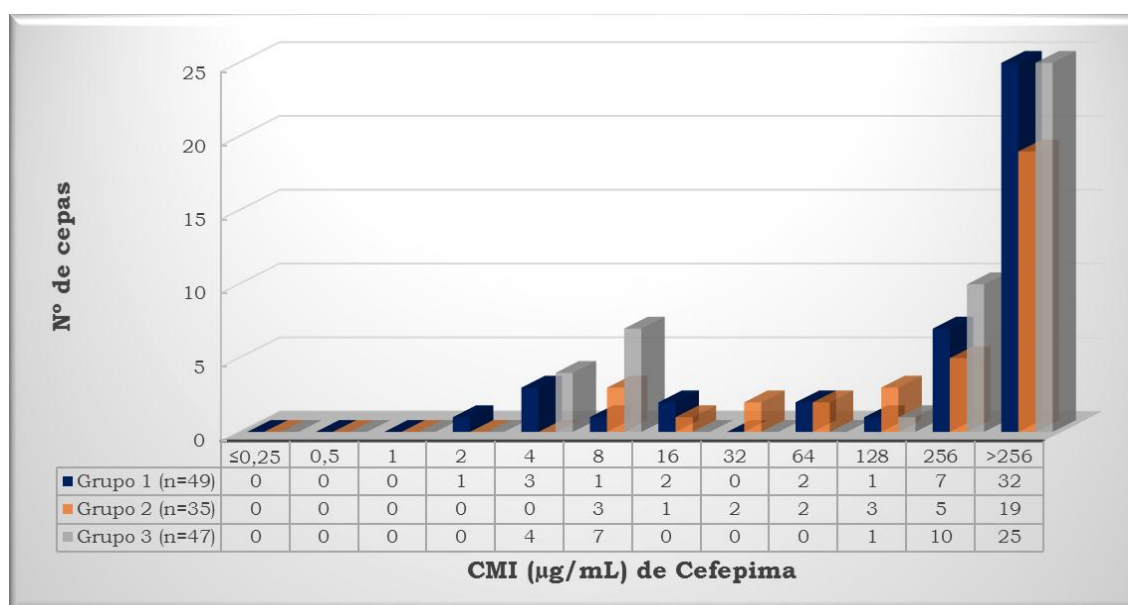


Figura 35. CMIs de cefepima frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	2->256	>256	>256
Grupo 2^b (n=35)	8->256	>256	>256
Grupo 3^c (n=47)	4->256	256	>256

Tabla 19. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de cefepima frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.5. CMI de cefotaxima para *R. equi*

En la figura 36 se observa que un 28,57% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=8µg/mL, un 62,86% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI >256µg/mL y un 46,81% de los aislamientos ambientales tienen una CMI >256µg/mL.

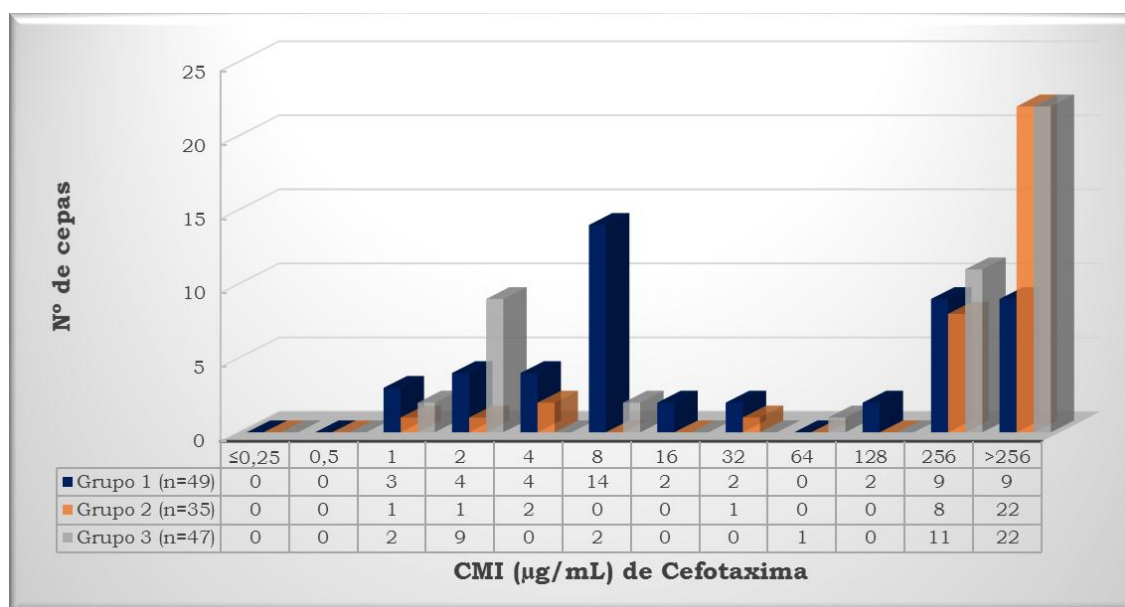


Figura 36. CMIs de cefotaxima frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	1->256	8	>256
Grupo 2^b (n=35)	1->256	>256	>256
Grupo 3^c (n=47)	1->256	256	>256

Tabla 20. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de cefotaxima frente a cepas de *R. equi*.
^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.6. CMI de cefuroxima para *R. equi*

En la figura 37 se observa que 32,65% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=8µg/mL, 31,43% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=256µg/mL y 29,79% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=256µg/mL.

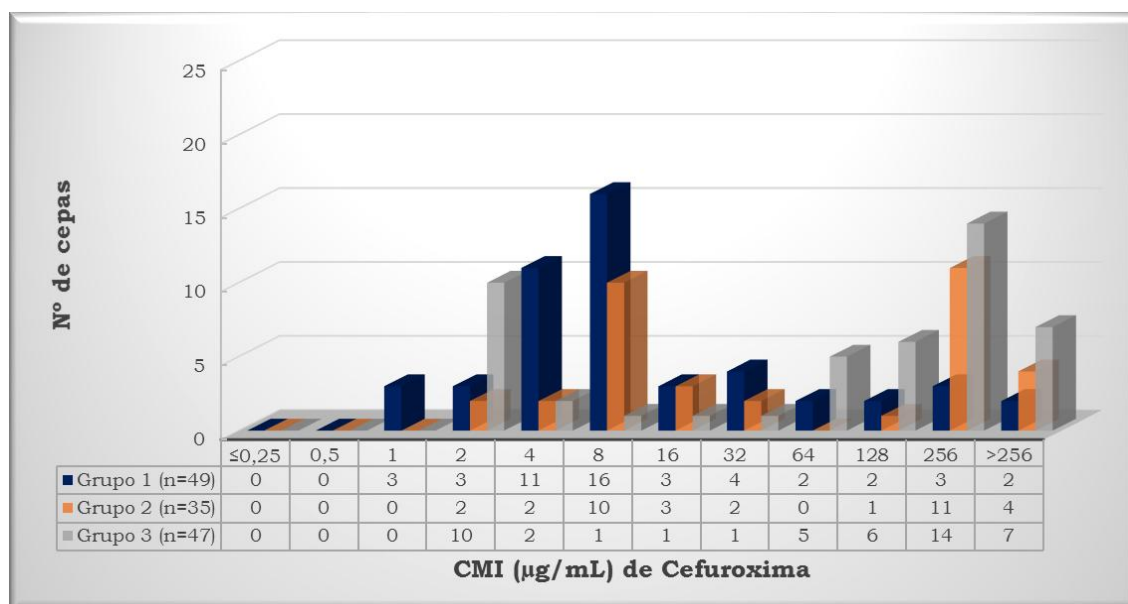


Figura 37. CMIs de cefuroxima frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	1->256	8	256
Grupo 2^b (n=35)	2->256	2	>256
Grupo 3^c (n=47)	2->256	128	>256

Tabla 21. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de cefuroxima frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.7. CMI de imipenem para *R. equi*

En la figura 38 se observa que 44,90% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=0,25µg/mL, 51,43% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=0,25µg/mL y 44,68% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=0,5µg/mL.

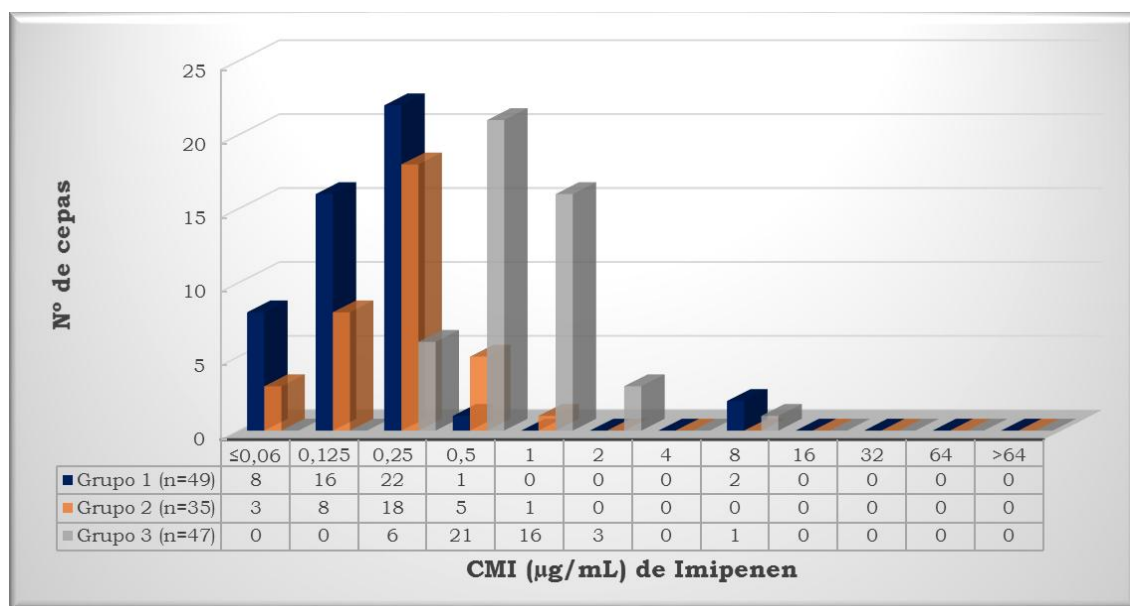


Figura 38. CMIs de imipenem frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,06-8	0,25	0,25
Grupo 2^b (n=35)	≤0,06-1	0,25	0,5
Grupo 3^c (n=47)	0,25-8	0,5	1

Tabla 22. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de imipenem frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.8. CMI de meropenem para *R. equi*

En la figura 39 se observa que 53,06% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 1 µg/mL, 57,14% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 1 µg/mL y 55,32% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 1 µg/mL.

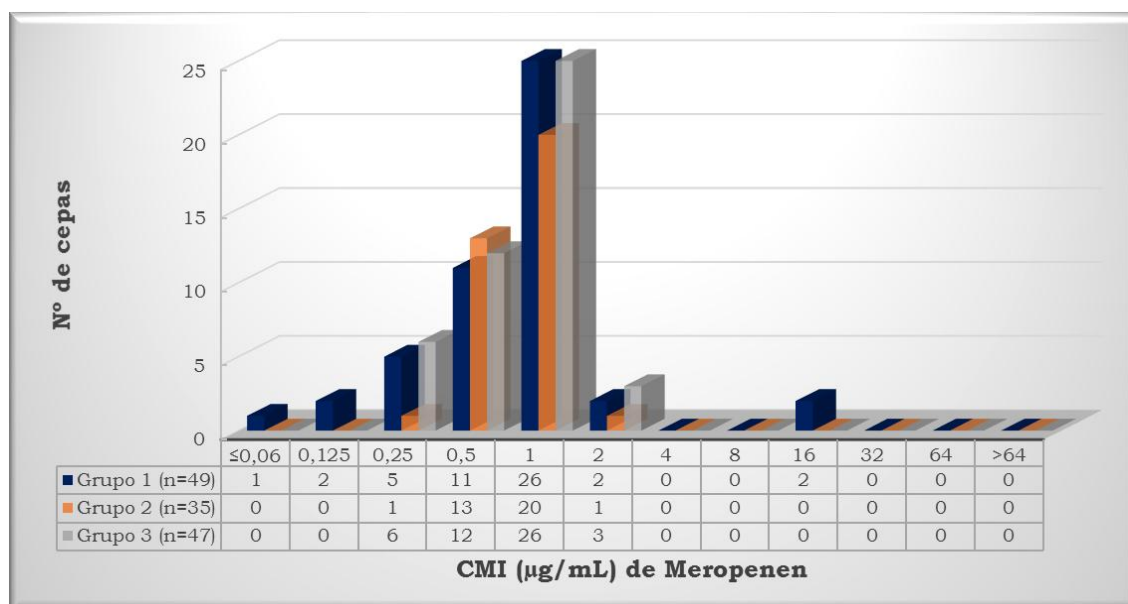


Figura 39. CMIs de meropenem frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,06-16	1	1
Grupo 2^b (n=35)	0,25-2	1	1
Grupo 3^c (n=47)	0,25-2	1	1

Tabla 23. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de meropenem frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.9. CMI de penicilina G para *R. equi*

En la figura 40 se observa que 28,57% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=16µg/mL, 45,71% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=16µg/mL y 36,17% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=16µg/mL.

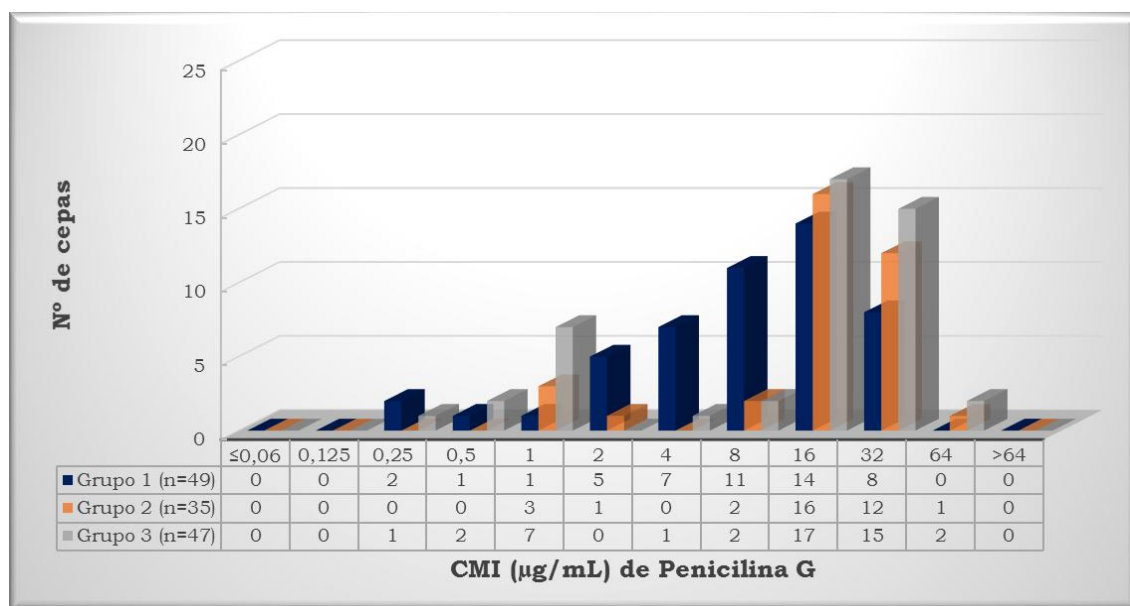


Figura 40. CMIs de penicilina G frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,25-32	8	32
Grupo 2^b (n=35)	1-64	16	32
Grupo 3^c (n=47)	0,25-64	16	32

Tabla 24. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de penicilina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.10. CMIs de teicoplanina para *R. equi*

En la figura 41 se observa que 95,92% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una $CMI \leq 0,06 \mu\text{g/mL}$, 85,71% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una $CMI \leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ y 91,49% de los aislamientos ambientales tienen una $CMI \leq 0,06 \mu\text{g/mL}$.

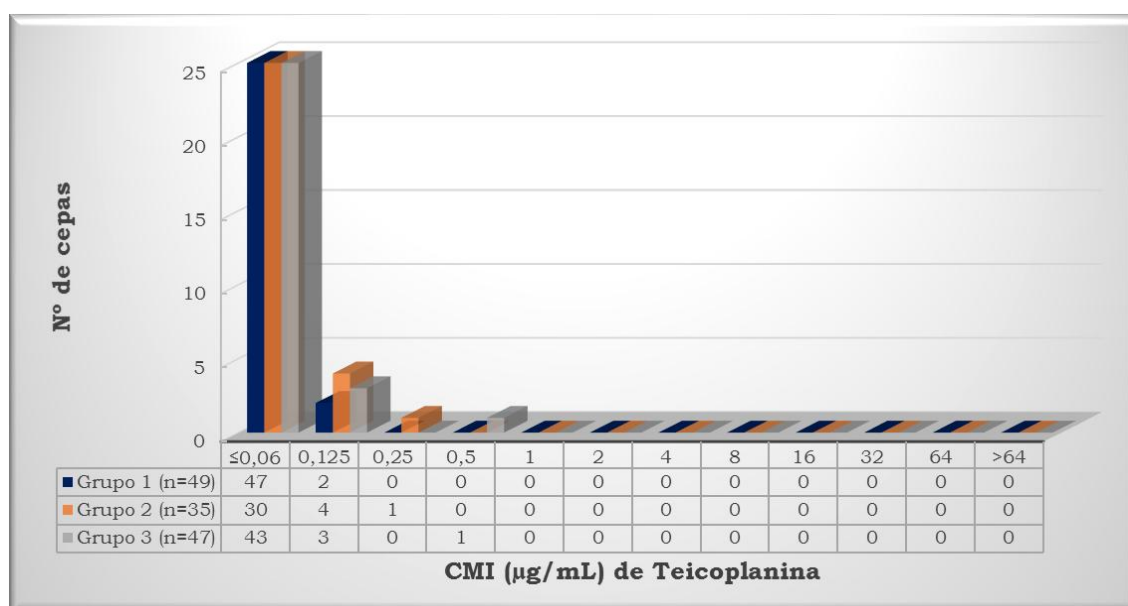


Figura 41. CMIs de teicoplanina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CMI_{90} ($\mu\text{g/mL}$)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,06-0,125	≤0,06	≤0,06
Grupo 2^b (n=35)	≤0,06-0,25	≤0,06	≤0,125
Grupo 3^c (n=47)	≤0,06-0,5	≤0,06	≤0,06

Tabla 25. Rango de CMIs, CMI_{50} y CMI_{90} de teicoplanina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.11. CMIs de vancomicina para *R. equi*

En la figura 42 se observa que 81,63% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI= 0,25µg/mL, 40% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=0,5µg/mL y 72,34% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=0,5µg/mL.

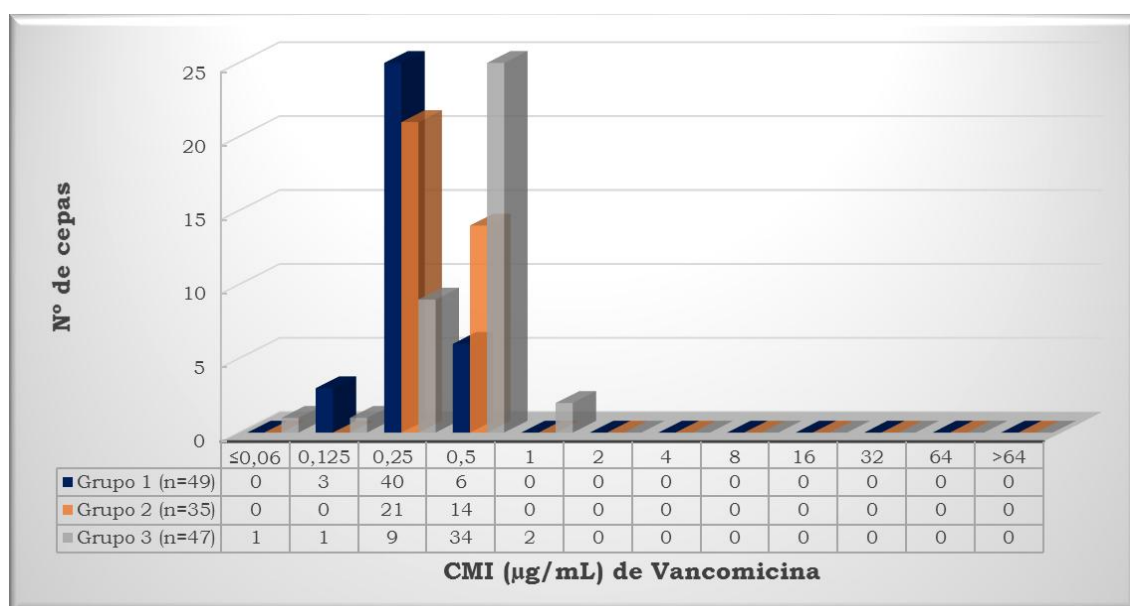


Figura 42. CMIs de vancomicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,125-0,5	0,25	0,25
Grupo 2^b (n=35)	0,25-0,5	0,25	0,5
Grupo 3^c (n=47)	≤0,06-1	0,5	0,5

Tabla 26. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de vancomicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.12. CMI de ampicilina para *R. equi*

En la figura 43 se observa que 38,78% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 2 µg/mL, 45,71% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 8 µg/mL y 38,30% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 4 µg/mL.

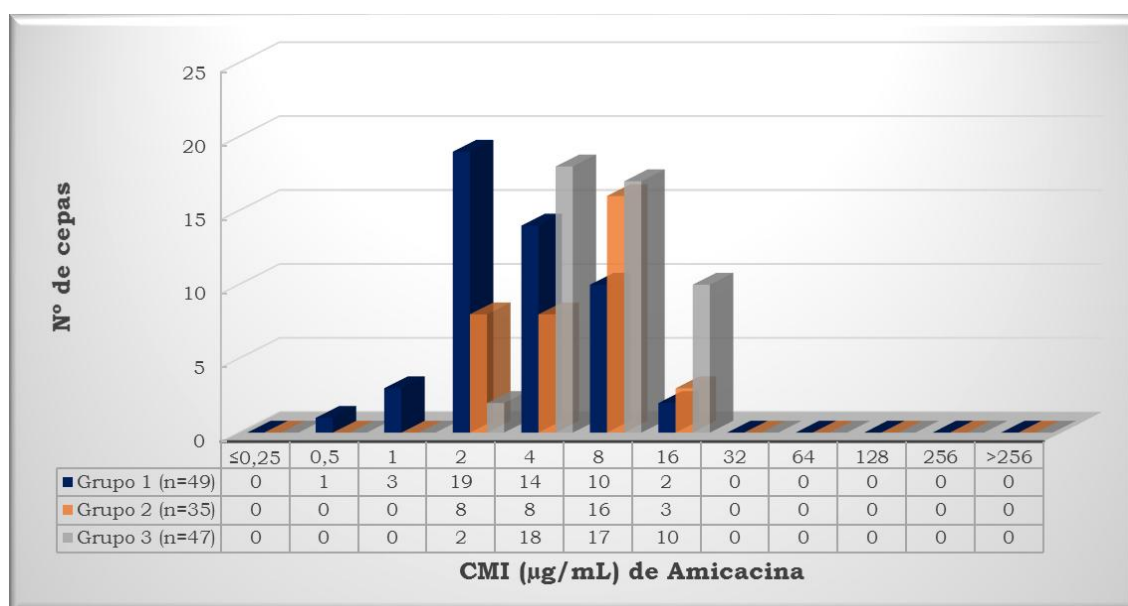


Figura 43. CMIs de ampicilina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,5-16	4	8
Grupo 2^b (n=35)	2-16	8	8
Grupo 3^c (n=47)	2-16	8	16

Tabla 27. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.13. CMI de gentamicina para *R. equi*

En la figura 44 se observa que 38,78% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 1 µg/mL, 40% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 1 µg/mL y 48,94% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 1 µg/mL.

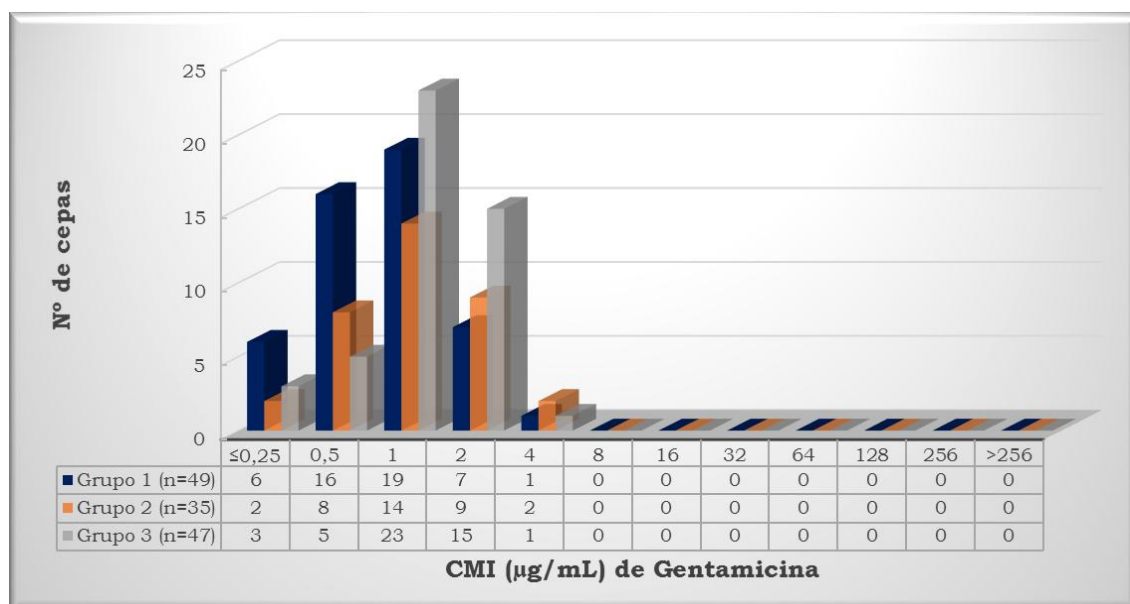


Figura 44. CMI de gentamicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,25-4	1	2
Grupo 2^b (n=35)	≤0,25-4	1	2
Grupo 3^c (n=47)	≤0,25-4	1	2

Tabla 28. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de gentamicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.14. CMIs de tobramicina para *R. equi*

En la figura 45 se observa que un 48,98% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 2 µg/mL, 37,14% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 4 µg/mL y 34,04% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 2 µg/mL.

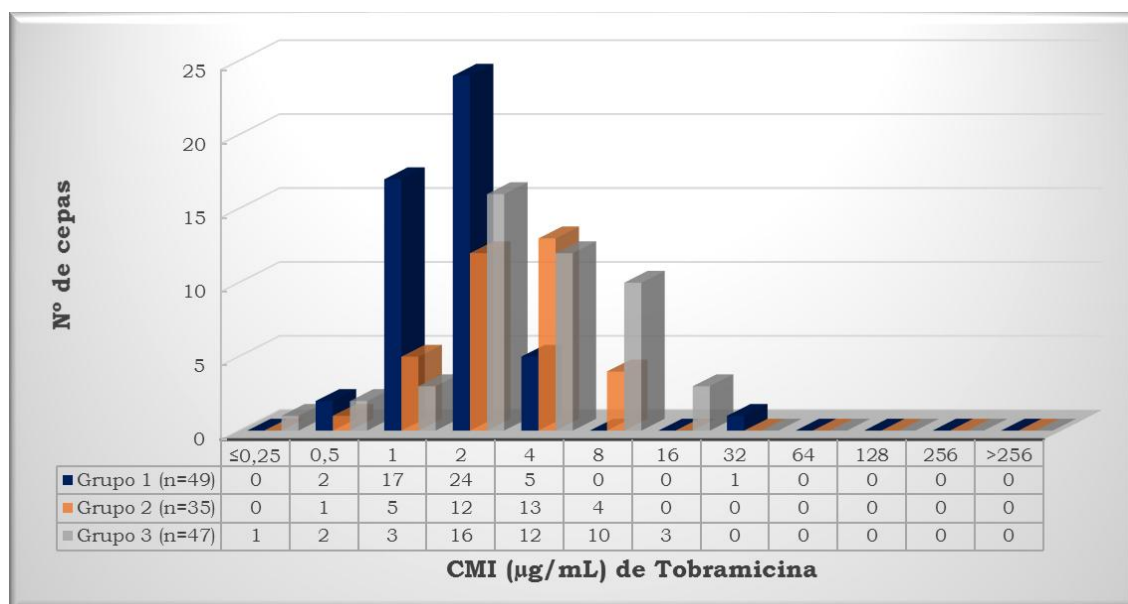


Figura 45. CMIs de tobramicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,5-32	2	4
Grupo 2^b (n=35)	0,5-8	2	8
Grupo 3^c (n=47)	≤0,25-16	4	8

Tabla 29. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de tobramicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.15. CMI de clindamicina para *R. equi*

En la figura 46 se observa que 42,86% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 4µg/mL, 68,57% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 4µg/mL y 74,47% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 4µg/mL.

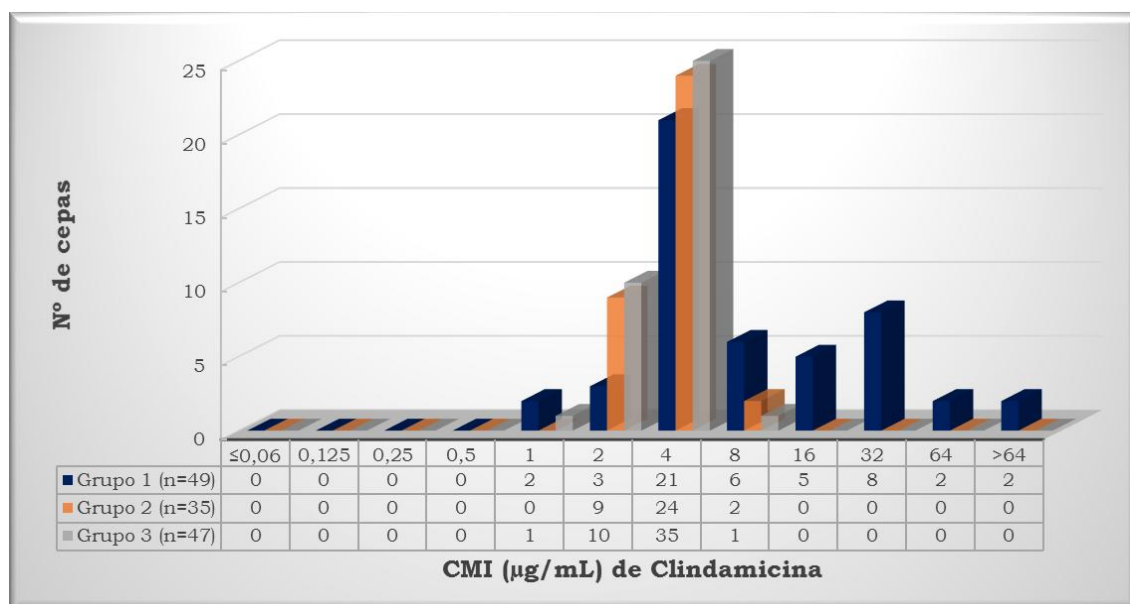


Figura 46. CMIs de clindamicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	1->128	4	32
Grupo 2^b (n=35)	2-8	4	4
Grupo 3^c (n=47)	1-8	4	4

Tabla 30. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de clindamicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.16. CMI de azitromicina para *R. equi*

En la figura 47 se observa que 57,14% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 1 µg/mL, 48,57% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 1 µg/mL y 55,32% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 1 µg/mL.

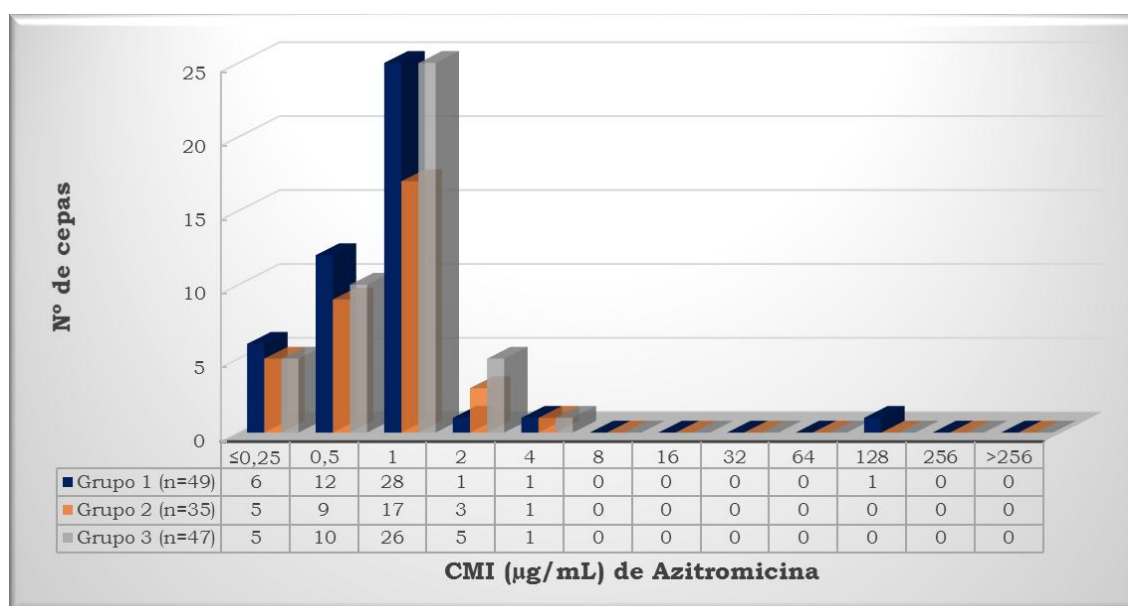


Figura 47. CMIs de azitromicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,25-128	1	1
Grupo 2^b (n=35)	≤0,25-4	1	2
Grupo 3^c (n=47)	≤0,25-4	1	2

Tabla 31. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de azitromicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.17. CMI de claritromicina para *R. equi*

En la figura 48 se observa que 100% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una $CMI \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$, 97,14% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una $CMI \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ y 100% de los aislamientos ambientales tienen una $CMI \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$.

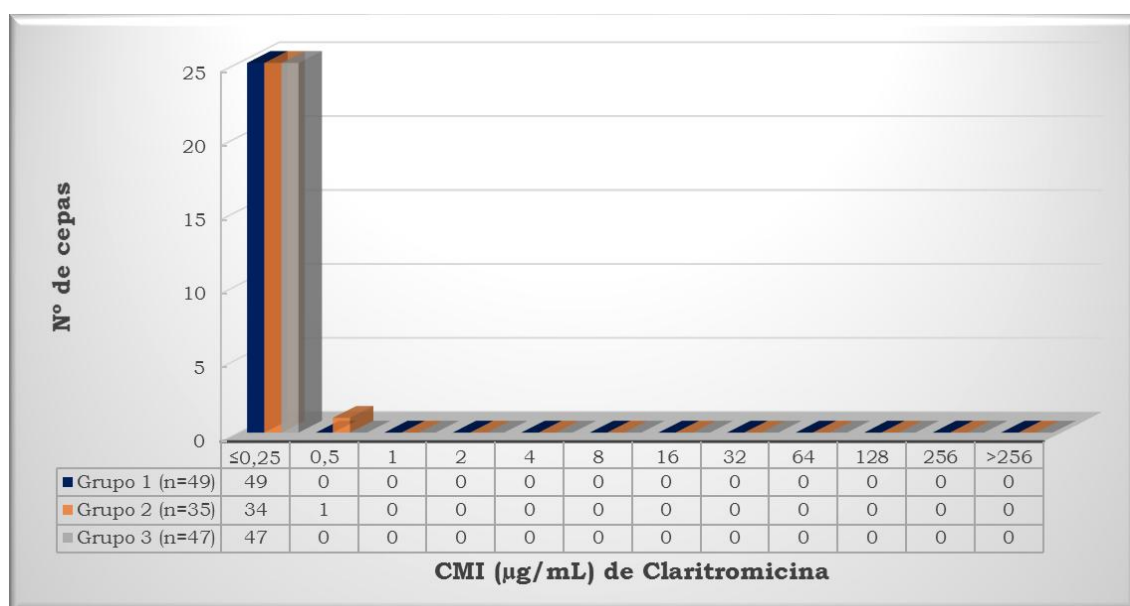


Figura 48. CMI de claritromicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,25-≤0,25	≤0,25	≤0,25
Grupo 2^b (n=35)	≤0,25-0,5	≤0,25	≤0,25
Grupo 3^c (n=47)	≤0,25-≤0,25	≤0,25	≤0,25

Tabla 32. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de claritromicina frente a cepas de *R. equi*. ^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.18. CMIs de eritromicina para *R. equi*

En la figura 49 se observa que 83,67% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una $CMI \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$, 91,43% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una $CMI \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ y 76,60% de los aislamientos ambientales tienen una $CMI \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$.

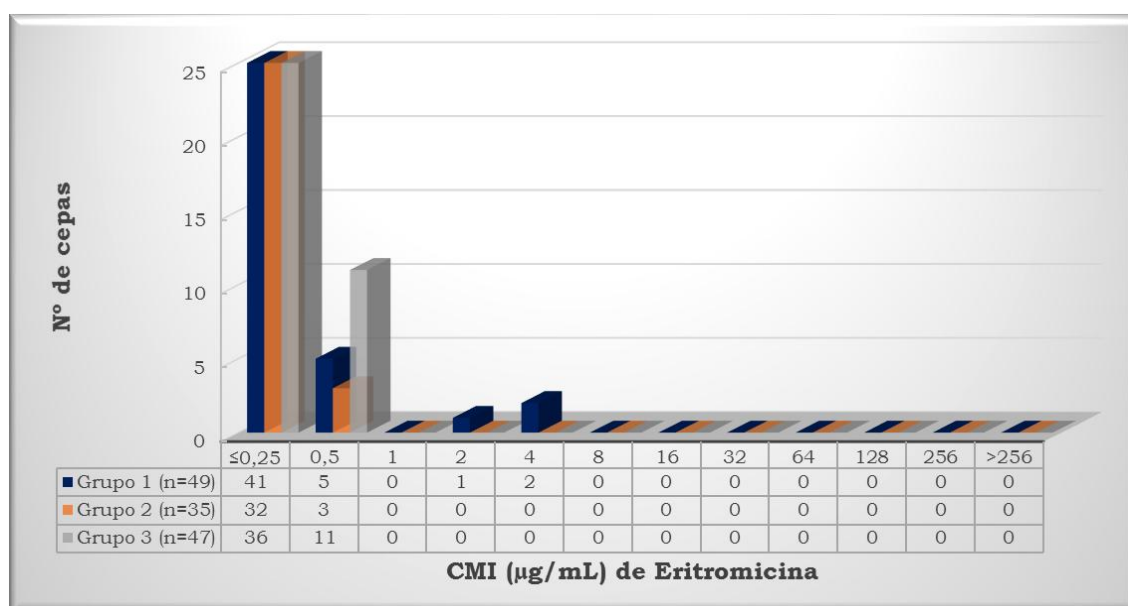


Figura 49. CMIs de eritromicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CMI_{90} ($\mu\text{g/mL}$)
Grupo 1^a (n=49)	$\leq 0,25-4$	$\leq 0,25$	0,5
Grupo 2^b (n=35)	$\leq 0,25-0.5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$
Grupo 3^c (n=47)	$\leq 0,25-0.5$	$\leq 0,25$	0,5

Tabla 33. Rango de CMIs, CMI_{50} y CMI_{90} de eritromicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.19. CMI de espiramicina para *R. equi*

En la figura 50 se observa que 40,82% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=64µg/mL, 54,29% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=64µg/mL y 46,81% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=64µg/mL.

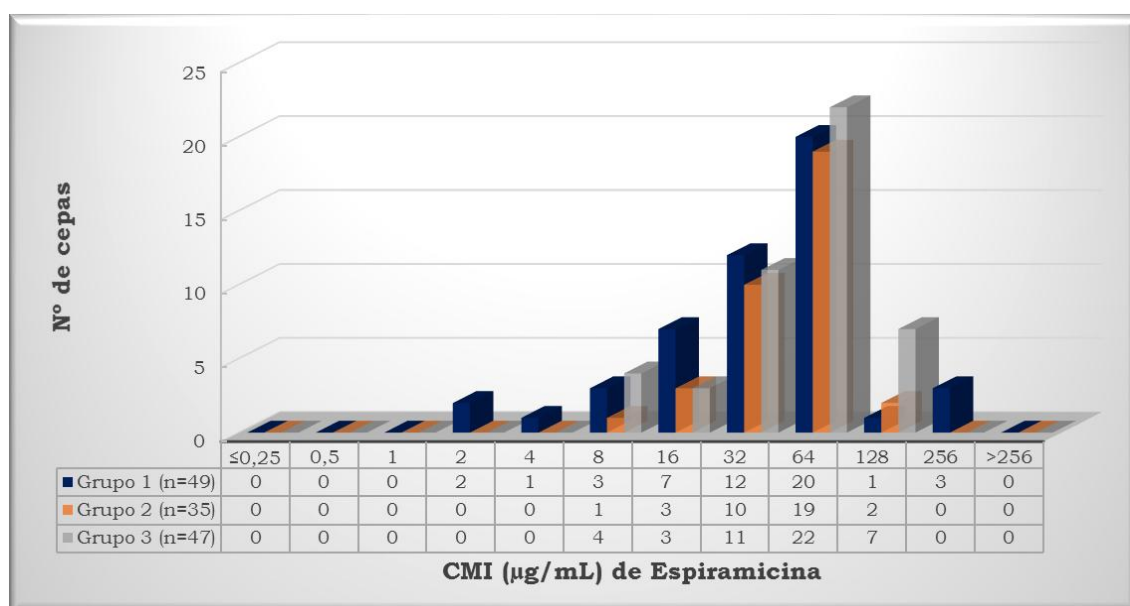


Figura 50. CMIs de espiramicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	2-256	32	64
Grupo 2^b (n=35)	8-128	64	64
Grupo 3^c (n=47)	8-128	64	128

Tabla 34. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de espiramicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.20. CMI de doxiciclina para *R. equi*

En la figura 51 se observa que 42,86% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 1 µg/mL, 54,29% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 1 µg/mL y 78,72% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 8 µg/mL.

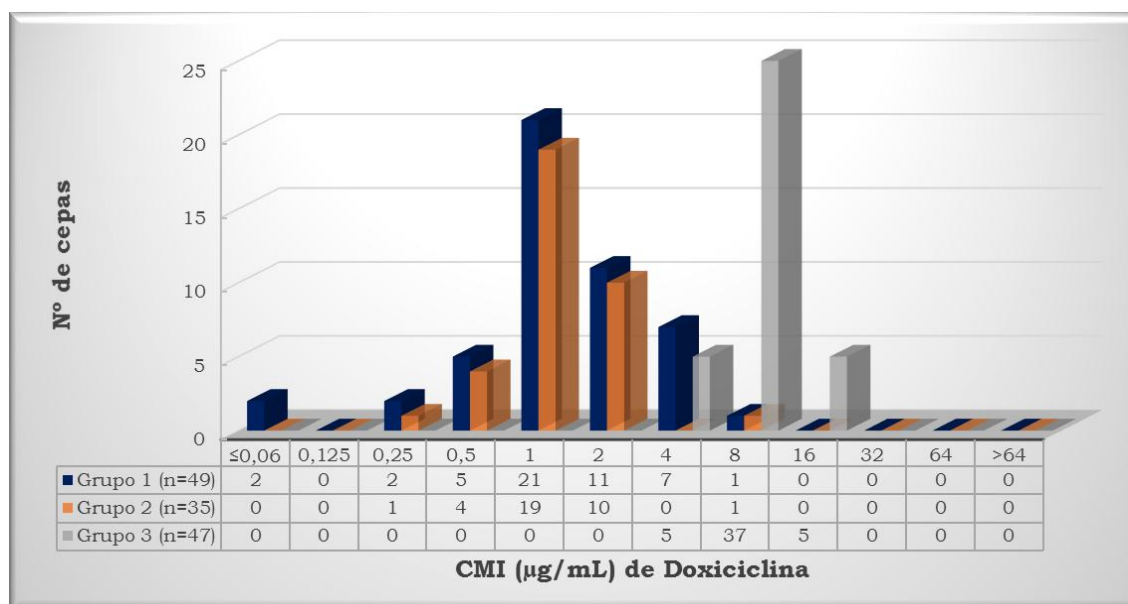


Figura 51. CMIs de doxiciclina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,06-8	1	4
Grupo 2^b (n=35)	0,25-8	1	2
Grupo 3^c (n=47)	0,5-4	2	2

Tabla 35. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de doxiciclina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.21. CMI de tetraciclina para *R. equi*

En la figura 52 se observa que 53,06% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 8µg/mL, 82,86% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 8µg/mL y 38,30% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 1µg/mL.

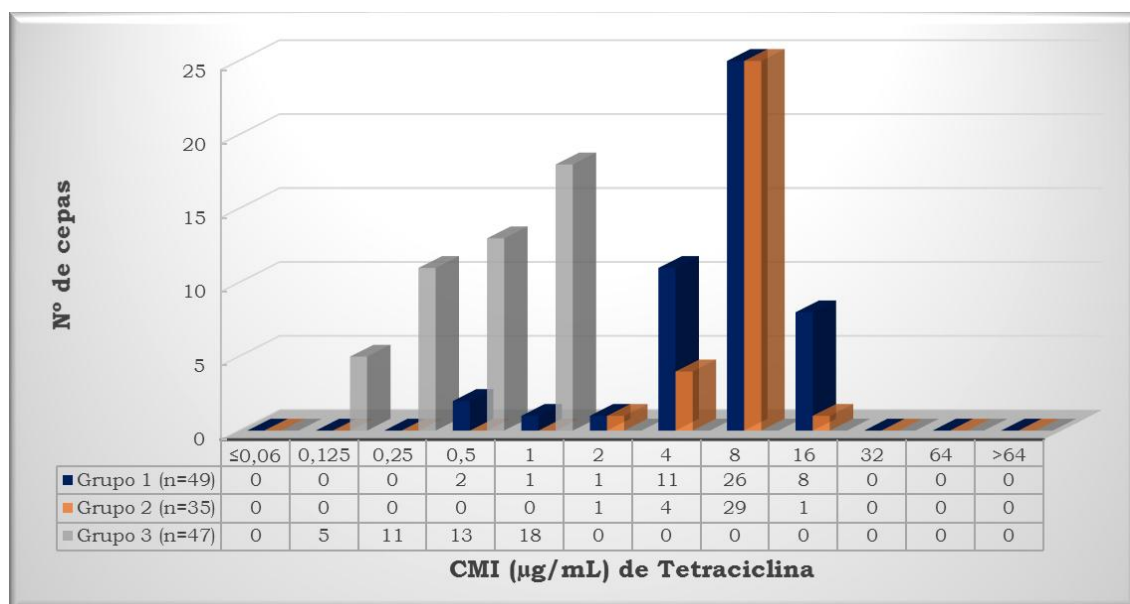


Figura 52. CMI de tetraciclina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,5-16	8	16
Grupo 2^b (n=35)	2-16	8	8
Grupo 3^c (n=47)	4-16	8	8

Tabla 36. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de tetraciclina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.22. CMI de tigeciclina para *R. equi*

En la figura 53 se observa que un 63,27% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=0,5µg/mL, 48,57% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=1µg/mL y 70,21% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=1µg/mL.

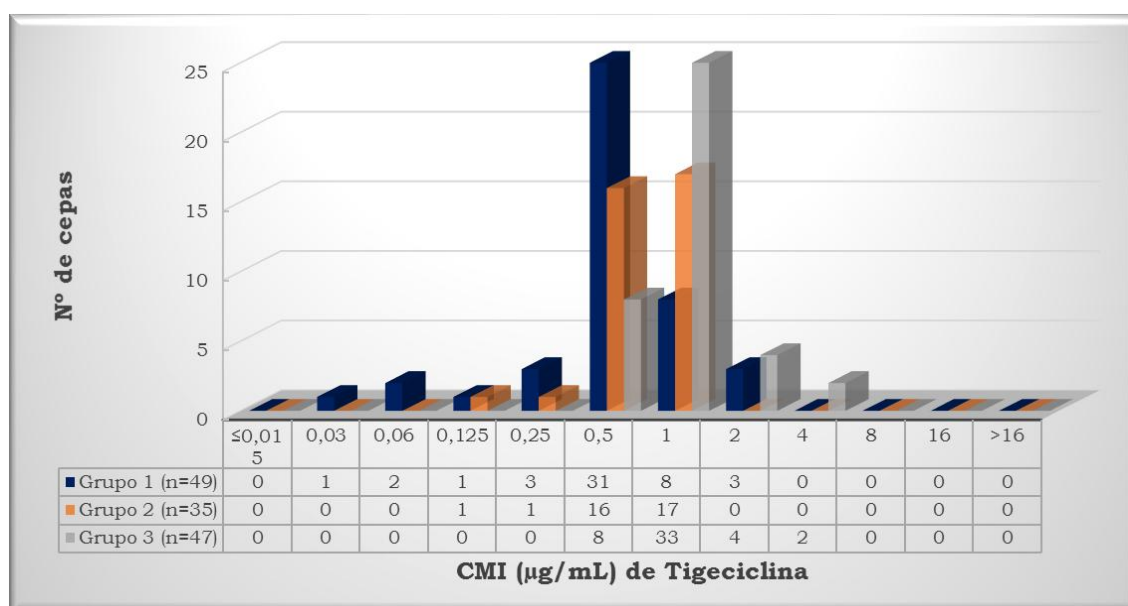


Figura 53. CMIs de tigeciclina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,03-2	0,5	1
Grupo 2^b (n=35)	0,125-1	0,5	1
Grupo 3^c (n=47)	0,125-1	0,5	1

Tabla 37. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de tigeciclina frente a cepas de *R. equi*. ^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.23. CMI de ciprofloxacina para *R. equi*

En la figura 54 se observa que un 40,82% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=0,125µg/mL, 71,43% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=1µg/mL y 51,06% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=1µg/mL.

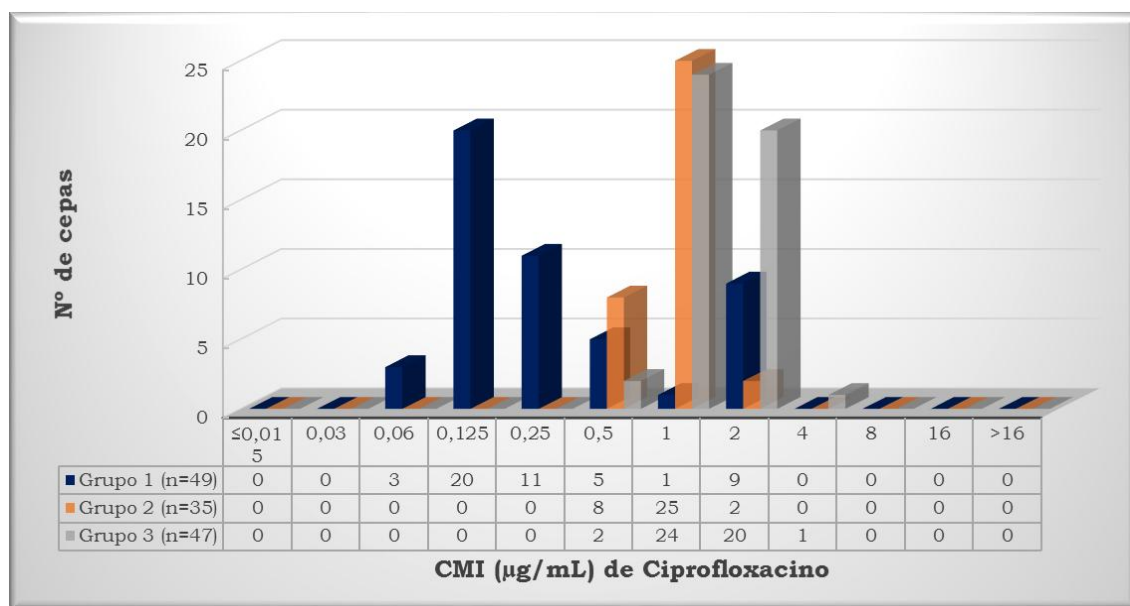


Figura 54. CMI de ciprofloxacina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,5-16	2	16
Grupo 2^b (n=35)	0,5-2	1	1
Grupo 3^c (n=47)	0,5-4	1	2

Tabla 38. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de ciprofloxacina frente a cepas de *R. equi*. ^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.24. CMI de levofloxacina para *R. equi*

En la figura 55 se observa que un 36,73% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 2 µg/mL, 54,29% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 1 µg/mL y 59,57% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 0,5 µg/mL.

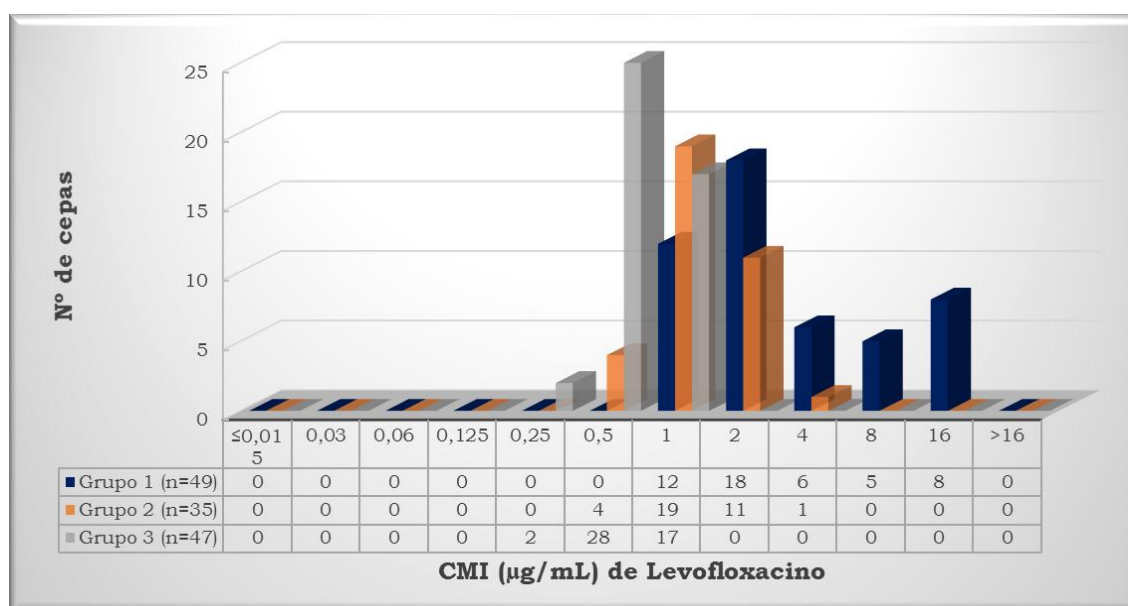


Figura 55. CMI de levofloxacina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	1-16	2	16
Grupo 2^b (n=35)	0,5-4	1	2
Grupo 3^c (n=47)	0,5-2	1	2

Tabla 39. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de levofloxacina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.25. CMI de moxifloxacina para *R. equi*

En la figura 56 se observa que un 69,39% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI=0,5µg/mL, 71,43% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=0,5µg/mL y 48,94% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=4µg/mL.

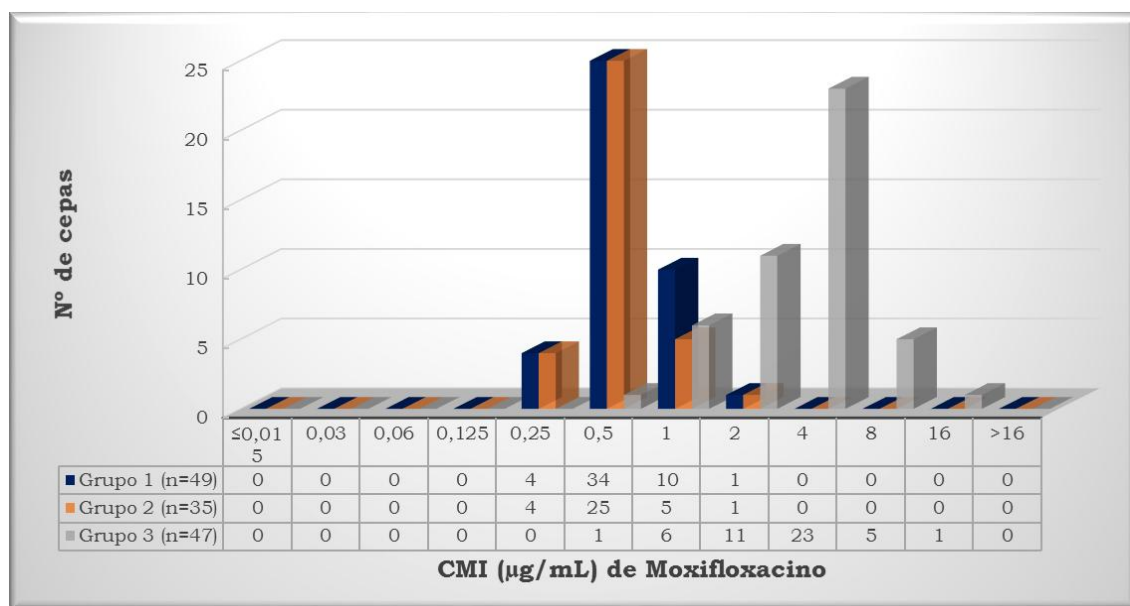


Figura 56. CMIs de moxifloxacina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,25-2	0,5	1
Grupo 2^b (n=35)	0,25-2	0,5	1
Grupo 3^c (n=47)	0,25-1	0,5	1

Tabla 40. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de moxifloxacina frente a cepas de *R. equi*. ^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.26. CMI de trimetoprim/sulfametoxazol para *R. equi*

En la figura 57 se observa que un 55,10% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 2 µg/mL, 51,43% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 32 µg/mL y 76,60% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 8 µg/mL.

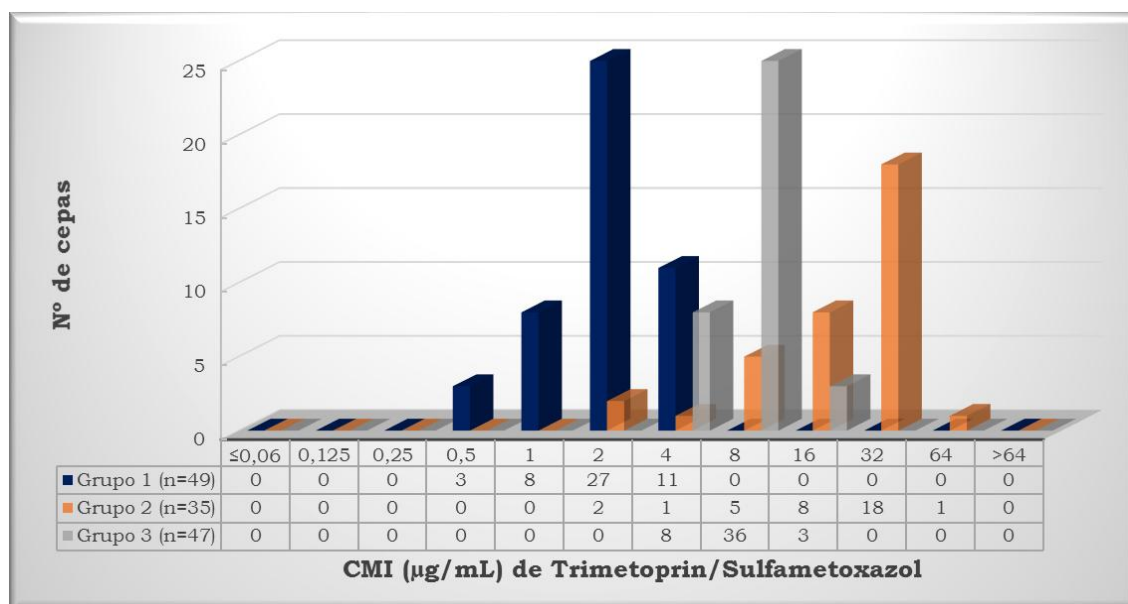


Figura 57. CMI de trimetoprim/sulfametoxazol frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	0,5-4	2	4
Grupo 2^b (n=35)	1-32	16	16
Grupo 3^c (n=47)	0,5-16	4	4

Tabla 41. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de trimetoprim/sulfametoxazol frente a cepas de *R. equi*. ^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.27. CMI de cloranfenicol para *R. equi*

En la figura 58 se observa que un 40,82% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI = 8µg/mL, 85,71% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI = 8µg/mL y 76,60% de los aislamientos ambientales tienen una CMI = 8µg/mL.

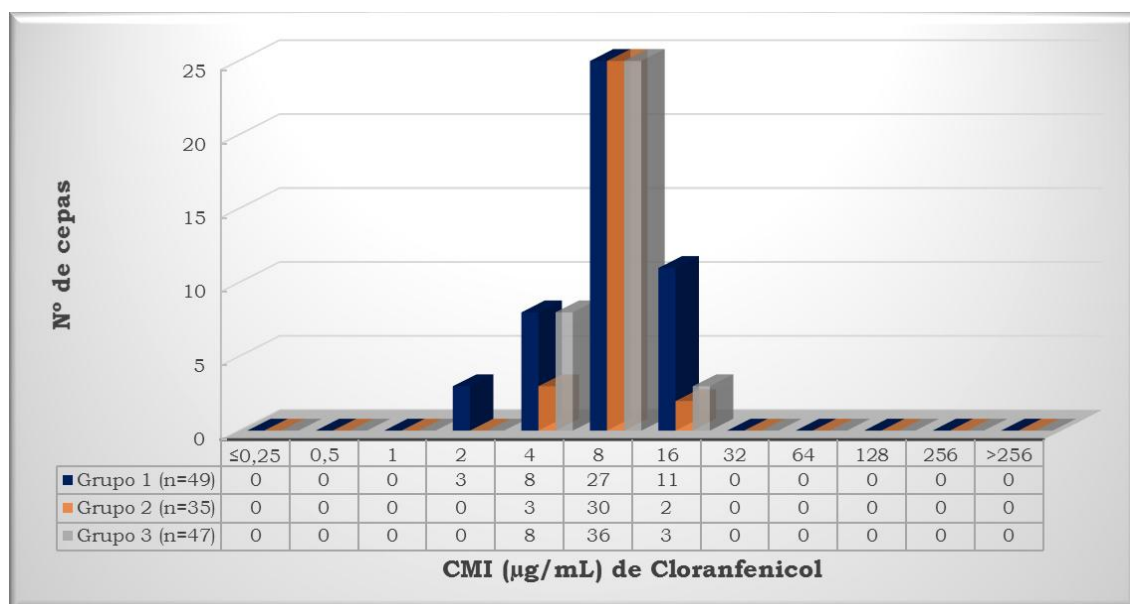


Figura 58. CMIs de cloranfenicol frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	2-16	8	16
Grupo 2^b (n=35)	4-16	8	8
Grupo 3^c (n=47)	4-16	8	8

Tabla 42. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de cloranfenicol frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.28. CMI de daptomicina para *R. equi*

En la figura 59 se observa que un 85,71% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una CMI >64µg/mL, 68,57% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una CMI=64µg/mL y 65,96% de los aislamientos ambientales tienen una CMI=64µg/mL.

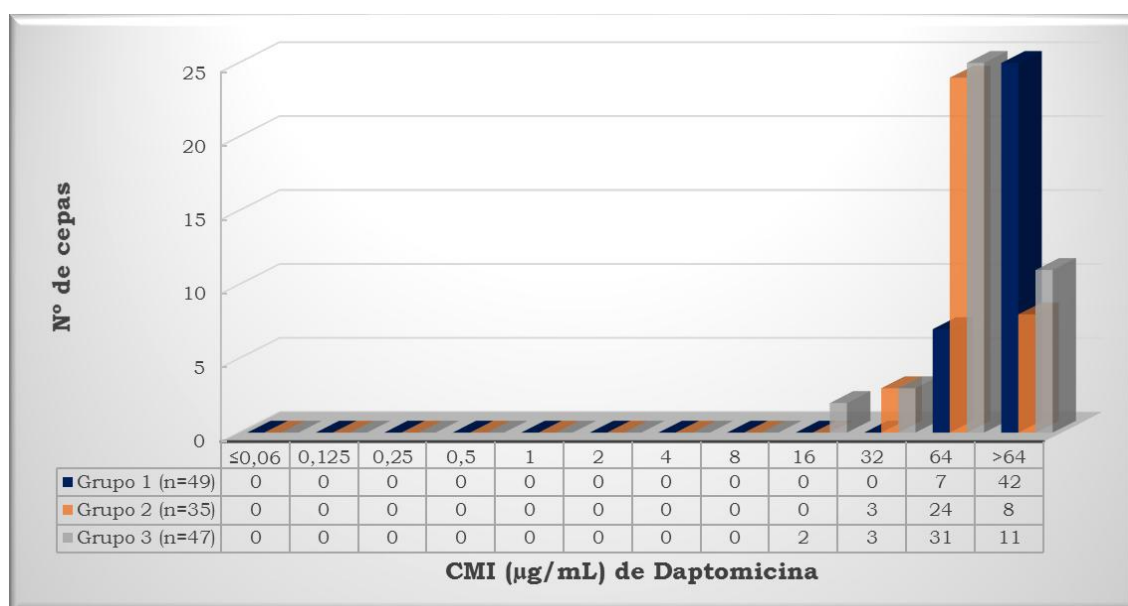


Figura 59. CMIs de daptomicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	64->64	>64	>64
Grupo 2^b (n=35)	32->64	64	>64
Grupo 3^c (n=47)	16->64	64	>64

Tabla 43. Rango de CMIs, CMI₅₀ y CMI₉₀ de daptomicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

4.4.29. CMI de rifampicina para *R. equi*

En la figura 60 se observa que un 46,94% de las cepas aisladas de pacientes humanos infectados con VIH tienen una $CMI \leq 0,015 \mu\text{g/mL}$, 22,86% de las cepas aisladas de potros con neumonía tienen una $CMI \leq 0,015 \mu\text{g/mL}$ y 31,91% de los aislamientos ambientales tienen una $CMI \leq 0,015 \mu\text{g/mL}$.

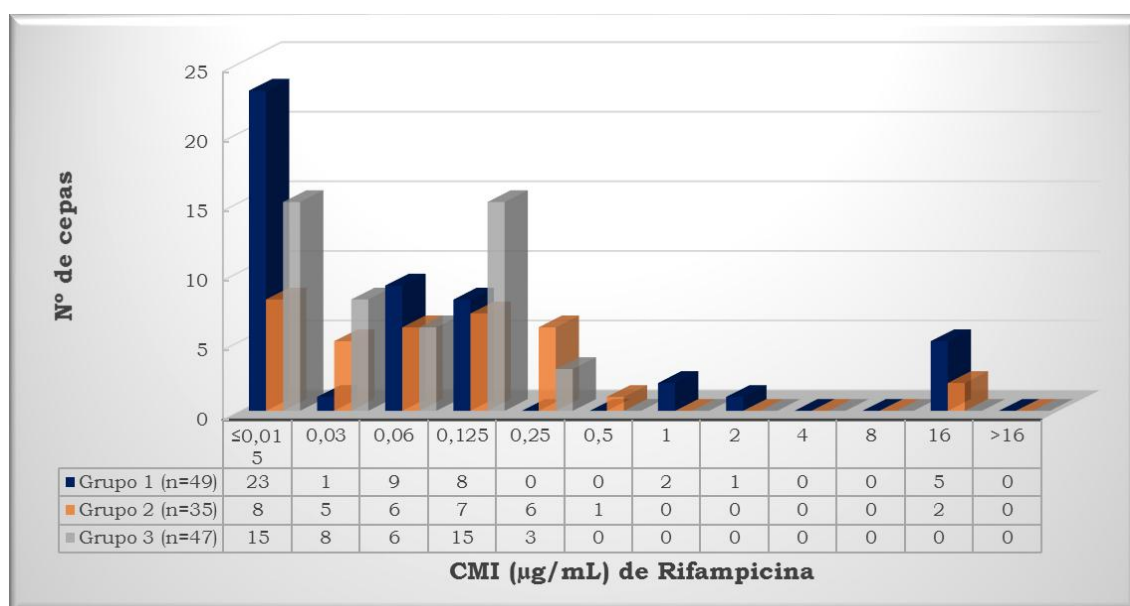


Figura 60. CMI de rifampicina frente a 131 cepas de *R. equi*. Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. Grupo 3: aislamientos ambientales.

Cepas	Rango CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Grupo 1^a (n=49)	≤0,015-16	0,06	16
Grupo 2^b (n=35)	≤0,015-16	0,06	0,25
Grupo 3^c (n=47)	≤0,015-0,25	0,06	0,125

Tabla 44. Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de rifampicina frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

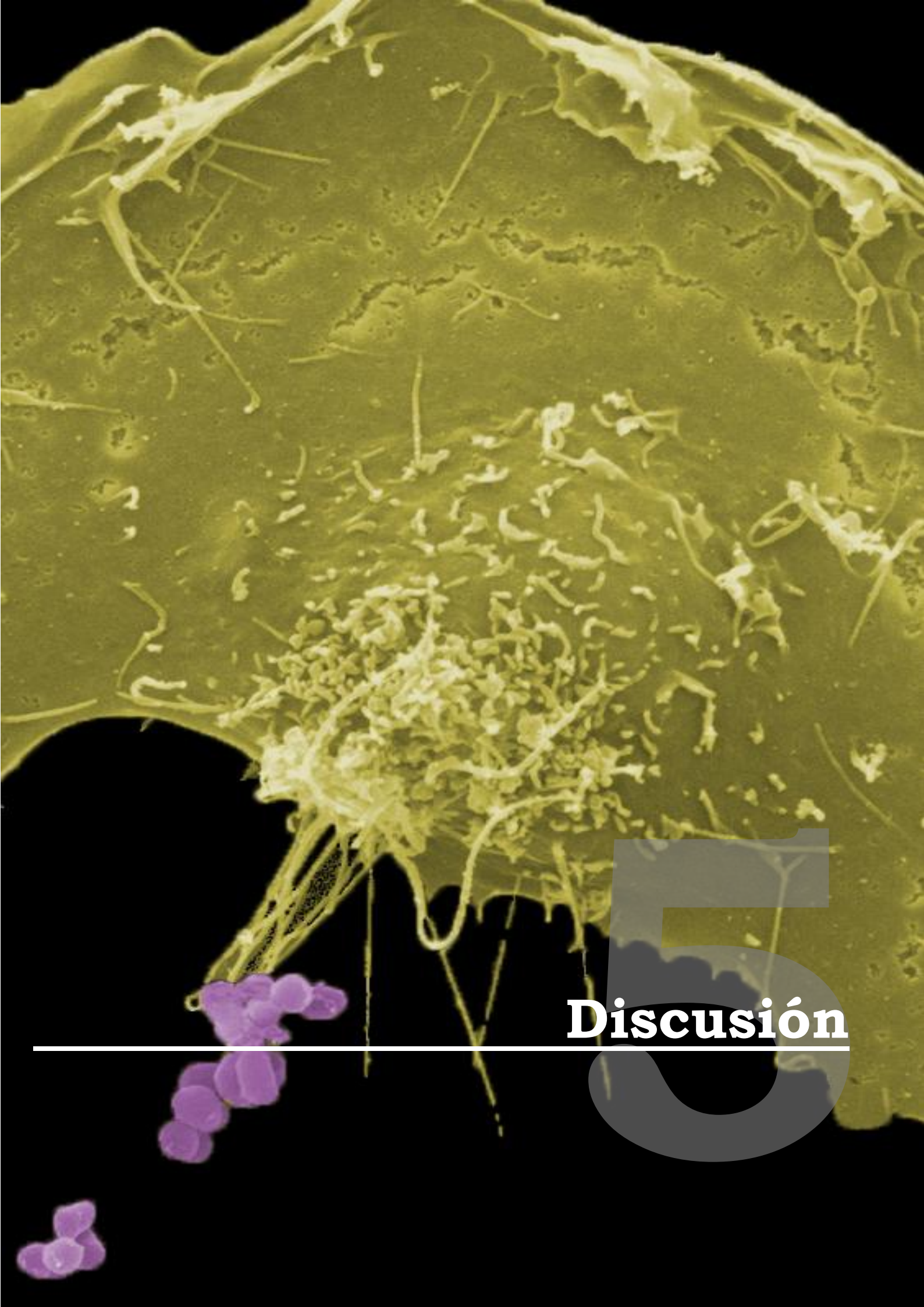
Antimicrobianos	CMI ₅₀ (µg/mL)			CMI ₉₀ (µg/mL)		
	Grupo 1 ^a (n=49)	Grupo 2 ^b (n=35)	Grupo 3 ^c (n=47)	Grupo 1 ^a (n=49)	Grupo 2 ^b (n=35)	Grupo 3 ^c (n=47)
Amixicilina-ác. clavulánico	8	8	8	8	16	16
Ampicilina	8	16	32	32	16	64
Cefalotina	128	256	256	>256	>256	>256
Cefepima	>256	>256	256	>256	>256	>256
Cefotaxima	8	>256	256	>256	>256	>256
Cefuroxima	8	2	128	256	>256	>256
Imipenem	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	1
Meropenem	1	1	1	1	1	1
Penicilina G	8	16	16	32	32	32
Teicoplanina	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,125	≤0,06
Vancomicina	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5
Amicacina	4	8	8	8	8	16
Gentamicina	1	1	1	2	2	2
Tobramicina	2	2	4	4	8	8
Clindamicina	4	4	4	32	4	4
Azitromicina	1	1	1	1	2	2
Claritromicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Eritromicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	0,5
Espiramicina	32	64	64	64	64	128
Doxiciclina	1	1	2	4	2	2
Tetraciclina	8	8	8	16	8	8
Tigeciclina	0,5	0,5	0,5	1	1	1
Ciprofloxacina	2	1	1	16	1	2
Levofloxacina	2	1	1	16	2	2
Moxifloxacina	0,5	0,5	0,5	1	1	1
TMP/SXT (1:19)	2	16	4	4	16	4
Cloranfenicol	8	8	8	16	8	8
Daptomicina	>64	64	64	>64	>64	>64
Rifampicina	0,06	0,06	0,06	16	0,25	0,125

Tabla 45. Actividad *in vitro* de 29 antimicrobianos frente a cepas de *R. equi*.

^a Grupo 1: cepas aisladas de pacientes humanos infectados por el VIH. ^b Grupo 2: cepas aisladas de potros con neumonía. ^c Grupo 3: aislamientos ambientales.

Antimicrobianos	Nºcepas S	Nºcepas I	Nºcepas R	% S	% I	% R
Amoxicilina-ác. clavulánico	22	0	27	44,9	0,0	55,1
Ampicilina	1	0	48	2,0	0,0	98,0
Cefalotina	5	1	43	10,2	2,0	87,8
Cefepima	5	2	42	10,2	4,1	85,7
Cefotaxima	25	4	20	51,0	8,2	40,8
Cefuroxima	33	3	13	67,3	6,1	26,5
Imipenem	47	2	0	95,9	4,1	0,0
Meropenem	47	0	2	95,9	0,0	4,1
Penicilina G	0	0	49	0,0	0,0	100,0
Teicoplanina	49	0	0	100,0	0,0	0,0
Vancomicina	49	0	0	100,0	0,0	0,0
Amicacina	49	0	0	100,0	0,0	0,0
Gentamicina	49	0	0	100,0	0,0	0,0
Tobramicina	48	0	1	98,0	0,0	2,0
Clindamicina	0	5	44	0,0	10,2	89,8
Azitromicina	47	1	1	95,9	2,0	2,0
Claritromicina	49	0	0	100,0	0,0	0,0
Eritromicina	46	3	0	93,9	6,1	0,0
Doxiciclina	48	1	0	98,0	2,0	0,0
Tetraciclina	15	26	8	30,6	53,1	16,3
Tigeciclina	38	0	11	77,6	0,0	22,4
Ciprofloxacina	23	11	15	46,9	22,4	30,6
Levofloxacina	12	18	19	24,5	36,7	38,8
Moxifloxacina	38	10	1	77,6	20,4	2,0
Trimetoprim/ sulfametoxazol	38	0	11	77,6	0,0	22,4
Cloranfenicol	40	9	0	81,6	18,4	0,0
Daptomicina	0	0	49	0,0	0,0	100,0
Rifampicina	43	1	5	87,8	2,0	10,2

Tabla 46. Interpretación de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de 49 cepas de *R. equi* aisladas de pacientes humanos basado en el documento M100-S22 (CLSI, 2012b) para *Staphylococcus* spp.



Discusión

5.1. Identificación de *R. equi* y su distinción de otros actinomicetos

R. equi es esencialmente un patógeno animal que afecta principalmente a potros jóvenes. Se identifica de forma rutinaria en clínicas y hospitales veterinarios. En humanos se presenta ocasionalmente como patógeno oportunista. En los laboratorios de Microbiología Clínica humana aparece en raras ocasiones y puede confundirse con otros actinomicetos, como *Dietzia* spp, *Tsukamurella* spp, y otros. En el período 2005-2010, 15 aislados clínicos fueron inicialmente identificados como *R. equi* en el Servicio de Microbiología Clínica del hospital Marqués de Valdecilla. Se identificaron en base a los resultados del test API Coryne. Sin embargo, la morfología de ocho de ellos no se correspondía con la habitual de *R. equi*, ya que formaban colonias de color naranja intenso o amarillo. Por lo tanto sospechamos que la asignación inicial como *R. equi* no era acertada, por lo que empleamos métodos adicionales para identificarlos correctamente.

La identificación de los actinomicetos puede presentar dificultades debido a su gran variabilidad morfológica y a su carencia de actividades enzimáticas diferenciales. El test API-Coryne es la herramienta habitual para identificar estas bacterias, debido a su rapidez y facilidad de uso. Aunque su base de datos se ha mejorado notablemente en los últimos años, incluyendo nuevos actinomicetos, su fiabilidad es limitada, como nuestros resultados han corroborado.

La prueba CAMP es un procedimiento muy sencillo que suele utilizarse para confirmar la identificación de un aislado como *R. equi*, debido al característico patrón de hemólisis en forma de flecha producido al crecer junto a *L. ivanovii*. Las cepas RE138, RE149 y RE150 formaban colonias de color y aspecto atípicos. Sin embargo producían el típico halo de hemólisis con *L. ivanovii*. Consideramos que los resultados de la prueba CAMP no eran concluyentes y recurrimos a los métodos

moleculares disponibles: PCR basada en el gen *choE* y secuenciación del gen ADNr 16S. La identificación de *R. equi* mediante PCR con cebadores del gen *choE* se había puesto a punto en nuestro laboratorio años antes y había sido validada con 162 cepas (Ladrón *y cols.*, 2003). Observamos que la cepa RE155 y dos cepas control (*D. maris* y *Dietzia* spp.) daban positivo con los cebadores del gen *choE*. El producto de amplificación era 80% homólogo a la región correspondiente de *choE* de *R. equi*. El genoma de *Dietzia cinnamea* P4 incluye dos genes codificantes para colesterol oxidasas de tipo I, que son homólogos a los genes *cho* de otros actinomicetos (Procópio *y cols.*, 2012). Por lo tanto, consideramos que los resultados de la PCR *choE* tampoco eran concluyentes, y procedimos a secuenciar el gen ADNr 16S. Ante la posibilidad de que alguno de los aislados pudiera asignarse a una especie nueva, secuenciamos los genes ADNr 16S completos de los ocho aislados. La secuenciación hizo posible identificarlos correctamente a nivel de especie. La secuenciación del gen ADNr 16S se considera el método superior para identificar los actinomicetos (Cherkaoui *y cols.*, 2010). Pudimos corroborar que es así. Posteriormente confirmamos estos resultados mediante métodos de proteómica.

Dietzia maris es un patógeno oportunista poco descrito como patógeno humano. En los últimos años ha aumentado el número de casos descritos de actinomicetos aeróbicos que causan bacteriemias relacionadas con el uso de catéteres. En 1999 Bemer-Melchior y colaboradores describieron el primer caso de bacteriemia asociada a *D. maris* en un paciente inmunodeprimido de 38 años con catéter. Inicialmente identificada como *Rhodococcus* mediante el test API Coryne, la aplicación de métodos quimiotaxonómicos determinó que se trataba en realidad de una *Dietzia* (Bemer-Melchior *y cols.*, 1999).

Pidoux y colaboradores en el 2001, describieron el caso de un paciente con prótesis de cadera del cual se obtuvo una muestra de biopsia de la que aisló *Dietzia maris*. La identificación se realizó

mediante el análisis de ácidos grasos de la pared celular y la secuenciación del ADNr 16S (Pidoux *y cols.*, 2001).

Natarajan y colaboradores describieron el caso de un paciente de 17 años con papilomatosis confluyente y reticulada del cual se aisló una cepa de *Dietzia*, que se identificó mediante la secuenciación del ADNr 16S (Natarajan *y cols.*, 2005).

Yassin y colaboradores describieron el caso de un paciente con trasplante de médula ósea, del cual se aisló un nueva especie de *Dietzia*, *Dietzia cinnamea* (Yassin *y cols.*, 2006).

Kämpfer y colaboradores describieron el aislamiento de una nueva especie de *Dietzia*, *Dietzia aurantiaca*, del líquido cefalorraquídeo de una mujer de 24 años (Kämpfer *y cols.*, 2012).

Rammer y colaboradores describieron el primer caso de bacteriemia por *Dietzia papillomatosis*, ocurrido en un paciente de dos años de edad con siringomielia. El diagnóstico microbiológico se realizó mediante la secuenciación del ADNr 16S (Rammer *y cols.*, 2013).

Como nos indica la bibliografía, el método de referencia usado para la identificación de actinomicetos es la secuenciación del ADNr 16S.

Sin embargo, en los últimos 5 años se ha generalizado la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF a la identificación de microorganismos. Esta tecnología comenzó a aplicarse en Microbiología hace aproximadamente veinticinco años (Seng *y cols.*, 2009) y en la actualidad constituye un apoyo importante a los sistemas tradicionales de diagnóstico en los laboratorios de Microbiología Clínica. Tiene las ventajas de que los resultados se obtienen en poco tiempo (menos de una hora) y su bajo coste (Seng *y cols.*, 2009), aunque hay que tener en cuenta que la inversión inicial en el equipo es grande.

Mediante la espectrometría MALDI-TOF se obtiene un perfil de varias decenas de proteínas (la mayoría ribosómicas). El perfil de cada

aislado se compara con los almacenados en una base de datos y el resultado se expresa mediante un parámetro, que es indicativo de la fiabilidad de la identificación.

Para la mayoría de las bacterias el análisis por MALDI se puede realizar directamente sobre colonia. Sin embargo, se ha descrito que los espectros de algunos actinomicetos mejoran significativamente si se realiza un tratamiento previo de las colonias con disolventes orgánicos (Schulthess *y cols.*, 2013).

Disponíamos para el análisis por MALDI-TOF de una colección de 144 actinomicetos procedentes de distintos orígenes (aislados humanos, animales y ambientales), en su mayoría *R. equi*. Esta colección incluye los ocho aislamientos identificados como *Dietzia* spp. por secuenciación del gen ADNr 16S. 132 aislados fueron identificados como *R. equi* mediante la técnica de MALDI. Los resultados del análisis por MALDI-TOF MS coincidieron con los de la prueba CAMP y la secuenciación del gen ADNr 16S (tabla 12). Por lo tanto la espectrometría de masas MALDI-TOF puede ser aplicada con garantía para identificar *R. equi* y diferenciarlo de *Dietzia* spp y otros actinomicetos cercanos filogenéticamente.

Numerosos estudios han publicado que la identificación mediante MALDI-TOF es más fiable que las tradicionales técnicas bioquímicas (Bille *y cols.*, 2012; Bizzini *y cols.*, 2010, 2011; Cherkaoui *y cols.*, 2010; Clark *y cols.*, 2013; Eigner *y cols.*, 2009; Gravet *y cols.*, 2011; Patel, 2013; Seng *y cols.*, 2013). Además, desde el año 2008, numerosas publicaciones han demostrado su utilidad en el laboratorio clínico (Mellmann *y cols.*, 2008; Degand *y cols.*, 2008), incluyendo la identificación de bacterias gran positivas como *Listeria* spp. (Barbuddhe *y cols.*, 2008), *Staphylococcus* spp. (Carbonnelle *y cols.*, 2007; Dupont *y cols.*, 2010), *Streptococcus* spp. (Friedrichs *y cols.*, 2007), *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (Bittar *y cols.*, 2010), y

Mycobacterium (Claydon *y cols.*, 1996; Balážová *y cols.*, 2014). Dupont y colaboradores, demostraron la clara superioridad del MALDI-TOF sobre las técnicas Phoenix y Vitek, otras dos técnicas automatizadas de identificación que se usan habitualmente en los laboratorios clínicos. (Dupont *y cols.*, 2010).

5.2. Interacción de cepas de *R. equi* con células epiteliales pulmonares humanas

Mientras que la interacción de *R. equi* con macrófagos ha sido objeto de numerosos estudios, no se sabe mucho acerca de la interacción de este patógeno con células no fagocíticas. Además, aunque *R. equi* es un patógeno importante en caballos, también afecta a humanos, por lo que hemos decidido estudiar la interacción de distintas cepas de este patógeno con células epiteliales de pulmón humanas. Las células epiteliales juegan un papel muy importante como interfase entre las mucosas del hospedador y el ambiente y representan un sitio principal de colonización por bacterias patógenas. *R. equi* podría entrar en células epiteliales o en otro tipo celular no fagocítico para evitar las defensas del hospedador y poder diseminarse del mismo modo que hacen otros patógenos intracelulares (Casadevall, 2008; Ehrt y Schnappinger, 2009).

Para el estudio de la interacción con células epiteliales humanas se utilizaron 16 cepas clínicas de *R. equi* y dos cepas de referencia (ATCC 33701 y ATCC 33701-). Los resultados obtenidos durante el estudio de las interacciones entre *R. equi* y células epiteliales humanas nos han ayudado a comprender mejor la biología de este patógeno. Hemos demostrado por primera vez que *R. equi* es capaz de invadir, multiplicarse y sobrevivir en células humanas de pulmón.

Todas las cepas humanas estudiadas son capaces de adherirse sin gran dificultad a la superficie de las células epiteliales, incluso las cepas que no poseen el plásmido de virulencia, por lo que concluimos que el plásmido de virulencia no es necesario para la adherencia a células epiteliales de pulmón humanas. Esto se correlaciona con que la mayoría de aislamientos humanos de *R. equi* no poseen dicho plásmido (Ocampo-Sosa *y cols.*, 2007).

Como la adherencia es a menudo un prerrequisito para la invasión de las células del hospedador, hemos realizado también ensayos de formación de biocapas *in vitro*. El objetivo de estos ensayos era buscar alguna correlación entre la formación de biocapas y la adherencia a células eucariotas, lo que evidenciaría la presencia de factores de adherencia a superficies vivas o inertes. Hemos demostrado que, a pesar de la gran heterogeneidad en el grado de adhesión a células epiteliales, *R. equi* no es capaz de formar biocapas en placas de 96 pocillos, que son las que normalmente se utilizan para cuantificar la capacidad de formación de biocapas en bacterias. Sin embargo, hemos observado que la cepa RE55 es capaz de formar una biocapa fuertemente adherida en las paredes de placas de 24 y 48 pocillos. Un trabajo reciente ha mostrado que *R. equi* es capaz de formar biocapas similares en catéteres de poliuretano (Al Akhrass *y cols.*, 2012), lo que sugiere que la formación de biocapas podría ser un fenómeno no poco frecuente en esta especie, sobre todo en cepas de origen humano. Además, hemos observado que las cepas de *R. equi* utilizadas muestran un patrón diferente de auto-aglutinación cuando el ensayo se realiza en placas de 96 pocillos. Específicamente, las cepas que presentan morfología de colonia mucosa muestran auto-aglutinación, mientras que las cepas que presentan morfología de colonia no-mucosa no muestran esta auto-aglutinación. El fenómeno de auto-aglutinación es una característica importante en otras especies patógenas como *Aeromonas hydrophila* (Paula *y cols.*, 1988), *Yersinia enterocolitica* (Roggenkamp *y cols.*,

1995), *Campylobacter jejuni* (Misawa y Blaser, 2000) y *Escherichia coli* (Andersen *y cols.*, 1999). La auto-aglutinación es también un fenotipo asociado con la expresión de pili de tipo IV en *Neisseria gonorrhoeae* y *Vibrio cholerae* (Swanson *y cols.*, 1971; Taylor *y cols.*, 1987). Dado que dos de las cepas de *R. equi* que no presentan autoaglutinación tampoco contienen el plásmido de virulencia, es posible que el fenómeno de autoaglutinación sea mediado por el plásmido. Además, la cepa 103- (curada del plásmido de virulencia) tampoco presenta autoaglutinación, lo que podría indicar también que ha perdido el, o los determinantes de esta característica, al perder el plásmido. Hasta la fecha, una correlación entre la auto-aglutinación y el grado de virulencia en *R. equi* no ha sido establecida.

Las tasas de invasión y supervivencia intracelular también varían ampliamente entre las cepas estudiadas, que incluyen cepas *vapA* y *vapB*-positivas (que contienen plásmido), y cepas sin plásmido. Por lo tanto, la presencia o ausencia del plásmido de virulencia no se correlaciona con altas o bajas tasas de invasión bacteriana.

Tanto la adherencia como la invasión dependen de la cepa bacteriana, el tiempo de infección y de la fase de crecimiento de la bacteria. La eficiencia de invasión que hemos observado es menor que la que muestran algunos patógenos humanos invasivos como *Brucella* (Pizarro-Cerda *y cols.*, 2000) o *Salmonella* (Mills y Finlay, 1994). Sin embargo, su eficiencia de invasión es similar o incluso mayor que la de algunas especies patógenas invasivas como *Campylobacter* (Friis *y cols.*, 2005; Byrne *y cols.*, 2007), *Burkholderia* (Martin y Mohr, 2000; Stevens *y cols.*, 2003), *Hafnia* (Padilla *y cols.*, 2008), y *Prevotella* (Dorn *y cols.*, 1998), siempre teniendo en cuenta la línea celular utilizada y las condiciones de infección particulares de cada ensayo.

No se conoce el mecanismo implicado en la entrada de *R. equi* en células eucariotas. Mientras que *R. equi* entra fácilmente en macrófagos,

no había ninguna información sobre el mecanismo de entrada de este patógeno en células no fagocíticas (de la Peña-Moctezuma y Prescott, 1995). En el presente trabajo hemos demostrado que la pre incubación de *R. equi* con suero de conejo anti-*R. equi* bloquea la invasión por este patógeno. Esto puede ser explicado por la presencia de anticuerpos bloqueantes en la superficie de *R. equi*, que impiden la interacción entre posibles adhesinas bacterianas y potenciales receptores de superficie de las células A549. Se necesitarían estudios adicionales para identificar dichos receptores implicados en la entrada de *R. equi* en células epiteliales.

Por otro lado, hemos observado que el proceso de adherencia está mediado por un contacto íntimo entre las bacterias y las microvellosidades celulares. Dicho contacto parece iniciarse en un polo de la bacteria, y luego extenderse al resto del cuerpo bacteriano. Tras la adherencia, hemos querido averiguar más sobre las siguientes etapas de la interacción, procediendo a estudiar mediante diferentes técnicas de microscopía la entrada y la supervivencia intracelular. Los aspectos morfológicos del proceso de entrada de *R. equi* en células epiteliales de pulmón humanas recuerdan al mecanismo de tipo "Zipper", en donde la membrana de célula eucariota, sin que exista una remodelación exagerada de la misma, rodea a la bacteria durante el proceso. Dicho mecanismo es similar al descrito para la invasión de otros patógenos como *Listeria monocytogenes*, e incluso corinebacterias como *Corynebacterium diphtheriae* (Bertuccini y cols., 2004). Este mecanismo de tipo Zipper podría ser "el esperado", al ser *R. equi* un Gram positivo, como alternativa al otro mecanismo "Trigger", ampliamente distribuido en patógenos Gram negativos que producen sistemas de secreción tipo III y IV. Sin embargo, existen en la literatura datos que indican que el mecanismo "Trigger" es utilizado también por patógenos Gram positivos. (Nitsche-Schmitz y cols., 2007; Cossart y Toledo-Arana, 2008).

Por otra parte, aunque menos frecuente, hemos observado también otra morfología durante el proceso de entrada, donde se evidencian **largas invaginaciones que recuerdan a un "agujero"** en la membrana celular eucariota. Estas invaginaciones reciben el nombre de caveolas, un tipo especial de balsa lipídica con función endocítica. Estas caveolas son utilizadas por otros patógenos Gram positivos o Gram negativos para entrar en las células (Molinari *y cols.*, 2000; Nitsche-Schmitz *y cols.*, 2007; Sukumaran *y cols.*, 2002). Por lo tanto, *R. equi* podría pertenecer al grupo de patógenos que utilizan la maquinaria endocítica celular para la invasión.

La localización intracelular puede perseguir la utilización de metabolitos del hospedador, para favorecer la multiplicación en compartimentos alejados del alcance de las defensas del propio hospedador. En algunos casos, hemos observado células lisadas en los cultivos infectados, indicando que las bacterias podrían ser las responsables de esta muerte celular. En el presente trabajo, hemos observado además, que numerosas cepas son capaces de multiplicarse dentro de las células.

De especial interés es la producción de mediadores pro-inflamatorios (IL-6 e IL-8) por las células infectadas, que fueron inducidos mayoritariamente tras infecciones con cepas de *R. equi* no mucosas (sin plásmido). Esas citoquinas juegan un papel en la defensa del hospedador controlando la proliferación bacteriana (Dube *y cols.*, 2004; Wiersinga *y cols.*, 2006; Dann *y cols.*, 2008), aunque podrían también contribuir a la enfermedad pulmonar (Cromwell *y cols.*, 1992; Pittet *y cols.*, 1997). Como *R. equi* afecta sobre todo a individuos inmunodeprimidos, la secreción de IL-6 puede ser también de especial importancia, ya que se cree que favorece la replicación de VIH-1 (Copeland, 2005).

El presente modelo de cultivo celular epitelial podría utilizarse para realizar comparaciones con células fagocíticas en cuanto a la producción de mediadores pro- o anti-inflamatorios. Por ejemplo, la inducción de IL-6 por cepas no mucosas de *R. equi* en nuestro modelo concuerda con los datos obtenidos en macrófagos de ratón (Giguère y Prescott, 1998), donde se atribuye dicha producción (aunque de manera no estadísticamente significativa) a una mayor invasión, en lugar de a algún aspecto relacionado con el plásmido de virulencia.

Respecto a IL-8, ésta es una potente quimiocina producida por varios tipos celulares, que dirige la migración de neutrófilos a los sitios de inflamación (Hoffmann *y cols.*, 2002). Algunos estudios en animales han revelado que la posterior inflamación producida por neutrófilos en las vías aéreas es esencial para la eliminación de patógenos de los pulmones (van Faassen *y cols.*, 2007; Okuda *y cols.*, 2011). Además, se ha demostrado que existe una conexión directa entre la invasión de células epiteliales pulmonares y la patogénesis de estreptococos del grupo B, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Rickettsia conorii*, y *Paracoccidioides brasiliensis* (Doran *y cols.*, 2002; Yang *y cols.*, 2002; Frick *y cols.*, 2000; Kaplanski *y cols.*, 1995; Maza *y cols.*, 2012).

Ahora bien, si la mayor tasa de invasión se correlaciona con la mayor inducción de citoquinas pro-inflamatorias en cepas no mucosas de *R. equi*, las cepas mucosas podrían seguir una estrategia distinta: mantener una tasa de invasión baja para prevenir la secreción de estas citoquinas pro-inflamatorias, y por lo tanto, evitar así la activación del sistema inmunitario que podría controlar rápidamente la infección.

Todos estos datos demuestran que *R. equi* es capaz de adherirse, invadir y replicarse en el interior de células no fagocíticas humanas, y que la invasión y multiplicación intracelular pueden contribuir a la patogénesis, al progreso de la enfermedad pulmonar o a la dispersión de

la bacteria. Esto último podría estar relacionado con las manifestaciones clínicas en infecciones humanas, donde *R. equi* ha invadido otros órganos como el cerebro o el riñón, sugiriendo que la patología extra pulmonar por *R. equi* podría ser consecuencia de una diseminación bacteriana hematogena (Rahamat-Langendoen *y cols.*, 2009; Ulivieri y Oliveri, 2006; Paasche, 2009).

5.3. Sensibilidad de *R. equi* frente a agentes antimicrobianos

Para el estudio de la sensibilidad a agentes antimicrobianos se utilizaron 131 cepas de *R. equi*, de las cuales 49 fueron cepas aisladas de pacientes humanos (grupo 1), 35 fueron cepas aisladas de potros con neumonía (grupo 2) y 47 fueron aislados ambientales (grupo 3). Se utilizaron en el presente trabajo 29 antimicrobianos, que fueron seleccionados teniendo en cuenta dos criterios: a) ensayar los compuestos representativos de los principales grupos de antimicrobianos b) los tratamientos de las infecciones por *R. equi* previamente reportados.

El genoma *de R. equi* 103 tiene una variedad de determinantes de **resistencia a antimicrobianos que incluyen diez β -lactamasas**, cinco fosfotransferasas (determinantes de resistencia a aminoglucósidos) y cuatro bombas de expulsión (Letek *y cols.*, 2010).

Los resultados de sensibilidad para todos los antimicrobianos fueron esencialmente similares para los tres grupos de cepas (aislados clínicos humanos, equinos y ambientales). Hemos basado la discusión en la comparación de los datos de sensibilidad del grupo de aislados clínicos humanos con los publicados anteriormente en la literatura.

Nuestras 49 cepas aisladas de pacientes humanos con VIH presentaron un bajo porcentaje de sensibilidad a los antimicrobianos betalactámicos que evaluamos: el 44,9% de las cepas eran sensibles a

amoxicilina-ácido clavulánico, 2,04% sensibles a ampicilina, 10,2% sensibles a cefalotina, 10,2% sensibles a cefepima, 51% sensibles a cefotaxima, 67,3% sensibles a cefuroxima y 0% sensibles a penicilina, excepto a los carbapenemas: el 95,9% (47/49) de las cepas fueron sensibles a imipenem y meropenem, con unas CMI₉₀ de 0,25 y 1 µg/mL respectivamente. Estos resultados se corroboran con lo descrito por Topino y colaboradores según un estudio realizado con 10 cepas de *R. equi* aislados de pacientes con VIH: amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, cefotaxima, cefalotina y penicilina no eran activos, mientras que imipenem y meropenem fueron activos contra todas las cepas ensayadas (Topino *y cols.*, 2010).

Nordmann y Ronco, también estudiaron la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de 4 aislados humanos de *R. equi*, obteniendo una CMI₅₀ de 128 µg/mL para cefalotina (Nordmann y Ronco, 1992). En nuestro estudio también obtuvimos una CMI₅₀ de 128 µg/mL y una CMI₉₀>256 µg/mL para cefalotina.

Por otro lado Kitamura y colaboradores publicaron el primer caso de sepsis causada por *Rhodococcus corynebacterioides* en un paciente con síndrome mielodisplástico. Este aislado se mostró susceptible a cefepima en las pruebas de sensibilidad (CMI = 1 µg/mL). Sin embargo el tratamiento con este compuesto no funcionó (Kitamura *y cols.*, 2012). Considerando nuestros resultados y teniendo en cuenta la bibliografía descrita, podemos decir que no sería recomendable la utilización de estos antimicrobianos betalactámicos (amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, cefalotina, cefepima, cefotaxima, cefuroxima y penicilina). Sin embargo si se recomendaría la utilización de imipenem y meropenem en el tratamiento de infecciones por *R. equi*.

En los ensayos realizados *in vitro* con los antimicrobianos glicopeptídicos: teicoplanina (CMI₉₀ ≤ 0,06 µg/mL) y vancomicina

(CMI₉₀=0,25 µg/mL) observamos que el 100% de las 49 cepas fueron sensibles a ambos antimicrobianos.

Estos resultados se corresponden con los descritos por Topino y colaboradores, en los que el 75% (6/8) y 88% (8/9) de las cepas estudiadas eran sensibles a teicoplanina y vancomicina respectivamente (Topino *y cols.*, 2010). Por otro lado Tse y colaboradores describieron el caso de un paciente con nefritis intersticial asociada a una infección pulmonar por *R. equi*, y en el tratamiento del paciente incluyeron meropenem y vancomicina, con resultados favorables (Tse *y cols.*, 2004). Estos datos nos indican que los antimicrobianos glicopéptidos (teicoplanina y vancomicina) son adecuados para el tratamiento de las infecciones por *R. equi*.

Los ensayos de susceptibilidad realizados *in vitro* con los antimicrobianos aminoglicosídicos amicacina (CMI₉₀=8 µg/mL), gentamicina (CMI₉₀=2 µg/mL) y tobramicina (CMI₉₀=4 µg/mL) dieron como resultado un alto porcentaje de cepas sensibles a estos antimicrobianos: el 100% de las cepas ensayadas fueron sensibles a amicacina, el 87,8% fueron sensibles a gentamicina y el 98% de las 49 cepas ensayadas fueron sensibles a tobramicina. Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Topino y colaboradores (Topino *y cols.*, 2010), 66% (4/6) de las cepas sensibles a amicacina, 71% (5/7) sensibles a gentamicina y 50% (1/2) sensibles a tobramicina, observamos que estos antimicrobianos aminoglicosídicos eran más activos contra nuestras cepas. No obstante hay que puntualizar que la diferencia en el número de cepas analizado en los dos estudios limita el valor de la comparación de los datos.

En cuanto al uso de estos antimicrobianos (amicacina, gentamicina y tobramicina) como tratamiento en la infección por *R. equi*, según nuestros resultados podríamos indicar que en principio podrían ser utilizados, solos o combinados con otros antimicrobianos, como en el

caso reportado por Borghi y colaboradores. Un paciente que recibía quimioterapia y radioterapia sufrió una infección pulmonar por *R. equi*, siendo tratado con levofloxacin y ampicacina, seguido de rifampicina durante dos meses. El tratamiento tuvo éxito y la infección remitió (Borghi *y cols.*, 2008).

Los ensayos con los antimicrobianos macrólidos (azitromicina (CMI₉₀=1 µg/mL), claritromicina (CMI₉₀≤0,25 µg/mL), eritromicina (CMI₉₀=0,5 µg/mL) y espiramicina (CMI₉₀=64 µg/mL)) presentaron un alto porcentaje de cepas sensibles a estos antimicrobianos: 95,9%, 100% y 93,9% de las 49 cepas estudiadas mostraron sensibilidad a azitromicina, claritromicina y eritromicina respectivamente.

Nuestros resultados se corresponden con los de Topino y colaboradores en el caso de claritromicina y eritromicina: las 6 cepas analizadas eran sensibles a los dos antimicrobianos (Topino *y cols.*, 2010). En base a estos resultados, podemos recomendar el tratamiento de la infección por *R. equi* con un macrólido (azitromicina, claritromicina o eritromicina) o una combinación de éstos con otros antimicrobianos, como lo describieron Nath y colaboradores, refiriéndose a una paciente con mastitis granulomatosa por *R. equi* que respondió bien al tratamiento combinado de ciprofloxacina y azitromicina (Nath *y cols.*, 2013).

No recomendamos la utilización de clindamicina en el tratamiento de las infecciones por *R. equi*, ya que encontramos que todas nuestras cepas eran resistentes (CMI₉₀=32 µg/mL), coincidiendo con lo publicado por Topino y colaboradores (Topino *y cols.*, 2010).

Los resultados de los ensayos con dos tetraciclinas [doxiciclina (CMI₉₀=4 µg/mL) y tetraciclina (CMI₉₀=16 µg/mL)] y glicilciclina [tigeciclina (CMI₉₀=1 µg/mL)], mostraron una alta sensibilidad a doxiciclina (98%) y en menor medida a tigeciclina (77,55%).

Estos resultados se correlacionan con los de Salas y colaboradores, que estudiaron la actividad de tigeciclina frente a 20 cepas de *R. equi*, obteniendo una $CMI_{90}=0.5 \mu\text{g/mL}$ (Salas y cols., 2008). En nuestro estudio con 49 cepas obtuvimos una CMI_{90} de $1 \mu\text{g/mL}$ para tigeciclina. Russo y colaboradores describieron el caso de un paciente con síndrome nefrítico con absceso retroperitoneal debido a *R. equi* que fue tratado con éxito con linezolid y tigeciclina (Russo y cols., 2010). Con los resultados obtenidos en el presente trabajo y de acuerdo a lo descrito, se podría sugerir el tratamiento de la infección por *R. equi* con doxiciclina y tigeciclina.

En nuestro estudio de la susceptibilidad *in vitro* de las cepas clínicas frente a ciprofloxacina ($CMI_{90}=16 \mu\text{g/mL}$), levofloxacina ($CMI_{90}=16 \mu\text{g/mL}$) y moxifloxacina ($CMI_{90}=1 \mu\text{g/mL}$), observamos que el 46,9 % de las cepas fueron sensibles a ciprofloxacina, el 24,5% sensibles a levofloxacina y el 77,6% sensibles a moxifloxacina. Nuestros resultados se corresponden con lo publicado por Rolston y colaboradores, que estudiaron las actividades antimicrobianas *in vitro* de moxifloxacina y otras quinolonas, frente a 25 *R. equi* aislados de pacientes con cáncer, encontrando que la moxifloxacina era la quinolona más activa, con una $CMI_{90}=0,6 \mu\text{g/mL}$ (Rolston y cols., 2003). De acuerdo a nuestros resultados y a los descritos por Rolston y colaboradores podemos indicar que entre las quinolonas, moxifloxacina sería un antimicrobiano de elección para el tratamiento de las infecciones por *R. equi*.

En los ensayos realizados con trimetoprim/sulfametoxazol obtuvimos un 77,6% de cepas sensibles (38/49), con una $CMI_{90}=4 \mu\text{g/mL}$. De las 7 cepas estudiadas por Topino y colaboradores solamente una (14%) era sensible a cotrimoxazol. Sin embargo, según su revisión de los datos anteriormente publicados, el 55% de las cepas eran sensibles a cotrimoxazol (Topino y cols., 2010). Por lo que se sugiere realizar un estudio de sensibilidad *in vitro* antes de iniciar un tratamiento con este antimicrobiano.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* obtenidos con cloranfenicol y rifampicina presentaron un valor de CMI₉₀ idéntico (16 µg/mL) para los dos compuestos. Un 81,6% (40/49) de las cepas eran sensibles a cloranfenicol y un 87,8% (43/49) sensibles a rifampicina. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Topino y colaboradores, que mencionan un 100% (6/6) cepas sensibles a cloranfenicol y 75% (6/8) sensibles a rifampicina. En la revisión de la literatura que describen, el 71,8% (23/32) de las cepas eran sensibles a cloranfenicol y el 94,4% (102/108) a rifampicina (Topino *y cols.*, 2010). Por lo que se puede proponer un tratamiento de las infecciones por *R. equi* con cloranfenicol y rifampicina.

Ninguna de nuestras cepas de *R. equi* de origen clínico fue sensible a daptomicina, con una CMI₉₀ >64µg/mL. Aunque la daptomicina es activa *in vitro* y produce un efecto bactericida frente a la mayoría de las bacterias gram positivas, incluidas algunas corinebacterias (Navas *y cols.*, 2012), no resultó activa frente a nuestros aislados de *R. equi*. No hemos encontrado ningún otro estudio sobre la actividad de daptomicina frente a *Rhodococcus* u otros actinomicetos. La daptomicina actúa sobre la membrana de las bacterias Gram +, aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud. Resultaría interesante continuar este trabajo estudiando el mecanismo de resistencia de *R. equi* a daptomicina.

Finalmente comentamos algunos artículos que refieren tratamientos combinados de las infecciones por *R. equi* con varios antibióticos.

En 1998 se presentó un caso de absceso pulmonar por *R. equi* en un paciente con síndrome de Evans que estaba siendo tratado con corticoides. El paciente fue tratado exitosamente con una combinación de imipenem, claritromicina, vancomicina y ciprofloxacina (Tsang *y cols.*, 1998).

Tse y colaboradores publicaron un caso de nefritis intersticial asociada a una infección pulmonar por *R. equi*. En el tratamiento del

paciente, que se prolongó durante 36 semanas, incluyeron meropenem y vancomicina, con resultados favorables (Tse *y cols.*, 2004).

El Karoui y colaboradores (El Karoui *y cols.*, 2009), describieron un caso de neumonía por *R. equi* en un paciente transplantado, que recibió tratamiento combinado de un carbapenem más teicoplanina. La infección remitió. Esta combinación parece ser un tratamiento eficaz para esta infección, aunque deberán realizarse más estudios para sostener esta recomendación.



Conclusiones

6. CONCLUSIONES

- 6.1.** La discriminación entre *R. equi* y otros actinomicetos, especialmente con las especies del género *Dietzia*, es problemática en el laboratorio de microbiología clínica. En ausencia de marcadores específicos, se requiere la secuenciación del gen ADNr 16S para la correcta adscripción de los aislados.
- 6.2.** La espectrometría de masas MALDI-TOF permite identificar con fiabilidad *R. equi*, distinguiéndolo de *Dietzia* spp.
- 6.3.** El pre-tratamiento con etanol de los cultivos bacterianos mejora la eficiencia y precisión de la espectrometría de masas MALDI-TOF aplicada a la identificación de *R. equi*.
- 6.4.** Las cepas de *R. equi* aisladas de pacientes humanos son capaces de adherirse, entrar y replicarse dentro de las células epiteliales humanas de pulmón. Su tráfico intracelular podría contribuir a la propagación de la infección y a la patogénesis, con la consiguiente progresión de la enfermedad.
- 6.5.** El plásmido de virulencia de *R. equi* no es necesario para la adherencia, invasión o para el establecimiento de un nicho replicativo dentro de las células humanas no fagocíticas.
- 6.6.** Las células epiteliales pulmonares infectadas con cepas clínicas de *R. equi* incrementan su producción de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8, lo que puede contribuir a la progresión de la enfermedad.
- 6.7.** Los aislados de *R. equi* de origen humano, animal y ambiental no difieren esencialmente en su sensibilidad a los 29 agentes antimicrobianos ensayados.
- 6.8.** Los antimicrobianos que mostraron una mayor actividad *in vitro* contra los *R. equi* aislados de humanos fueron imipenem,

Conclusiones

meropenem, teicoplanina, vancomicina, ampicacina, claritromicina, doxiciclina, moxifloxacina, cloranfenicol y rifampicina.



Bibliografía

7

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abonnenc, M., Qiao, L., Liu, B. y Girault, H. H. (2010). Electrochemical aspects of electrospray and laser desorption/ionization for mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry* **3**: 231-254.
- About, I., Castan, B., Capdeville, J. y Vanche, J. (1996). Accès pulmonaire à *Rhodococcus equi* lors de l'infection par le VIH. *La Revue De Médecine Interne* **17**: 410-414.
- Al Akhrass, F., Al Wohoush, I., Chaftari, A. M., Reitzel, R., Jiang, Y., Ghannoum, M. y cols. (2012). *Rhodococcus* bacteremia in cancer patients is mostly catheter related and associated with biofilm formation. *PloS One* **7**: 32945.
- Alatoom, A. A., Cazanave, C. J., Cunningham, S. A., Ihde, S. M. y Patel, R. (2012). Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **50**: 160-163.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Amiri-Eliasi, B. y Fenselau, C. (2001). Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Analytical Chemistry* **73**: 5228-5231.
- Andersen, C., Rak, B. y Benz, R. (1999). The gene *bglH* present in the *bgl* operon of *Escherichia coli*, responsible for uptake and fermentation of beta-glucosides encodes for a carbohydrate-specific outer membrane porin. *Molecular Microbiology* **31**: 499-510.
- Andersen, S. J., Quan, S., Gowan, B. y Dabbs, E. R. (1997). Monooxygenase-like sequence of a *Rhodococcus equi* gene conferring increased resistance to rifampin by inactivating this antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 218-221.

- Arlotti, M., Zoboli, G., Moscatelli, G. L., Magnani, G., Maserati, R., Borghi, V. y cols. (1996). *Rhodococcus equi* infection in HIV-positive subjects: A retrospective analysis of 24 cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **28**: 463-467.
- Arnold, C. E. y Chaffin, M. K. (2012). Abdominal abscesses in adult horses: 61 cases (1993-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **241**: 1659-1665.
- Arya, B., Hussian, S. y Hariharan, S. (2004). *Rhodococcus equi* pneumonia in a renal transplant patient: A case report and review of literature. *Clinical Transplantation* **18**: 748-752.
- Ashour, J. y Hondalus, M. K. (2003). Phenotypic mutants of the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi* created by *in vivo Himar1* transposon mutagenesis. *Journal of Bacteriology* **185**: 2644-2652.
- Ausubel, F.M, Brent, R., Kingston, R.E., Moor, D.D., Seidman, J.G, y Smith, J.A. (1987). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- Baba, T., Nishiuchi, Y. y Yano, I. (1997). Composition of mycolic acid molecular species as a criterion in nocardial classification. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 795-801.
- Balazova, T., Makovcova, J., Sedo, O., Slany, M., Faldyna, M. y Zdrahal, Z. (2014). The influence of culture conditions on the identification of *Mycobacterium* species by MALDI-TOF MS profiling. *FEMS Microbiology Letters*.
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E. y cols. (2008). Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 5402-5407.
- Barton, M. D. (1986). Use of neomycin for treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Australian Veterinary Journal* **63**: 163.
- Barton, M. D. y Fulton, I. C. (1980). Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium equi*. *Australian Veterinary Journal* **56**: 339-342.

- Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. y Christofi, N. (1998). The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology* **85**: 195-210.
- Bemer-Melchior, P., Haloun, A., Riegel, P. y Drugeon, H. B. (1999). Bacteremia due to *Dietzia maris* in an immunocompromised patient. *Clinical Infectious Diseases* **29**: 1338-1340.
- Bermejo Garcia I. (2001). *Rhodococcus equi*: Aspectos microbiológicos y clínicos servicio de microbiología Hospital Universitario de Getafe. Madrid. SEIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Bertuccini, L., Baldassarri, L. y von Hunolstein, C. (2004). Internalization of non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* **37**: 111-118.
- Biehle, J. R., Cavalieri, S. J., Felland, T. y Zimmer, B. L. (1996). Novel method for rapid identification of *Nocardia* species by detection of preformed enzymes. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 103-107.
- Bille, E., Dauphin, B., Leto, J., Bougnoux, M. E., Beretti, J. L., Lotz, A. y cols. (2012). MALDI-TOF MS andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection* **18**: 1117-1125.
- Birkenkamp-Demtroder, K., Christensen, L. L., Olesen, S. H., Frederiksen, C. M., Laiho, P., Aaltonen, L. A. y cols. (2002). Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Research* **62**: 4352-4363
- Bittar, F., Cassagne, C., Bosdure, E., Stremmer, N., Dubus, J. C., Sarles, J. y cols. (2010). Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients, France. *Emerging Infectious Diseases* **16**: 1231-1236.
- Bizet, C., Barreau, C., Harmant, C., Nowakowski, M. y Pietfroid, A. (1997). Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests ("biotype-100" strips). *Research in Microbiology* **148**: 799-809.
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G. y Prod'hom, G. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for

- identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 1549-1554.
- Bizzini, A., Jaton, K., Romo, D., Bille, J., Prod'homme, G. y Greub, G. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 693-696.
- Boiron, P. y Provost, F. (1990). Enzymatic characterization of *Nocardia* spp. and related bacteria by API ZYM profile. *Mycopathologia* **110**: 51-56.
- Borghi, E., La Francesca, M., Gazzola, L., Marchetti, G., Zonato, S., Foa, P. y cols. (2008). *Rhodococcus equi* infection in a patient with spinocellular carcinoma of unknown origin. *Journal of Medical Microbiology* **57**: 1431-1433.
- Bou, G., Fernandez-Olmos, A., Garcia, C., Saez-Nieto, J. A. y Valdezate, S. (2011). Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **29**: 601-608.
- Bowles, P. M., Woolcock, J. B. y Mutimer, M. D. (1987). Experimental infection of mice with *Rhodococcus equi*: Differences in virulence between strains. *Veterinary Microbiology* **14**: 259-268.
- Briglia, M., Rainey, F. A., Stackebrandt, E., Schraa, G. y Salkinoja-Salonen, M. S. (1996). *Rhodococcus percolatus* sp. nov., a bacterium degrading 2,4,6-trichlorophenol. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 23-30.
- Byrne, C. M., Clyne, M. y Bourke, B. (2007). *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Microbiology* **153**: 561-569.
- Cano, D. A., Martínez-Moya, M., Pucciarelli, M. G., Groisman, E. A., Casadesus, J. y García-Del Portillo, F. (2001). *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infection and Immunity* **69**: 6463-6474.
- Capdevila, J. A., Bujan, S., Gavalda, J., Ferrer, A. y Pahissa, A. (1997). *Rhodococcus equi* pneumonia in patients infected with the human immunodeficiency virus. Report of 2 cases and review of the literature. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **29**: 535-541.

- Carbonnelle, E., Beretti, J. L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., y cols. (2007). Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2156-2161.
- Casadevall, A. (2008). Evolution of intracellular pathogens. *Annual Review of Microbiology* **62**: 19-33.
- Chaffin, M. K., Cohen, N. D., Martens, R. J., O'Connor, M. y Bernstein, L. R. (2011). Evaluation of the efficacy of gallium maltolate for chemoprophylaxis against pneumonia caused by *Rhodococcus equi* infection in foals. *American Journal of Veterinary Research* **72**: 945-957.
- Chaurand, P., Schwartz, S. A. y Caprioli, R. M. (2002). Imaging mass spectrometry: A new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**: 676-681.
- Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P. y cols. (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 1169-1175.
- Christie, R., Atkins, N. y Munch-Petersen, E. (1944). A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* **22**.
- Chun, J., Blackall, L. L., Kang, S. O., Hah, Y. C. y Goodfellow, M. (1997). A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall y cols. as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 127-131.
- Clark, C. G., Kruczkiewicz, P., Guan, C., McCorrister, S. J., Chong, P., Wylie, J. y cols. (2013). Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *Journal of Microbiological Methods* **94**: 180-191.

- Clarridge, J. E., 3rd. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* **17**: 840-62.
- Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V. y Gordon, D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology* **14**: 1584-1586.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012a). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012b). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22th Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Copeland, K. F. (2005). Modulation of HIV-1 transcription by cytokines and chemokines. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **5**: 1093-1101.
- Cossart, P. y Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and Infection* **10**: 1041-1050.
- Cromwell, O., Hamid, Q., Corrigan, C. J., Barkans, J., Meng, Q., Collins, P. D. y cols. (1992). Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* **77**: 330-337.
- Dabbs, E. R. (1998). Cloning of genes that have environmental and clinical importance from *Rhodococci* and related bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**: 155-167.
- Dabbs, E. R., Yazawa, K., Mikami, Y., Miyaji, M., Morisaki, N., Iwasaki, S. y cols. (1995). Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 1007-1009.
- Dann, S. M., Spehlmann, M. E., Hammond, D. C., Iimura, M., Hase, K., Choi, L. J. y cols. (2008). IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a

- microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *Journal of Immunology* **180**: 6816-6826.
- Darrah, P. A., Hondalus, M. K., Chen, Q., Ischiropoulos, H. y Mosser, D. M. (2000). Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. *Infection and Immunity* **68**: 3587-3593.
- de la Pena-Moctezuma, A. y Prescott, J. F. (1995). Association with HeLa cells by *Rhodococcus equi* with and without the virulence plasmid. *Veterinary Microbiology* **46**: 383-392.
- Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J. L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I. y cols. (2008). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of non-fermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* **46**: 3361-3367.
- Deininger, S. O., Ebert, M. P., Futterer, A., Gerhard, M. y Rocken, C. (2008). MALDI imaging combined with hierarchical clustering as a new tool for the interpretation of complex human cancers. *Journal of Proteome Research* **7**: 5230-5236.
- Donisi, A., Suardi, M. G., Casari, S., Longo, M., Cadeo, G. P. y Carosi, G. (1996). *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected patients. *AIDS* **10**: 359-362.
- Doran, K. S., Chang, J. C., Benoit, V. M., Eckmann, L. y Nizet, V. (2002). Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *The Journal of Infectious Diseases* **185**: 196-203.
- Dorn, B. R., Leung, K. L. y Progulske-Fox, A. (1998). Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infection and Immunity* **66**: 6054-6057.
- Dube, P. H., Handley, S. A., Lewis, J. y Miller, V. L. (2004). Protective role of interleukin-6 during *Yersinia enterocolitica* infection is mediated through the modulation of inflammatory cytokines. *Infection and Immunity* **72**: 3561-3570.

- Dupont, C., Sivadon-Tardy, V., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J. L., Alvarez, A. S. y cols. (2010). Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clinical Microbiology and Infection* **16**: 998-1004.
- Ehrt, S. y Schnappinger, D. (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: Defence against host stresses. *Cellular Microbiology* **11**: 1170-1178.
- Eigner, U., Holfelder, M., Oberdorfer, K., Betz-Wild, U., Bertsch, D. y Fahr, A. M. (2009). Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clinical Laboratory* **55**: 289-296.
- El Karoui, K., Guillet, C., Sekkal, N., Lanternier, F., Mechai, F., Hue, K. y cols. (2009). Synergistic effect of carbapenem-teicoplanin combination during severe *Rhodococcus equi* pneumonia in a kidney transplant recipient. *Transplant Infectious Disease* **11**: 359-362.
- Elissalde, G. S., Renshaw, H. W. y Walberg, J. A. (1980). *Corynebacterium equi*: An inter-host review with emphasis on the foal. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **3**: 433-445.
- Emonet, S., Shah, H. N., Cherkaoui, A. y Schrenzel, J. (2010). Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection* **16**: 1604-1613.
- Euzéby, J. P. 2013. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.net>
- Fernandez-Mora, E., Polidori, M., Luhrmann, A., Schaible, U. E. y Haas, A. (2005). Maturation of *Rhodococcus equi*-containing vacuoles is arrested after completion of the early endosome stage. *Traffic* **6**: 635-653.
- Fines, M., Pronost, S., Maillard, K., Taouji, S. y Leclercq, R. (2001). Characterization of mutations in the *rpoB* gene associated with rifampin resistance in *Rhodococcus equi* isolated from foals. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 2784-2787.

- Finnerty, W. R. (1992). The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. Annual Review of Microbiology **46**: 193-218.
- Fitzgerald, S. D. y Yamini, B. (1995). Rhodococcal abortion and pneumonia in an equine fetus. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **7**: 157-158.
- Flynn, O., Quigley, F., Costello, E., O'Grady, D., Gogarty, A., Mc Guirk, J. y cols. (2001). Virulence-associated protein characterisation of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. Veterinary Microbiology **78**: 221-228.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. y Weissfeld, A. S. (2009). Diagnóstico microbiológico (12th ed.) Ed. Médica Panamericana.
- Freestone, J. F., Hietala, S., Moulton, J. y Vivrette, S. (1987). Acquired immunodeficiency in a seven-year-old horse. Journal of the American Veterinary Medical Association **190**: 689-691.
- Frick, A. G., Joseph, T. D., Pang, L., Rabe, A. M., St Geme, J. W., 3rd y Look, D. C. (2000). *Haemophilus influenzae* stimulates ICAM-1 expression on respiratory epithelial cells. Journal of Immunology **164**: 4185-4196.
- Friedrichs, C., Rodloff, A. C., Chhatwal, G. S., Schellenberger, W. y Eschrich, K. (2007). Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. Journal of Clinical Microbiology **45**: 2392-2397.
- Friis, L. M., Pin, C., Pearson, B. M. y Wells, J. M. (2005). *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. Journal of Microbiological Methods **61**: 145-160.
- Funke, G., Renaud, F. N., Freney, J. y Riegel, P. (1997). Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) coryne database 2.0. Journal of Clinical Microbiology **35**: 3122-3126.
- Gabriels, P., Joosen, H., Put, E., Verhaegen, J., Magerman, K. y Cartuyvels, R. (2006). Recurrent *Rhodococcus equi* infection with fatal outcome in an immunocompetent patient. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **25**: 46-48.

- Gaillot, O., Blondiaux, N., Loiez, C., Wallet, F., Lemaitre, N., Herwegh, S. y cols. (2011). Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 4412-11.
- Garton, N. J., Gilleron, M., Brando, T., Dan, H. H., Giguere, S., Puzo, G. y cols. (2002). A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 31722-31733.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. y cols. (1973). *In vitro* cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51**: 1417-1423.
- Giebel, R. A., Fredenberg, W. y Sandrin, T. R. (2008). Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Research* **42**: 931-940.
- Giguere, S. y Prescott, J. F. (1997). Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Microbiology* **56**: 313-334.
- Giguere, S. y Prescott, J. F. (1998). Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, **66**: 1848-1854.
- Giguere, S., Wilkie, B. N. y Prescott, J. F. (1999). Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, **67**: 5041-5047.
- Girault, I., Lerebours, F., Tozlu, S., Spyrtos, F., Tubiana-Hulin, M., Lidereau, R. y cols. (2002). Real-time reverse transcription PCR assay of CYP19 expression: Application to a well-defined series of post-menopausal breast carcinomas. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **82**: 323-332.

- Godet, C., Beraud, G. y Cadranet, J. (2012). Pneumonies bactériennes chez les personnes infectées par le VIH (hors mycobactéries). *Revue Des Maladies Respiratoires* **29**: 1058-1066.
- Godreuil, S., Didelot, M. N., Perez, C., Lefleche, A., Boiron, P., Reynes, J. y cols. (2003). *Nocardia veterana* isolated from ascitic fluid of a patient with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 2768-2773.
- Golub, B., Falk, G. y Spink, W. W. (1967). Lung abscess due to *Corynebacterium equi* report of first human infection. *Annals of Internal Medicine* **66**: 1174-1177.
- Goodfellow M, M. L. (Ed.). (2006). The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. Dworkin F, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. (Eds). *The Prokaryotes* **3**: 843-888: Springer.
- Goodfellow, M. (1987). The taxonomic status of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* **14**: 205-209.
- Goodfellow, M. (1989). Genus *Rhodococcus*. In Williams, S. T., Sharpe, M.E. y Holt, J. G. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **4**: 2362-2371.
- Goodfellow, M. y Alderson, G. (1977). The actinomycete-genus *Rhodococcus*: A home for the "rhodochrous" complex. *Journal of General Microbiology* **100**: 99-122.
- Goodfellow, M., Alderson, G., y Chun, J. (1998). Rhodococcal systematics: Problems and developments. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**: 3-20.
- Goodfellow, M., Schaal, K. P., Zlotnik, H., Sandoval, H., Brown, J. M., Carlotti, A. y cols. (1993). Identification of some clinically significant actinomycetes. *Research in Microbiology* **144**: 647-651.
- Goosney, D. L., Knoechel, D. G. y Finlay, B. B. (1999). Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: Masters of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerging Infectious Diseases* **5**: 216-223.

- Gravet, A., Camdessouens-Miehe, G., Gessier, M., Peluso, A. R., Vogelsperger-Fuchs, B., Lohmann, C. y cols. (2011). The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory. *Pathologie-Biologie* **59**: 19-25.
- Gurtler, V. y Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**: 3-16.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988). Immunizations. *Antibodies: A Laboratory Manual*. 124-125.
- Harrison, F. C. (1929). The discoloration of halibut. *Canadian Journal of Research* **1**: 214-239.
- Harvey, R. L. y Sunstrum, J. C. (1991). *Rhodococcus equi* infection in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Reviews of Infectious Diseases* **13**: 139-145.
- Hietala, S. K. y Ardans, A. A. (1987). Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi*-exposed and non-exposed foals. *Veterinary Microbiology* **14**: 307-320.
- Hillenkamp, F. y Karas, M. (2000). Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *International Journal of Mass Spectrometry* **200**: 71-77.
- Hillenkamp, F. y Peter-Katalinic, J. (Eds.). (2007). *Maldi MS*. John Wiley y Sons.
- Hillidge, C. J. (1987). Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Veterinary Microbiology* **14**: 337-342.
- Hines, S. A., Kanaly, S. T., Byrne, B. A. y Palmer, G. H. (1997). Immunity to *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* **56**: 177-185.
- Hines, S. A., Stone, D. M., Hines, M. T., Alperin, D. C., Knowles, D. P., Norton, L. K. y cols. (2003). Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10**: 208-215.

- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. y Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* **72**: 847-855.
- Hondalus, M. K. (1997). Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* **56**: 257-268.
- Hondalus, M. K. y Mosser, D. M. (1994). Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infection and Immunity* **62**: 4167-4175.
- Hong, C. B. y Donahue, J. M. (1995). *Rhodococcus equi*-associated necrotizing lymphadenitis in a llama. *Journal of Comparative Pathology* **113**: 85-88.
- Ichiyama, S., Shimokata, K. y Tsukamura, M. (1989). Carotenoid pigments of genus *Rhodococcus*. *Microbiology and Immunology* **33**: 503-508.
- Ilina, E. N., Borovskaya, A. D., Serebryakova, M. V., Chelysheva, V. V., Momynaliev, K. T., Maier, T. y cols. (2010). Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**: 328-334.
- Isberg, R. R. y 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.
- Ivshina, I.B., Kamenskikh, T.N. y Liapunov, Y.E. (1994). IEGM catalogue of strains of regional specialised collection of alkanotrophic microorganisms.
- Jacks, S. S., Giguere, S. y Nguyen, A. (2003). *In vitro* susceptibilities of *Rhodococcus equi* and other common equine pathogens to azithromycin, clarithromycin, and 20 other antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 1742-1745.
- Janicek, J. C., Kramer, J., Coates, J. R., Lattimer, J. C., Lacarrubba, A. M. y Messer, N. T. (2006). Intracranial abscess caused by *Rhodococcus equi* infection in a foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **228**: 251-253.

- Jeckel, S., Holmes, P., King, S., Whatmore, A. M. y Kirkwood, I. (2011). Disseminated *Rhodococcus equi* infection in goats in the UK. *The Veterinary Record* **169**: 56.
- Jones A., G. M. (2010). Genus II. *Rhodococcus* (Zopf 1891) emend Goodfellow y cols. 1998. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* **4**:1-65. Springer. Berlin.
- Jordana-Lluch, E., Martro Catala, E. y Ausina Ruiz, V. (2012). Mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica* **30**: 635-644.
- Jotwani, R. y Cutler, C. W. (2004). Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells *in vitro* and induces an inflammatory Th1 effector response. *Infection and Immunity* **72**: 1725-1732.
- Kampfer, P., Falsen, E., Frischmann, A., y Busse, H. J. (2012). *Dietzia aurantiaca* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**: 484-488.
- Kanaly, S. T., Hines, S. A. y Palmer, G. H. (1993). Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4+ T-lymphocyte-deficient transgenic mice. *Infection and Immunity* **61**: 4929-4932.
- Kanaly, S. T., Hines, S. A. y Palmer, G. H. (1995). Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. *Infection and Immunity* **63**: 3037-3041.
- Kanaly, S. T., Hines, S. A. y Palmer, G. H. (1996). Transfer of a CD4+ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. *Infection and Immunity* **64**: 1126-1132.
- Kaplanski, G., Teyssere, N., Farnarier, C., Kaplanski, S., Lissitzky, J. C., Durand, J. M. y cols. (1995). IL-6 and IL-8 production from cultured human endothelial cells stimulated by infection with *Rickettsia conorii* via a cell-associated IL-1 alpha-dependent pathway. *The Journal of Clinical Investigation* **96**: 2839-2844.

- Karah, N., Haldorsen, B., Hegstad, K., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., Samuelsen, O. y cols. (2011). Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66**: 738-744.
- Karas, M., Bachmann, D. y Hillenkamp, F. (1985). Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry* **57**: 2935-2939.
- Kedlaya, I., Ing, M. B. y Wong, S. S. (2001). *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: Case report and review. *Clinical Infectious Diseases* **32**: 39-46.
- Kinne, J., Madarame, H., Takai, S., Jose, S. y Wernery, U. (2011). Disseminated *Rhodococcus equi* infection in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Veterinary Microbiology* **149**: 269-272.
- Kitamura, Y., Sawabe, E., Ohkusu, K., Tojo, N. y Tohda, S. (2012). First report of sepsis caused by *Rhodococcus corynebacterioides* in a patient with myelodysplastic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* **50**: 1089-1091.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. y Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology* **56**: 341-361.
- Knochenmuss, R. y Zenobi, R. (2003). MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chemical Reviews* **103**: 441-452.
- Komijn, R. E., Wisselink, H. J., Rijsman, V. M., Stockhofe-Zurwieden, N., Bakker, D., van Zijderveld, F. G. y cols. (2007). Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* **120**: 352-357.
- Konrad, R., Berger, A., Huber, I., Boschert, V., Hormansdorfer, S., Busch, U. y cols. (2010). Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *European Communicable Disease Bulletin* **15**: 19699.

- Ladron, N., Fernandez, M., Agüero, J., Gonzalez Zorn, B., Vazquez-Boland, J. A. y Navas, J. (2003). Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 3241-3245.
- Letek, M., Gonzalez, P., Macarthur, I., Rodriguez, H., Freeman, T. C., Valero-Rello, A. y cols. (2010). The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: Cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genetics* **6**: e1001145.
- Letek, M., Ocampo-Sosa, A. A., Sanders, M., Fogarty, U., Buckley, T., Leadon, D. P. y cols. (2008). Evolution of the *Rhodococcus equi vap* pathogenicity island seen through comparison of host-associated *vapA* and *vapB* virulence plasmids. *Journal of Bacteriology* **190**: 5797-5805.
- Luhrmann, A., Mauder, N., Sydor, T., Fernandez-Mora, E., Schulze-Luehrmann, J., Takai, S. y cols. (2004). Necrotic death of *Rhodococcus equi*-infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. *Infection and Immunity* **72**: 853-862.
- M. Maurin y D. Raoult. (1993). Antibiotic penetration within eukaryotic cells. In: *Antimicrobial Agents and Intracellular Pathogens*. Edited by D. Raoult; 21-37.
- MacLachlan, J., Wotherspoon, A. T., Ansell, R. O. y Brooks, C. J. (2000). Cholesterol oxidase: Sources, physical properties and analytical applications. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **72**: 169-195.
- Madarame, H., Yaegashi, R., Fukunaga, N., Matsukuma, M., Mutoh, K., Morisawa, N. y cols. (1998). Pathogenicity of *Rhodococcus equi* strains possessing virulence-associated 15- to 17-kDa and 20-kDa antigens: experimental and natural cases in pigs. *Journal of Comparative Pathology* **119**: 397-405.
- Magnusson H (1923) Spezifische infektiöse Pneumonien beim Fohlen. Ein Neuer Eiterreger beim Pferd. *Arch Wiss Prakt Tierheilkd* **50**: 22-37.
- Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* **72**: 1156-1162.
- Makrai, L., Takayama, S., Denes, B., Hajtos, I., Sasaki, Y., Kakuda, T. y cols. (2005). Characterization of virulence plasmids and serotyping of *Rhodococcus*

- equi* isolates from submaxillary lymph nodes of pigs in Hungary. Journal of Clinical Microbiology **43**: 1246-1250.
- Mandrell, R. E., Harden, L. A., Bates, A., Miller, W. G., Haddon, W. F. y Fagerquist, C. K. (2005). Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum* and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Applied and Environmental Microbiology **71**: 6292-6307.
- Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Muller, E., Horre, R., Maier, T. y cols. (2009). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. Journal of Clinical Microbiology **47**: 2912-2917.
- Martin, D. W. y Mohr, C. D. (2000). Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. Infection and Immunity **68**: 24-29.
- Maza, P. K., Oliveira, P., Toledo, M. S., Paula, D. M., Takahashi, H. K., Straus, A. H. y cols. (2012). *Paracoccidioides brasiliensis* induces secretion of IL-6 and IL-8 by lung epithelial cells. Modulation of host cytokine levels by fungal proteases. Microbes and Infection **14**: 1077-1085.
- McNeil, M. M. y Brown, J. M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and microbiology. Clinical Microbiology Reviews **7**: 357-417.
- Meijer, W. G. y Prescott, J. F. (2004). *Rhodococcus equi*. Veterinary Research **35**: 383-396.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P. y cols. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of non-fermenting bacteria. Journal of Clinical Microbiology **46**: 1946-1954.
- Mills, S. D. y Finlay, B. B. (1994). Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. Microbial Pathogenesis **17**: 409-423.

- Misawa, N. y Blaser, M. J. (2000). Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* **68**: 6168-6175.
- Molinari, G., Rohde, M., Guzman, C. A. y Chhatwal, G. S. (2000). Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cellular Microbiology* **2**: 145-154.
- Mosmann, T. R. y Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* **7**: 145-173.
- Muir, D. B. y Pritchard, R. C. (1997). Use of the BioMerieux ID 32C yeast identification system for identification of aerobic actinomycetes of medical importance. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 3240-3243.
- Muntaner, L., Leyes, M., Payeras, A., Herrera, M. y Gutierrez, A. (1997). Radiologic features of *Rhodococcus equi* pneumonia in AIDS. *European Journal of Radiology* **24**: 66-70.
- Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M. y Pfaller, M. (2007). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM press. Washington, DC.
- Mutimer, M. y Woolcock, J. (1981). Some problems associated with the identification of *Corynebacterium equi*. *Veterinary Microbiology* **6**: 331-338.
- Natarajan, S., Milne, D., Jones, A. L., Goodfellow, M., Perry, J. y Koerner, R. J. (2005). *Dietzia* strain X: A newly described actinomycete isolated from confluent and reticulated papillomatosis. *The British Journal of Dermatology* **153**: 825-827.
- Nath, S. R., Mathew, A. P., Mohan, A. y Anila, K. R. (2013). *Rhodococcus equi* granulomatous mastitis in an immunocompetent patient. *Journal of Medical Microbiology* **62**: 1253-1255.
- Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. y Rubin, B. Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of Experimental Medicine* **158**: 670-689.

- Navas, J., Gonzalez-Zorn, B., Ladron, N., Garrido, P., y Vazquez-Boland, J. A. (2001). Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Journal of Bacteriology* **183**: 4796-4805.
- Navas, J., Salas, C., Calvo, J., y Martinez-Martinez, L. (2012). Activity of daptomycin and three comparator agents against non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates of clinical interest. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**: 776-778.
- Nesterenko, O., Nogina, T., Kasumova, S., Kvasnikov, E. y Batrakov, S. (1982). *Rhodococcus luteus* nom. nov. and *Rhodococcus maris* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**: 1-14.
- Nishiuchi, Y., Baba, T., Hotta, H. H. y Yano, I. (1999). Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid compositions of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica*, and *N. nova*. *Journal of Microbiological Methods* **37**: 111-122.
- Nitsche-Schmitz, D. P., Rohde, M. y Chhatwal, G. S. (2007). Invasion mechanisms of gram-positive pathogenic cocci. *Thrombosis and Haemostasis* **98**: 488-496.
- Nordmann, P. y Ronco, E. (1992). *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **29**: 383-393.
- Nordmann, P., Kerestedjian, J. J., y Ronco, E. (1992a). Therapy of *Rhodococcus equi* disseminated infections in nude mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**: 1244-1248.
- Nordmann, P., Ronco, E. y Nauciel, C. (1992b). Role of T-lymphocyte subsets in *Rhodococcus equi* infection. *Infection and Immunity* **60**: 2748-2752.
- Ocampo-Sosa, A. A., Lewis, D. A., Navas, J., Quigley, F., Callejo, R., Scotti, M. y cols. (2007). Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on *traA*, *vapA*, and *vapB* virulence plasmid markers. *The Journal of Infectious Diseases* **196**: 763-769.
- Okuda, J., Hayashi, N., Tanabe, S., Minagawa, S. y Gotoh, N. (2011). Degradation of interleukin 8 by the serine protease MucD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy* **17**: 782-792.

- O'Toole, G. A. y Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology* **28**: 449-461.
- Paasche, S. R. (2009). *Rhodococcus equi* infection in a surgical wound. *Clinical Laboratory Science* **22**: 141-145.
- Padilla, D., Acosta, F., Bravo, J., Grasso, V., Real, F. y Vivas, J. (2008). Invasion and intracellular survival of *Hafnia alvei* strains in human epithelial cells. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 1614-1622.
- Padilla, D., Acosta, F., Garcia, J. A., Real, F. y Vivas, J. R. (2009). Temperature influences the expression of fimbriae and flagella in *Hafnia alvei* strains: an immunofluorescence study. *Archives of Microbiology* **191**: 191-198.
- Paredes, E., Gallego, R., Canal, A., Araya, O., Chahuán, E., Thomas, P. y Zamora, J. (2000). Primer caso descrito en Chile de neumonía y colitis por *Rhodococcus equi* en un potrillo. *Archivos de Medicina Veterinaria* **32**.
- Parekh, N. R., Walker, A., Roberts, S. J. y Welch, S. J. (1994). Rapid degradation of the triazinone herbicide metamitron by a *Rhodococcus sp.* isolated from treated soil. *The Journal of Applied Bacteriology* **77**: 467-475.
- Patel, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clinical Infectious Diseases* **57**: 564-572.
- Paula, S. J., Duffey, P. S., Abbott, S. L., Kokka, R. P., Oshiro, L. S., Janda, J. M. y cols. (1988). Surface properties of autoagglutinating mesophilic aeromonads. *Infection and Immunity* **56**: 2658-2665.
- Perez-Silvestre, J., Abril Lopez de Medrano, V. y Ortega Gonzalez, E. (2010). Infection due to *Rhodococcus equi* in HIV infected patients: four cases. *Revista Clinica Española* **210**: 17-19.
- Pidoux, O., Argenson, J. N., Jacomo, V. y Drancourt, M. (2001). Molecular identification of a *Dietzia maris* hip prosthesis infection isolate. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 2634-2636.

- Pittet, J. F., Mackersie, R. C., Martin, T. R. y Matthay, M. A. (1997). Biological markers of acute lung injury: Prognostic and pathogenetic significance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **155**: 1187-1205.
- Pizarro-Cerda, J. y Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**: 715-727.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. y Gorvel, J. P. (2000). Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in non-phagocytic cells. *Microbes and Infection* **2**: 829-835.
- Portocarrero, B., Ballmer, P., Hess, T. y Karrer, U. (2012). Secondary hypogammaglobulinemia with recurrent opportunistic pulmonary infection. *Revue Therapeutique* **69**: 687-691.
- Prescott, J. F. (1987). Epidemiology of *Rhodococcus equi* infection in horses. *Veterinary Microbiology* **14**: 211-214.
- Prescott, J. F. (1991). *Rhodococcus equi*: An animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **4**: 20-34.
- Prescott, J. F. y Hoffman, A. M. (1993). *Rhodococcus equi*. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* **9**: 375-384.
- Prescott, J. F. y Nicholson, V. M. (1984). The effects of combinations of selected antibiotics on the growth of *Corynebacterium equi*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **7**: 61-64.
- Procopio, L., Alvarez, V. M., Jurelevicius, D. A., Hansen, L., Sorensen, S. J., Cardoso, J. S. y cols. (2012). Insight from the draft genome of *Dietzia cinnamea* P4 reveals mechanisms of survival in complex tropical soil habitats and biotechnology potential. *Antonie Van Leeuwenhoek* **101**: 289-302.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. Ed., (1994). General procedures in Microbiology. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, 21-66.
- Rahamat-Langendoen, J. C., van Meurs, M., Zijlstra, J. G. y Lo-Ten-Foe, J. R. (2009). Disseminated *Rhodococcus equi* infection in a kidney transplant patient

- without initial pulmonary involvement. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **65**: 427-430.
- Rainey, F. A., Klatte, S., Kroppenstedt, R. M. y Stackebrandt, E. (1995). *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 32-36.
- Rammer, P., Calum, H., Moser, C., Bjornsdottir, M. K., Smedegaard, H., Hoiby, N. y cols. (2013). *Dietzia papillomatosis* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 1977-1978.
- Reuss, S. M., Chaffin, M. K. y Cohen, N. D. (2009). Extra-pulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infection in foals: 150 cases (1987-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **235**: 855-863.
- Reyes, G., Navarro, J. L., Gamallo, C. y de las Cuevas, M. C. (2006). Type A aortic dissection associated with *Dietzia maris*. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* **5**: 666-668.
- Roggenkamp, A., Neuberger, H. R., Flugel, A., Schmoll, T. y Heesemann, J. (1995). Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Molecular Microbiology* **16**: 1207-1219.
- Rolston, K. V., Frisbee-Hume, S., LeBlanc, B., Streeter, H. y Ho, D. H. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of moxifloxacin compared to other quinolones against recent clinical bacterial isolates from hospitalized and community-based cancer patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **47**: 441-449.
- Russo, G., Lichtner, M., Carnevalini, M., Mascellino, M. T., Mengoni, F., Oliva, A. y cols. (2010). Primary retroperitoneal abscesses due to *Rhodococcus equi* in a patient with severe nephrotic syndrome: Successful antibiotic treatment with linezolid and tigecycline. *International Journal of Infectious Diseases* **14**: e533-555.
- Salas, C., Calvo, J. y Martinez-Martinez, L. (2008). Activity of tigecycline against Coryneform bacteria of clinical interest and *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 1503-1505.

- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
- Schulthess, B., Brodner, K., Bloemberg, G. V., Zbinden, R., Bottger, E. C. y Hombach, M. (2013). Identification of gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 1834-1840.
- Schwartz, D. C. y Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75.
- Scott, P. (1991). IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology* **147**: 3149-3155.
- Segura, I., Casadesus, J. y Ramos-Morales, F. (2004). Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *Journal of Microbiological Methods* **56**: 83-91.
- Seng, P., Abat, C., Rolain, J. M., Colson, P., Lagier, J. C., Gouriet, F. y cols. (2013). Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: Impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 2182-2194.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M. y cols. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* **49**: 543-551.
- Soddell, J.A. y Seviour, R.J. (1994). Incidence and morphological variability of *Nocardia pinensis* in Australian activated sludge plants. *Water Research* **28**: 2343-2351.
- Speert, D. (1992). Macrophages in bacterial infection. *The Macrophage*, pp 215-263. Oxford University Press. Oxford, UK.

- Stevens, M. P., Friebel, A., Taylor, L. A., Wood, M. W., Brown, P. J., Hardt, W. D. y cols. (2003). A *Burkholderia pseudomallei* type III secreted protein, BopE, facilitates bacterial invasion of epithelial cells and exhibits guanine nucleotide exchange factor activity. *Journal of Bacteriology* **185**: 4992-4996.
- Sukumaran, S. K., Quon, M. J. y Prasadarao, N. V. (2002). *Escherichia coli* K1 internalization via caveolae requires caveolin-1 and protein kinase calpha interaction in human brain microvascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 50716-50724.
- Sutcliffe, I. C. (1998). Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**: 49-58.
- Swanson, J., Kraus, S. J. y Gotschlich, E. C. (1971). Studies on gonococcus infection. I. pili and zones of adhesion: Their relation to gonococcal growth patterns. *The Journal of Experimental Medicine* **134**: 886-906.
- Sweeney, C. R., Sweeney, R. W. y Divers, T. J. (1987). *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy. *Veterinary Microbiology* **14**: 329-336.
- Sydor, T., von Bargen, K., Hsu, F. F., Huth, G., Holst, O., Wohlmann, J. y cols. (2013). Diversion of phagosome trafficking by pathogenic *Rhodococcus equi* depends on mycolic acid chain length. *Cellular Microbiology* **15**: 458-473.
- Szeredi, L., Molnar, T., Glavits, R., Takai, S., Makrai, L., Denes, B. y cols. (2006). Two cases of equine abortion caused by *Rhodococcus equi*. *Veterinary Pathology* **43**: 208-211.
- Takai, S., Fukunaga, N., Ochiai, S., Imai, Y., Sasaki, Y., Tsubaki, S. y cols. (1996). Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 1034-1037.
- Takai, S., Martens, R. J., Julian, A., Garcia Ribeiro, M., Rodrigues de Farias, M., Sasaki, Y. y cols. (2003). Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from cats and dogs. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 4468-4470.

- Takai, S., Sasaki, Y., Ikeda, T., Uchida, Y., Tsubaki, S. y Sekizaki, T. (1994). Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 457-460.
- Takai, S., Sekizaki, T., Ozawa, T., Sugawara, T., Watanabe, Y. y Tsubaki, S. (1991). Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity* **59**: 4056-4060.
- Takai, S., Takeda, K., Nakano, Y., Karasawa, T., Furugoori, J., Sasaki, Y. y cols. (1997). Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* in an infected foal. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 1904-1908.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y y cols. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2**: 151-53.
- Tanaka, Y., Yazawa, K., Dabbs, E. R., Nishikawa, K., Komaki, H., Mikami, Y., y cols. (1996). Different rifampicin inactivation mechanisms in *Nocardia* and related taxa. *Microbiology and Immunology* **40**: 1-4.
- Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B. y Mekalanos, J. J. (1987). Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 2833-2837.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. y cols. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2233-2239.
- Tkachuk-Saad, O., Lulis, P., Welsh, R. D. y Prescott, J. F. (1998). *Rhodococcus equi* infections in goats. *The Veterinary Record* **143**: 311-312.
- Topino, S., Galati, V., Grilli, E. y Petrosillo, N. (2010). *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected individuals: Case reports and review of the literature. *AIDS Patient Care and STDs* **24**: 211-222.
- Torres-Tortosa, M., Arrizabalaga, J., Villanueva, J. L., Galvez, J., Leyes, M., Valencia, M. E. y cols. (2003). Prognosis and clinical evaluation of infection

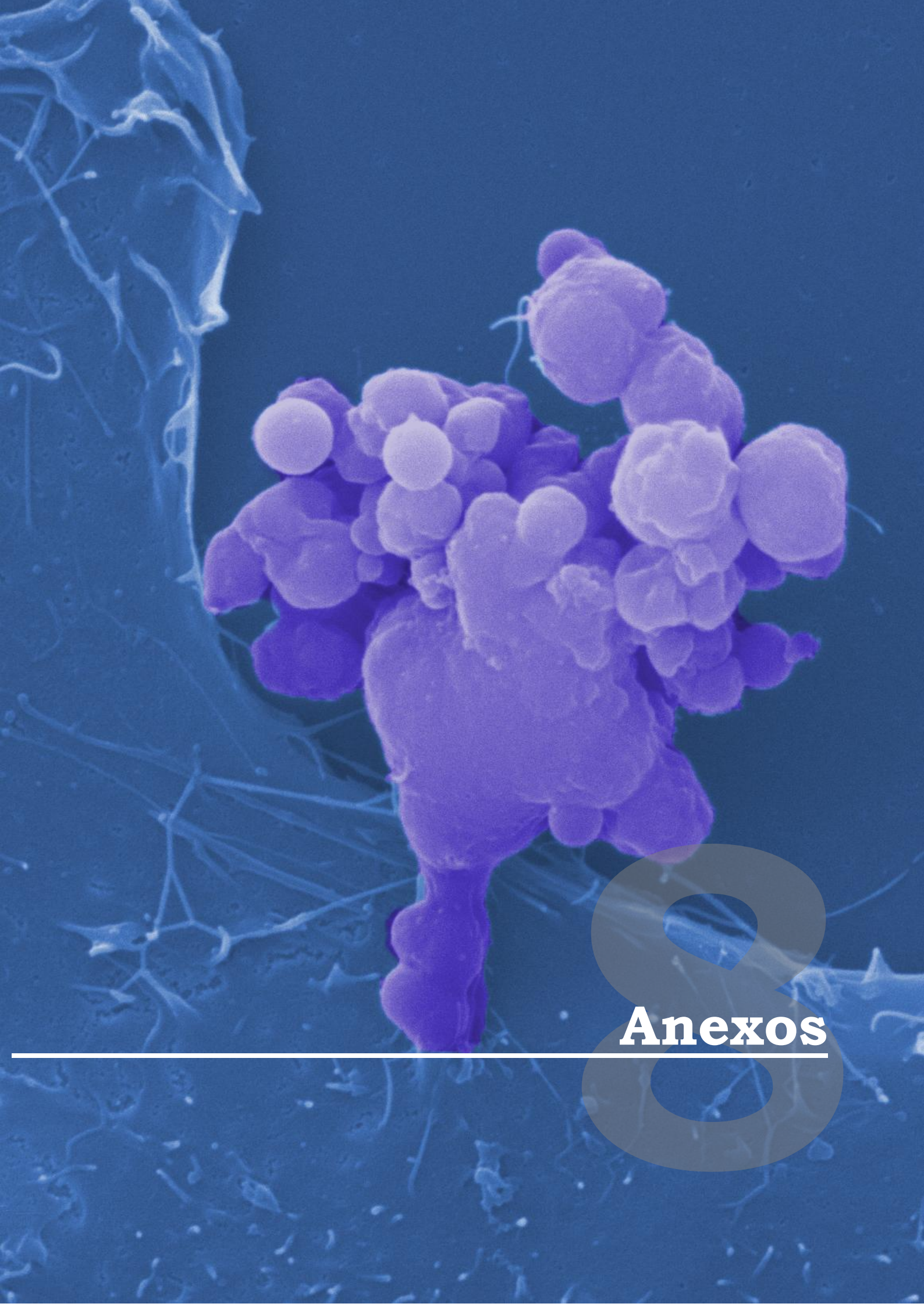
- caused by *Rhodococcus equi* in HIV-infected patients: A multicenter study of 67 cases. *Chest* **123**: 1970-1976.
- Toyooka, K., Takai, S. y Kirikae, T. (2005). *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. *Journal of Medical Microbiology* **54**: 1007-1015.
- Tsang, K. W., Lam, P. S., Yuen, K. Y., Ooi, C. C., Lam, W. y Ip, M. (1998). *Rhodococcus equi* lung abscess complicating Evan's syndrome treated with corticosteroid. *Respiration. International Review of Thoracic Diseases* **65**: 327-330.
- Tse, K. C., Chan, T. M., Wong, S. S., Chan, K. W., Lam, M. F., Chan, K. H. y cols. (2004). Granulomatous interstitial nephritis of the allograft kidney associated with rhodococcal pulmonary infection. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* **19**: 486-490.
- Ulivieri, S. y Oliveri, G. (2006). Cerebellar abscess due to *Rhodococcus equi* in an immunocompetent patient: Case report and literature review. *Journal of Neurosurgical Sciences* **50**: 127-129.
- van Faassen, H., KuoLee, R., Harris, G., Zhao, X., Conlan, J. W. y Chen, W. (2007). Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infection and Immunity* **75**: 5597-5608.
- Vazquez-Boland, J. A., Giguere, S., Hapeshi, A., MacArthur, I., Anastasi, E. y Valero-Rello, A. (2013). *Rhodococcus equi*: The many facets of a pathogenic actinomycete. *Veterinary Microbiology* **167**: 9-33.
- Vazquez-Boland J.A., Lewis D.A., Ocampo-Sosa A., Letek M., Mainar R., Gonzalez P., Navas J., Scotti M., Meijer W., Bentley S., Parkhill J., Leadon D., Buckley T. y Fogarty U. (2008). Epidemiology and evolution of *Rhodococcus equi*: new insights from molecular studies. In *Proceedings of the 4th Havemeyer Workshop on Rhodococcus equi*, p. 74.
- Vila, J., Juiz, P., Salas, C., Almela, M., de la Fuente, C. G., Zboromyrska, Y. y cols. (2012). Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted

- laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **50**: 1745-1747.
- von Bargen, K. y Haas, A. (2009). Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 870-891.
- von Bargen, K., Polidori, M., Becken, U., Huth, G., Prescott, J. F. y Haas, A. (2009). *Rhodococcus equi* virulence-associated protein A is required for diversion of phagosome biogenesis but not for cytotoxicity. *Infection and Immunity* **77**: 5676-5681.
- Watanabe, H., Kobayashi, S., Watanabe, K., Oishi, K., Sanchai, T., Kositsakulchai, W. y cols. (2000). Pulmonary infection caused by *Rhodococcus equi* in HIV-infected patients: Report of four patients from northern Thailand. *Journal of Infection and Chemotherapy* **6**: 229-232.
- Weinstock, D. M. y Brown, A. E. (2002). *Rhodococcus equi*: An emerging pathogen. *Clinical Infectious Diseases* **34**: 1379-1385.
- West, A. B., Kapatos, G., O'Farrell, C., Gonzalez-de-Chavez, F., Chiu, K., Farrer, M. J. y cols. (2004). N-myc regulates parkin expression. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 28896-28902.
- Wiersinga, W. J., van der Poll, T., White, N. J., Day, N. P. y Peacock, S. J. (2006). Melioidosis: Insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nature Reviews. Microbiology* **4**: 272-282.
- Yager, J. A., Prescott, C. A., Kramar, D. P., Hannah, H., Balson, G. A. y Croy, B. A. (1991). The effect of experimental infection with *Rhodococcus equi* on immunodeficient mice. *Veterinary Microbiology* **28**: 363-376.
- Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., Bloom, B. R. y cols. (1991). Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* **254**: 277-279.
- Yamashita, M. y Fenn, J. B. (1984). Negative ion production with the electrospray ion source. *The Journal of Physical Chemistry* **88**: 4671-4675.

- Yamshchikov, A. V. Schuetz, A., y Lyon, G. M. (2010). *Rhodococcus equi* infection. The Lancet Infectious Diseases **10**: 350-359.
- Yanagawa, R. y Honda, E. (1976). Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. Infection and Immunity **13**: 1293-1295.
- Yang, J., Hooper, W. C., Phillips, D. J. y Talkington, D. F. (2002). Regulation of pro-inflammatory cytokines in human lung epithelial cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*. Infection and Immunity **70**: 3649-3655.
- Yassin, A. F., Hupfer, H. y Schaal, K. P. (2006). *Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**: 641-645.
- Yazawa, K., Mikami, Y., Maeda, A., Akao, M., Morisaki, N. y Iwasaki, S. (1993). Inactivation of rifampin by *Nocardia brasiliensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **37**: 1313-1317.
- Yazawa, K., Mikami, Y., Maeda, A., Morisaki, N. y Iwasaki, S. (1994). Phosphorylative inactivation of rifampicin by *Nocardia otitidiscaviarum*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy **33**: 1127-1135.
- Yoon, J. H., Kang, S. S., Cho, Y. G., Lee, S. T., Kho, Y. H., Kim, C. J. y cols. (2000). *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**: 2173-2180.
- Yumoto, I., Nakamura, A., Iwata, H., Kojima, K., Kusumoto, K., Nodasaka, Y. y cols. (2002). *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**: 85-90.
- Zink, M. C., Yager, J. A. y Smart, N. L. (1986). *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958-1984: A review of 131 cases. The Canadian Veterinary Journal. **27**: 213-217.

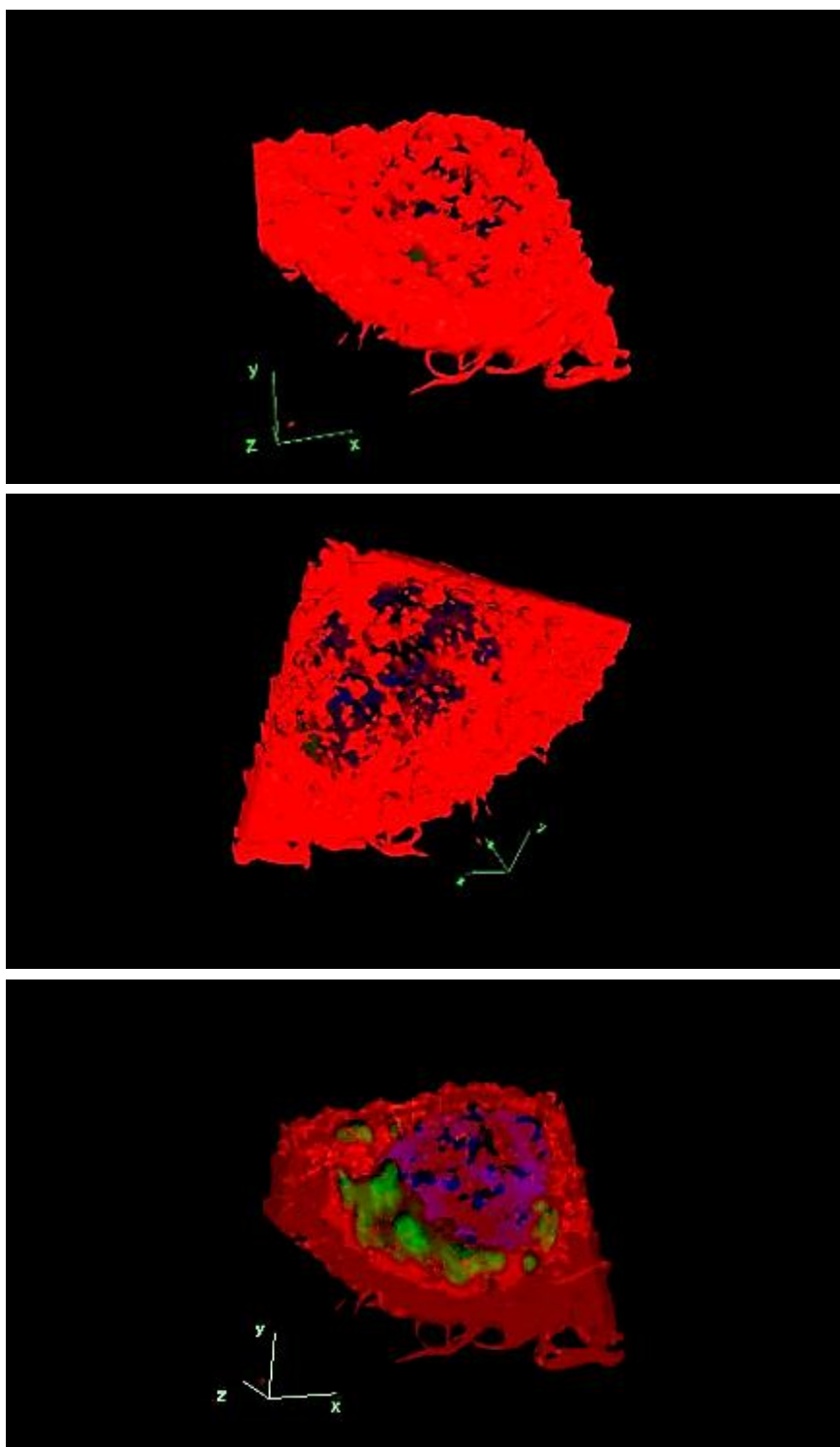
Zink, M. C., Yager, J. A., Prescott, J. F. y Fernando, M. A. (1987). Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* **14**: 295-305.

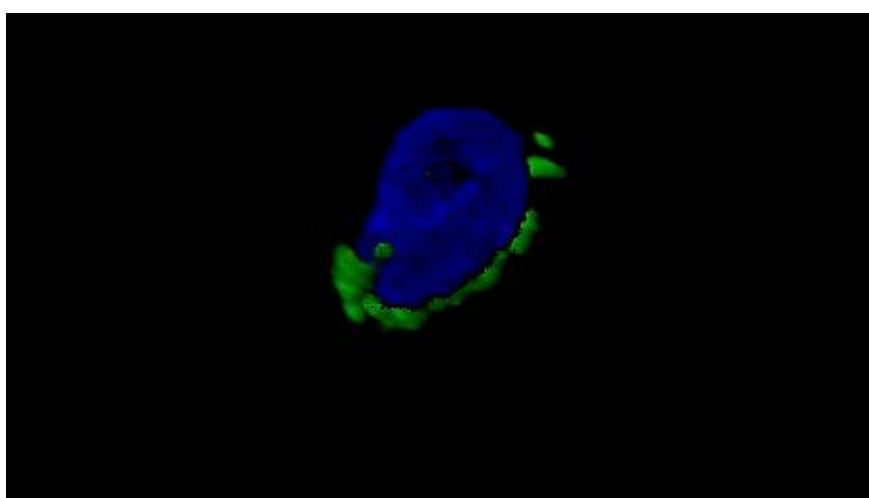
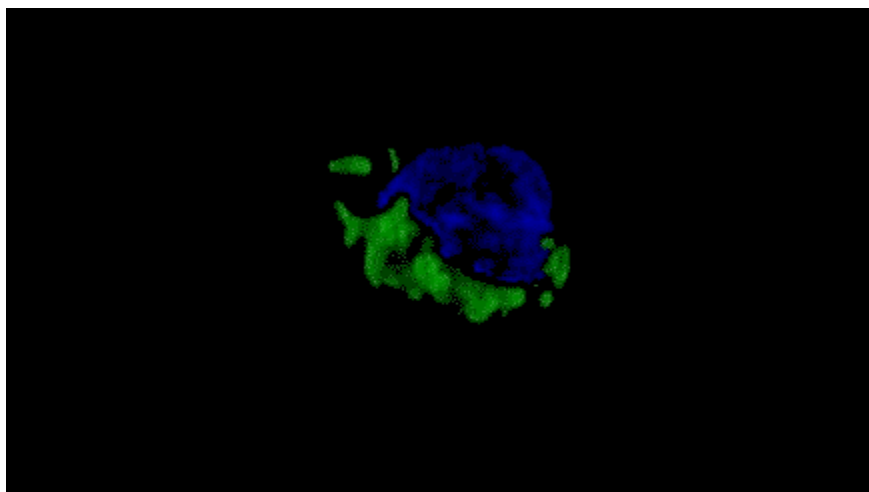
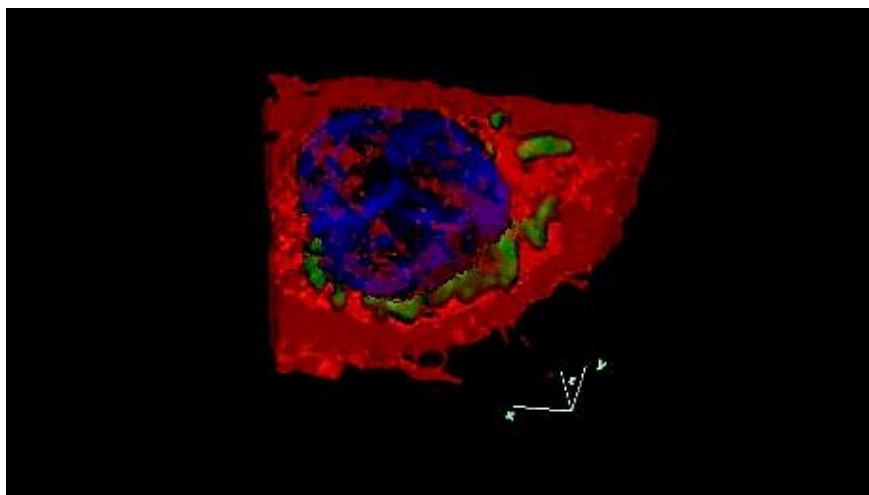
Zopf, W. (1891). Über ausscheidung von fettfarbstoffen (lipochromen) seitens gewisser spaltpilze. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **9**: 22-28.



Anexos

Anexo 8.1. Microscopía confocal. Bacterias intracelulares rodeadas del citoesqueleto de actina de las células pulmonares, se localizan de forma dispersa en el citoplasma y también en la región perinuclear (secuencia del video). Rojo: actina, verde: *R. equi* y azul: núcleo celular.





Anexo 8.2. CMI de 29 antimicrobianos frente a cepas de *R. equi* aisladas de pacientes humanos

ANTIMICROBIANOS	RE3	RE4	RE5	RE6	RE7	RE8	RE9	RE17	RE23	RE24	RE25	RE36	RE37	RE38	RE39	RE40	RE55	RE56	RE57	RE58
Amoxicilina-ác. clavulánico	4	4	4	4	8	4	4	8	8	16	8	8	≤0,25	8	≤0,25	8	8	8	4	8
Ampicilina	4	4	4	4	8	4	8	4	8	16	16	8	8	8	2	8	8	≤0,25	8	8
Cefalotina	32	8	32	32	64	32	128	16	128	256	128	64	64	64	2	128	128	8	128	64
Cefepima	256	>256	>256	256	>256	64	>256	>256	256	>256	256	>256	2	>256	4	>256	>256	>256	>256	256
Cefotaxima	2	1	2	4	4	4	32	2	8	8	32	8	8	16	1	8	8	4	8	8
Cefuroxima	4	2	4	2	4	4	32	4	8	8	32	16	8	8	1	8	8	4	8	4
Imipenem	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	≤0,06	8	0,25	0,125	0,25	0,125	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125
Meropenem	0,5	1	1	0,5	1	0,25	16	1	0,5	1	1	1	≤0,06	0,25	0,25	1	1	1	1	0,5
Penicilina G	2	1	2	2	4	2	8	2	8	16	8	4	4	4	0,25	8	8	4	8	8
Teicoplanina	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06
Vancomicina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amicacina	2	2	1	1	0,5	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	8	8	8	4	2
Gentamicina	2	1	1	0,5	1	2	1	2	≤0,25	0,5	0,5	1	0,5	≤0,25	0,5	1	0,5	0,5	0,5	≤0,25
Tobramicina	4	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	4	2	2	2	0,5
Clindamicina	8	16	16	4	8	4	4	64	4	8	32	32	4	4	1	4	4	4	16	4
Azitromicina	1	1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	0,5	0,5	≤0,25	0,5	≤0,25	1	0,5	1	1	1
Claritromicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Eritromicina	≤0,25	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Espiramicina	32	64	64	64	16	8	64	64	64	64	16	16	16	64	16	64	32	32	32	32
Doxiciclina	1	4	2	1	1	1	0,5	4	1	1	4	4	0,5	1	≤0,06	1	1	≤0,06	1	0,5
Tetraciclina	4	8	8	8	8	4	4	8	4	8	8	16	0,5	8	0,5	8	4	8	16	8
Tigeciclina	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	0,03	0,5	0,06	0,5	0,5	0,5	1	0,5
Ciprofloxacina	1	1	1	0,5	2	2	1	1	1	2	16	16	16	1	0,5	1	1	2	16	1
Levofloxacina	2	8	2	1	4	2	1	16	2	2	16	16	8	2	1	1	2	4	16	1
Moxifloxacina	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5
Trimetoprim/sulfametoxazol	2	0,5	2	2	2	4	4	4	4	2	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2
Cloranfenicol	8	16	16	4	8	4	8	16	16	16	16	16	4	4	4	4	8	4	8	4
Daptomicina	>64	64	>64	>64	>64	>64	>64	64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	64	>64	>64	>64	>64	>64
Rifampicina	≤0,015	≤0,015	≤0,015	0,06	≤0,015	0,125	0,06	≤0,015	≤0,015	≤0,015	0,06	0,06	≤0,015	≤0,015	≤0,015	1	0,06	≤0,015	0,125	≤0,015

(Continuación)

Anexo 8.2. CMI de 29 antimicrobianos frente a cepas de *R. equi* aisladas de pacientes humanos

ANTIMICROBIANOS	RE59	RE60	RE61	RE62	RE63	RE64	RE65	RE66	RE68	RE69	RE70	RE71	RE73	RE74	RE75	RE76	RE77	RE78	RE79	RE80
Amoxicilina-ác. clavulánico	8	16	8	8	8	8	8	1	8	8	8	8	4	4	4	4	4	8	4	≤0,25
Ampicilina	16	8	16	8	16	16	16	1	8	16	16	16	16	16	8	16	16	32	32	2
Cefalotina	256	128	256	128	256	256	>256	2	128	256	256	>256	256	256	128	>256	256	>256	>256	4
Cefepima	>256	>256	>256	>256	16	>256	>256	4	>256	>256	>256	256	256	128	64	>256	>256	>256	>256	4
Cefotaxima	128	8	16	8	8	256	>256	1	8	8	256	>256	256	256	128	256	256	>256	>256	2
Cefuroxima	8	4	16	8	4	4	8	1	8	8	128	>256	4	8	8	64	8	>256	64	1
Imipenem	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	0,25	≤0,06	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	8	0,25	≤0,06
Meropenem	1	1	1	1	0,5	1	1	0,25	1	1	2	2	1	0,5	0,5	1	0,5	16	1	0,125
Penicilina G	16	4	32	16	8	16	16	0,25	8	16	8	16	16	16	8	16	16	32	32	0,5
Teicoplanina	≤0,06	≤0,06	0,125	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,125
Vancomicina	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amicacina	8	2	8	2	4	2	4	2	4	2	4	4	4	4	8	4	4	8	4	4
Gentamicina	0,5	1	1	2	1	0,5	4	0,5	1	1	1	1	0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,5	1	2	1
Tobramicina	2	2	2	32	4	1	4	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	4	2	2
Clindamicina	4	32	32	64	8	4	32	2	4	8	4	4	4	2	4	8	32	16	32	16
Azitromicina	1	1	1	1	1	1	1	≤0,25	1	1	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	≤0,25
Claritromicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Eritromicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Espiramicina	2	64	64	64	64	32	64	2	64	64	64	64	16	32	32	16	32	32	64	8
Doxiciclina	1	2	8	4	2	2	2	0,25	2	1	2	1	1	0,5	1	4	4	1	2	0,25
Tetraciclina	16	16	16	16	8	8	16	1	8	4	8	8	8	4	4	8	16	8	8	4
Tigeciclina	0,5	2	2	2	0,5	0,5	1	0,06	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	1	0,5	1	0,125
Ciprofloxacina	1	2	16	4	1	2	8	1	2	1	2	1	1	1	1	16	16	2	16	4
Levofloxacina	2	2	8	2	1	2	8	1	2	2	1	1	2	1	2	16	16	4	16	4
Moxifloxacina	0,5	1	0,5	0,5	0,25	0,25	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5
Trimetoprim/sulfametoxazol	2	2	1	1	1	1	2	1	4	2	2	2	2	2	4	4	2	4	2	1
Cloranfenicol	8	8	8	16	8	8	8	2	8	16	4	4	4	4	4	8	8	8	8	8
Daptomicina	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	64
Rifampicina	0,06	0,06	16	16	1	16	16	≤0,015	0,125	≤0,015	≤0,015	≤0,015	0,125	0,06	0,125	0,06	0,125	16	0,125	≤0,015

(Continuación)

Anexo 8.2. CMIs de 29 antimicrobianos frente a cepas de *R. equi* aisladas de pacientes humanos

ANTIMICROBIANOS	RE81	RE82	RE152	RE153	RE154	RE156	RE157	RE158	RE163
Amoxicilina-ác. clavulánico	8	4	4	0,5	4	8	8	8	4
Ampicilina	16	32	16	2	16	32	32	32	16
Cefalotina	>256	>256	>256	32	256	>256	>256	>256	256
Cefepima	>256	>256	>256	8	>256	>256	>256	>256	16
Cefotaxima	256	>256	>256	8	256	>256	>256	>256	256
Cefuroxima	256	32	256	2	8	16	128	256	32
Imipenem	0,25	0,5	0,125	≤0,06	≤0,06	0,25	0,25	0,125	0,125
Meropenem	1	0,5	0,5	0,125	0,25	1	1	1	0,5
Penicilina G	32	32	16	4	16	32	32	32	16
Teicoplanina	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06
Vancomicina	0,25	0,25	0,25	0,125	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Amicacina	4	16	2	2	4	8	8	16	8
Gentamicina	2	2	1	≤0,25	0,5	0,5	1	1	0,5
Tobramicina	2	2	1	1	0,5	2	2	1	1
Clindamicina	4	4	2	1	>64	32	>64	4	4
Azitromicina	1	≤0,25	0,5	≤0,25	128	4	2	0,5	1
Claritromicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25
Eritromicina	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	4	4	2	≤0,25	≤0,25
Espiramicina	128	32	8	4	256	256	256	64	32
Doxiciclina	2	2	1	0,5	1	1	1	2	1
Tetraciclina	8	4	8	2	8	8	4	8	8
Tigeciclina	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ciprofloxacina	16	4	2	4	1	4	2	1	0,5
Levofloxacina	16	8	4	4	2	2	2	1	1
Moxifloxacina	1	2	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
Trimetoprim/sulfametoxazol	2	0,5	4	0,5	2	1	2	2	4
Cloranfenicol	8	8	4	4	4	8	4	4	4
Daptomicina	>64	64	64	>64	64	>64	>64	>64	>64
Rifampicina	≤0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015	2	0,125	0,03

(Continuación)

Anexo 8.3. Interpretación de las pruebas de sensibilidad *in vitro* basada en los criterios del CLSI para *Staphylococcus* spp.

ANTIMICROBIANOS	RE59	RE60	RE61	RE62	RE63	RE64	RE65	RE66	RE68	RE69	RE70	RE71	RE73	RE74	RE75	RE76	RE77	RE78	RE79	RE80	
Amoxicilina-ác. clavulánico	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotina	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	
Cefepima	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	
Cefotaxima	R	S	I	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	
Cefuroxima	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
Penicilina G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Tobramicina	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Clindamicina	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	
Azitromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Claritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Espiramicina																					
Doxiciclina	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Tetraciclina	R	R	R	R	I	I	R	S	I	S	I	I	I	S	S	I	R	I	I	S	
Tigeciclina	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	
Ciprofloxacina	S	I	R	R	S	I	R	S	I	S	I	S	S	S	S	R	R	I	R	R	
Levofloxacina	I	I	R	I	S	I	R	S	I	I	S	S	I	S	I	R	R	R	R	R	
Moxifloxacina	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	
Trimetoprim/sulfametoxazol	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	
Cloranfenicol	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Daptomicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Rifampicina	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	

(Continuación)

Anexo 8.3. Interpretación de las pruebas de sensibilidad in *vitro* basada en los criterios del CLSI para *Staphylococcus* spp.

ANTIMICROBIANOS	RE81	RE82	RE152	RE153	RE154	RE156	RE157	RE158	RE163	Σ S	Σ I	Σ R	Σ	%S	%I	%R
Amoxicilina-ác. clavulánico	R	S	S	S	S	R	R	R	S	22	0	27	49	44,9	0,0	55,1
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	0	48	49	2,0	0,0	98,0
Cefalotina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	5	1	43	49	10,2	2,0	87,8
Cefepima	R	R	R	S	R	R	R	R	I	5	2	42	49	10,2	4,1	85,7
Cefotaxima	R	R	R	S	R	R	R	R	R	25	4	20	49	51,0	8,2	40,8
Cefuroxíma	R	R	R	S	S	I	R	R	R	33	3	13	49	67,3	6,1	26,5
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	47	2	0	49	95,9	4,1	0,0
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	47	0	2	49	95,9	0,0	4,1
Penicilina G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	49	49	0,0	0,0	100,0
Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	49	0	0	49	100,0	0,0	0,0
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	49	0	0	49	100,0	0,0	0,0
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	49	0	0	49	100,0	0,0	0,0
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	49	0	0	49	100,0	0,0	0,0
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	48	0	1	49	98,0	0,0	2,0
Clindamicina	R	R	I	I	R	R	R	R	R	0	5	44	49	0,0	10,2	89,8
Azitromicina	S	S	S	S	R	I	S	S	S	47	1	1	49	95,9	2,0	2,0
Claritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	49	0	0	49	100,0	0,0	0,0
Eritromicina	S	S	S	S	I	I	I	S	S	46	3	0	49	93,9	6,1	0,0
Espiramicina																
Doxiciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	48	1	0	49	98,0	2,0	0,0
Tetraciclina	I	S	I	S	I	I	S	I	I	15	26	8	49	30,6	53,1	16,3
Tigeciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	38	0	11	49	77,6	0,0	22,4
Ciprofloxacina	R	R	I	R	S	R	I	S	S	23	11	15	49	46,9	22,4	30,6
Levofloxacina	R	R	R	R	I	I	I	S	S	12	18	19	49	24,5	36,7	38,8
Moxifloxacina	I	R	S	I	S	S	S	S	S	38	10	1	49	77,6	20,4	2,0
Trimetoprim/sulfametoxazol	S	S	R	S	S	S	S	S	R	38	0	11	49	77,6	0,0	22,4
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	40	9	0	49	81,6	18,4	0,0
Daptomicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	49	49	0,0	0,0	100,0
Rifampicina	S	S	S	S	S	S	I	S	S	43	1	5	49	87,8	2,0	10,2



Publicaciones

Identification of Atypical Rhodococcus-Like Clinical Isolates as Dietzia spp. by 16S rRNA Gene Sequencing

Lilian Pilares, Jesús Agüero, José A. Vázquez-Boland, Luis Martínez-Martínez, and Jesús Navas **En:**

Journal of Clinical Microbiology, May 2010, p. 1904–1907 Vol. 48, No. 5

[doi:10.1128/JCM.01730-09](https://doi.org/10.1128/JCM.01730-09)

Rhodococcus equi human clinical isolates enter and survive within human alveolar epithelial cells

J. Ramos-Vivas , L. Pilares-Ortega, S. Remuzgo-Martínez, D. Padilla, J.L. Gutiérrez-Díaz, J.

Navas-Méndez

En: Microbes and Infection, Volume 13, Issue 5, May 2011, Pages 438–446

[doi: 10.1016/j.micinf.2011.01.003](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.01.003)

Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during Rhodococcus equi infection

Sara Remuzgo-Martínez, Lilian Pilares-Ortega, Lorena Álvarez-Rodríguez, Maitane Aranzamendi-Zaldunbide, Daniel Padilla, Jose Manuel Icardo and Jose Ramos-Vivas

En: Journal of Medical Microbiology (2013), 62, 1144–1152

[doi: 10.1099/jmm.0.056234-01144_056234](https://doi.org/10.1099/jmm.0.056234-01144_056234)

Original article

Rhodococcus equi human clinical isolates enter and survive within human alveolar epithelial cells

J. Ramos-Vivas^{a,*}, L. Pílares-Ortega^b, S. Remuzgo-Martínez^a, D. Padilla^c,
J.L. Gutiérrez-Díaz^b, J. Navas-Méndez^b

^a Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla and Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), 39008 Santander, Cantabria, Spain

^b Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Spain

^c Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, Las Palmas, Spain

Received 19 July 2010; accepted 13 January 2011

Available online 22 January 2011

Abstract

Rhodococcus equi is an emerging opportunistic human pathogen associated with immunosuppressed people, especially those infected with the human immunodeficiency virus (HIV). This pathogen resides primarily within lung macrophages of infected patients, which may explain in part its ability to escape normal pulmonary defense mechanisms. Despite numerous studies as a pulmonary pathogen in foals, where a plasmid seems to play an important role in virulence, information on the pathogenesis of this pathogen in humans is still scarce. In this study, fluorescence microscopy and vancomycin protection assays were used to investigate the ability of *R. equi* human isolates to adhere to and to invade the human alveolar epithelial cell line A549. Our findings indicate that some *R. equi* clinical strains are capable of adhering, entering and surviving within the alveolar cell line, which may contribute to the pathogen persistence in lung tissues.

© 2011 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Rhodococcus equi*; Intracellular pathogen; Human alveolar cells

1. Introduction

The soil-dwelling actinomycete *Rhodococcus equi* is a multihost pathogen that causes pyogranulomatous infections in humans and in several animal species [1]. In immunocompromised persons, *R. equi* causes tuberculosis-like pneumonia associated with a high case-fatality rate, principally in HIV patients. Endocarditis, brain abscesses and other infections have also been reported [2]. *R. equi* infections are diagnosed by culturing and subsequent phenotyping analysis by morphological and biochemical tests, chemotaxonomic properties [3,4], and molecular methods [5,6]. Confirmation by 16S rDNA sequencing may be necessary to avoid misidentification with *Dietzia* spp [7].

R. equi is primarily a pathogen of foals. The virulence of this pathogen in foals is linked to presence of large plasmids. In horse isolates, these plasmids are 85–90 kb in size and encode virulence-associated protein A (VapA), a 15–17 kDa surface lipoprotein antigen important for intramacrophage survival, cytotoxicity, and horse pathogenicity via neutralization of phagosomes and lysosomes or their disruption [1]. Plasmid loss results in attenuation of virulence in both foals and mice [8,9]. In non-horse hosts, a plasmid variant encoding VapB, a VapA-related surface antigen of larger size has been identified [10,11]. Lack of detection of VapA/B proteins (or vapA/B DNA sequences) is relatively common in non-horse isolates and is assumed to be due to the absence of virulence plasmid. A molecular method (TRAVAP) based on traA, vapA and vapB virulence plasmid markers have been recently developed for *R. equi* typing [5]. A TRAVAP survey of 69 *R. equi* human isolates revealed that all plasmid categories

* Corresponding author. Tel.: +34 942 202520; fax: +34 942 203847.

E-mail address: ifimav.jvivas@fmdv.org (J. Ramos-Vivas).

were common, reflecting the opportunistic nature of *R. equi* infection in this host [5].

Both humoral and cellular immune responses can contribute to host defense against *R. equi* [12,13] with activated macrophages being the most important cellular type involved. The microorganism can inhibit macrophage phagosome–lysosome fusion, leading to non-specific lysosome degranulation [14,15]. Most *in vitro* studies have used phagocytes to study the non-specific immunity against this pathogen. However, little is known about the survival of *R. equi* in non-phagocytic human cells. Epithelial cells play an important role as the interface between the host mucosal surfaces and the surrounding environment and are the initial site of colonization for bacterial pathogens. *R. equi* could entry in either epithelial or other type of non-phagocytic cells avoiding the host hostile environment and disseminating more easily like other intracellular pathogens do [16,17].

In this study we have investigated the interaction of *R. equi* human isolates with the human lung epithelial cell line A549. Our results show for the first time that *R. equi* invades and survives in human pulmonary cells. Invasion rates and surviving of *R. equi* did not depend on the presence of virulence plasmids.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Sixteen *R. equi* clinical strains isolated from human patients in several Spanish hospitals were used (Table 1). As control strains, we used *R. equi* ATCC 33701 and its plasmid-cured derivative strain ATCC 33701⁻. Bacteria were cultured in brain heart infusion broth (BHIB) or blood agar (BA) at 37 °C, and frozen at –80 °C with 15% glycerol. All strains were confirmed as *R. equi* by 16S rRNA gene sequencing [7].

Table 1
Bacterial strains used in this study and their TRA/VAP characteristics.

Strain	<i>traA</i> ^a	<i>vapA</i>	<i>vapB</i>	Colony type ^b
RE6	+	+	–	B
RE7	+	–	+	B
RE9	+	+	–	B
RE23	+	–	–	A
RE37	+	–	–	C
RE38	+	+	–	B
RE39	+	+	–	A
RE40	+	+	–	B
RE55	–	–	–	C
RE56	–	–	–	B
RE61	+	–	+	B
RE62	+	–	+	A
RE70	+	+	–	B
RE156	+	–	+	A
RE158	+	+	–	B
RE163	+	+	–	B
ATCC 33701	+	+	–	B
ATCC 33701 (–)	–	–	–	B

^a All *traA* positive strains also carry a virulence plasmid.

^b Classification ABC: type A was a highly mucoid, coalescing colony; type B was less mucoid and non-coalescing, and type C was a non-mucoid, discrete and dry colony.

2.2. Molecular typing

Molecular typing of *R. equi* strains was performed using the TRAVAP system as described previously [5].

2.3. Morphological analysis of colonies

The morphologic description of *R. equi* isolates was based on that of Mutimer and Woolcock [18].

2.4. Immunofluorescence assays

We used the *R. equi* strain RE70 as bacterial antigen. RE70 was grown and inoculated into New Zealand rabbits for the production of anti-*Rhodococcus* polyclonal sera as described previously [19]. Antiserum was collected 8 weeks after the first boost, processed and stored using standard protocols [20]. Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 594 and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG were purchased from Invitrogen. For bacterial microscopic examinations, bacteria were stained as described previously [21]. Briefly, bacteria were grown on BHIB cultures at 37 °C. Ten microliters of each liquid bacterial culture was pipetted onto a glass slide, dried and fixed with 3.2% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 for 15 min at room temperature. Slides were washed three times in PBS. Samples were incubated for 20 min with the polyclonal antiserum (1:1000 in 0.1% Bovine Serum Albumin in PBS, BSA-PBS), and another 20 min with Alexa goat anti-rabbit antibodies (1:1000 in BSA-PBS).

2.5. Adherence and invasion experiments

Adherence and invasion experiments were based on a modification of the quantitative protection assay described by Isberg and Falkow [22]. The human lung epithelial A549 cell line was grown in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were plated at a density of 1.8×10^5 cells per well into 24-well tissue culture plates (Nunc). Strains of *R. equi* were cultured in 10 ml BHIB at 37 °C with shaking at 175 rpm. For infections, bacterial suspensions were prepared to a final concentration of $\sim 4 \times 10^9$ CFU ml⁻¹. Ten microliters of bacterial cultures were added to each well containing A549 cells and the mixtures centrifuged for 4 min at 200× g previous to the incubation to promote adherence of bacteria to cells. Our standard conditions (10 µl) accounted for a multiplicity of infection (MOI) of $\sim 200:1$ (bacterium/eukaryotic cell ratio). Infected cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂. The exact number of colony-forming units (CFUs) inoculated per well was determined by serial dilution in PBS and plating onto BA. External non-adhered bacteria were removed by washing the cells four times with PBS, after which the cells were incubated for 2 h with RPMI-1640 containing vancomycin (50 µg ml⁻¹), and then disrupted by addition of 100 µl of Triton X-100 (1% in PBS). Serial dilutions of the disrupted mixture were plated onto BA and incubated for 48 h at 37 °C. Control wells without A549 cells were also included to establish that the antibiotic treatment

was effectively killing the extracellular bacteria. For quantification of extracellular bacteria (adherence assay), we subtracted the number of intracellular bacteria (determined by colony-forming units per ml) obtained after killing extracellular bacteria with vancomycin (invasion assay) from the total bacteria recovered in the absence of vancomycin.

A time course (30, 60, 90, and 120 min) of *R. equi* invasion of A549 cells was performed to determine the effect of time incubation on number of bacteria recovered from cells. As the invasion process was time dependent, we used 120 min invasion time for the following experiments to allow maximal invasion. To compare invasion of the *R. equi* strains on this cell line, 1.8×10^5 human epithelial cells per well were used. To determine the effect of bacterial concentration on the efficiency of invasion (the percentage of the initial inoculum internalized), the inoculum of bacteria was varied to infect with 5, 10, 15 and 20 μl of the bacterial culture using a 120-min invasion period as described above. For long-time intracellular survival experiments, after extracellular killing of bacteria by vancomycin (2 h, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$), cells were washed and culture medium was replaced by media containing $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of vancomycin, incubated for a further 22 h, and lysed as described before. After this time, number of viable bacteria was counted. The intracellular proliferation rate (I_{pro}) was calculated as the ratio of the number of viable intracellular bacteria present at 24 h to those present at 2 h post-infection [23,24]. In all experiments, invasion efficiency was calculated as the average of the total number of CFUs per total initial inoculum and expressed as a percentage. The integrity of the *R. equi*-infected monolayers was examined by light microscopy throughout the 24-h period and the cell viability was assessed using trypan blue exclusion. In some experiments, non-invasive *Escherichia coli* DH10B was used as negative control using gentamicin protection assays ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). This non-invasive control was tested over a similar range of MOI and the maximal invasion efficiency was less than 0.01% of the initial inoculums after 2 h. At 30 or 60 min post-infection, no intracellular *E. coli* was recovered. In addition, we were unable to obtain intracellular *E. coli* from experiments carried out with cytochalasin-D or at 4 °C (not shown). All assays were performed in triplicate wells, and experiments repeated three times.

2.6. Immunofluorescence and confocal microscopy of bacterial infections

Differential double immunofluorescent labeling of *R. equi* allowed us to differentiate extracellular from intracellular bacteria. A549 cells were seeded on 12-mm diameter coverslips in 24-well plates. Ten microliters of bacterial cultures were used for infection. Following the incubation period (120 min or 24 h), cells were washed four times and fixed with cold paraformaldehyde (3.2% in PBS) for 20 min at room temperature as described previously [21]. Primary and secondary antibodies were diluted 1:1000 in bovine serum albumin (BSA; Sigma) (1% in PBS). Coverslips were then washed four times with PBS and incubated for 20 min with the polyclonal rabbit anti-*R. equi* antiserum. Coverslips were washed again and incubated for

20 min with an anti-rabbit antibody Alexa-488. Following this initial staining, cells were permeabilized with Triton X-100 (0.1% in PBS) for 4 min at room temperature and washed five times with PBS. To stain intracellular bacteria, coverslips were incubated with primary and secondary antibodies as before, but using an anti-rabbit antibody Alexa-594. In experiments with vancomycin, fluorescent-labeled phalloidin (Alexa Fluor 488 phalloidin, Invitrogen), which binds polymerized f-actin, was used to identify actin filaments and fibers. After washing, coverslips were mounted on glass slides with ProLong Gold containing DAPI (Invitrogen).

2.7. Infection with killed bacteria

To investigate if invasiveness was dependent on *R. equi* viability, 400 μl of the bacterial culture were heated at 80 °C for 25 min. Three plates of BA were inoculated to confirm killing of bacteria. After inactivation, 10 μl of the culture were used for infections. Bacteria grown for 48 h on a BA plates were treated with UV light for 2 h. After treatment, the UV-killed cells were washed twice with PBS and adjusted to an optical density of 1.0 at 600 nm. The suspension was streaked on BA to confirm killing of bacteria. After inactivation, 10 μl of the UV-killed cells were used for infections. Formalin-killed *R. equi* were also prepared. The bacteria were collected by centrifugation at 2500 g for 30 min, washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and resuspended in PBS, then formaldehyde was added to the suspension to a final concentration of 0.35% (v/v). After incubation at 4 °C for 16 h with shaking, the formalin-killed cells were washed twice with PBS and adjusted to an optical density of 1.0 at 600 nm. The suspension was streaked on BA to confirm killing of bacteria. After inactivation, 10 μl of the formalin-killed cells were used for infections.

Cultures infected with heat-killed and formalin-killed bacteria were processed for immunofluorescence as described above. All preparations were examined by epifluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert 200 Microscope. Digital images were acquired using a Zeiss AxioCam HRc digital camera and merged using Photoshop CS3 (Adobe) software.

2.8. Effect of cytochalasin D and cellular metabolism on *R. equi* invasion

To confirm cellular invasion, the actin-disrupting agent cytochalasin-D ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) was used before vancomycin treatment to prevent uptake of the bacteria. The target human epithelial cells were preincubated with the blocking agent for 30 min prior to infection and maintained through the experiment. The effect of the cell metabolism on invasion was examined by performing the *R. equi* infections at 4 °C as described by [25].

2.9. Confocal microscopy

Samples for confocal microscopy were prepared as for standard immunofluorescence studies. Series of optical sections

were obtained with a Leica TCS-SP confocal scanning laser microscope. 3D reconstructions of confocal sections (distanced 0.2 μm in the vertical axis) were assembled using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.10. Statistical analysis

The data were statistically analyzed by using one-way ANOVA and Tukey's test. Statistical significance was set at two-tailed $P < 0.001$ or $P < 0.01$.

3. Results

3.1. TRAVAP analysis of the *R. equi* isolates

The presence of *traA* and *vapA/vapB* markers in the 16 *R. equi* isolates was investigated. The results are shown in Table 1. The four TRAVAP categories are present in our collection: $\text{traA}^+/\text{vapA}^+\text{B}^-$ (8 isolates), $\text{traA}^+/\text{vapA}^-\text{B}^+$ (4 isolates), $\text{traA}^+/\text{vapAB}^-$ (2 isolates) and $\text{traA}^-/\text{vapAB}^-$ (2 isolates).

3.2. Colony morphology

The colony morphology of the 16 *R. equi* isolates is shown in Table 1. Four strains were highly mucoid, and present coalescing colonies (phenotype A), and ten strains were less mucoid (phenotype B). One strain (RE56) did not carry plasmids as the strain RE55, but the morphology was not dry. The control strain ATCC 33701 maintained its morphology after loss the virulence plasmid.

3.3. Interaction of *R. equi* with A549 cells

Interaction of *R. equi* with A549 cells was investigated using vancomycin protection assays, and confocal and immunofluorescence microscopy. Immunofluorescent and light microscopy observations showed that all *R. equi* strains displayed adherence to A549 cells and that the bacteria were able to penetrate A549 cells (Fig. 1). Levels of adherence varied depending on the *R. equi* strain used and bacterial growth phase. Bacterial cells harvested at 48 h were more adherent than those harvested at 24 h (Fig. 2a). Confocal laser scanning fluorescence microscopy indicates that the bacteria were immersed in the cell actin cytoskeleton of pulmonary cells and/or dispersed in the cytoplasm and the perinuclear region (Video). In vancomycin protection assays, maximal invasion efficiency was observed for the strain RE55 (Fig. 2b). In other sets of experiments, the internalization of the strains was evaluated with different bacterial concentrations using a fixed number of A549 cells per well. For this assay, bacteria for infections were harvested at 48 h of growth, and the number of intracellular bacteria increased with the number of bacteria added (Fig. 2c). Experiments with A549 cells treated with cytochalasin-D and subsequently infected with the *R. equi* strains demonstrated that a full functional host cell cytoskeleton is not required for bacterial invasion as in non-treated cells (Fig. 2d). Internalization of *R. equi* strains was also not totally dependent on active cell

metabolism as evidenced by experiments carried out at 4 °C (Fig. 2d). We were unable to obtain viable intracellular *E. coli* from experiments carried out at 4 °C or with cytochalasin-D (data not shown). We confirmed that the inhibitor did not affect cell viability using the trypan blue exclusion and bacterial viability by plating experiments (data not shown). In other sets of experiments, we use heat-killed, UV-killed and formalin-killed *R. equi* for invasion experiments. These killed bacteria were not seen inside cells (not shown), demonstrating that it is likely that invasion is bacterially-mediated. In fact, most of the killed bacteria were eliminated after washing (not shown). To determine whether internalized strains replicated and/or survived in epithelial pulmonary cells, infections were carried out for 24 h. After incubation, number of viable bacteria was counted and the intracellular proliferation rate (I_{pro}) was calculated as the ratio of the number of viable intracellular bacteria present at 24 h to those present at 2 h post-infection. Most invasive strains were able to proliferate after the initial intracellular survival period, and survive for at least 24 h (Fig. 2e). Bacterial cells harvested at 24 h were more proliferative than those harvested at 48 h. In comparison to mock-infected cells (BHIB alone), no significant difference in host cell viability was noted when cells were infected with *R. equi* plasmid carried strains ($<2\%$, $P < 0.001$) using bacteria from 24 or 48 h cultures. But, when the infective strain was RE55 (cultured for 24 or 48 h), the cytotoxicity was 4 and 6% higher than in mock cells ($P < 0.001$), as shown by trypan blue exclusion assays. The other plasmid less strains (RE56 and ATCC 33701⁻) did not produce any significant cytotoxicity with respect to the controls. After 24 h of infection, strain RE55 were seen inside vacuoles, or in active multiplication inside cells, and in some cases epithelial cell destruction is seen, probably indicating that bacteria are killing these cells by overgrowth (Fig. 3). Strains where cells did aggregate in clusters were also observed, although with low frequency, and strains RE7, RE23, RE37, RE39, RE56, and RE70 did not show high intracellular proliferation in clusters by immunofluorescence, despite an increase in CFUs in vancomycin protection assays from 2 to 24 h ($I_{\text{pro}} > 1$).

4. Discussion

While the interaction of *R. equi* with macrophages has been comprehensively studied, little is known about its interactions with non-phagocytic cells. Survival and replication of *R. equi* in equine alveolar macrophages require expression of VapA, a plasmid-encoded lipoprotein present in all *R. equi* virulent isolates from foals. *R. equi* isolates from non-horse hosts express VapA, its allele VapB or not express Virulence Associated Proteins, due to the absence of virulence plasmids. A method that facilitates the rapid discrimination between plasmid-positive and plasmid-negative *R. equi* strains and the presence of VapA or VapB genes by PCR has been recently reported [5]. We have used this method to type 16 *R. equi* human isolates and we have found the four categories previously described in human isolates: $\text{traA}^+/\text{vapA}^+\text{B}^-$, $\text{traA}^+/\text{vapA}^-\text{B}^+$, $\text{traA}^+/\text{vapAB}^-$ and $\text{traA}^-/\text{vapAB}^-$. This confirms

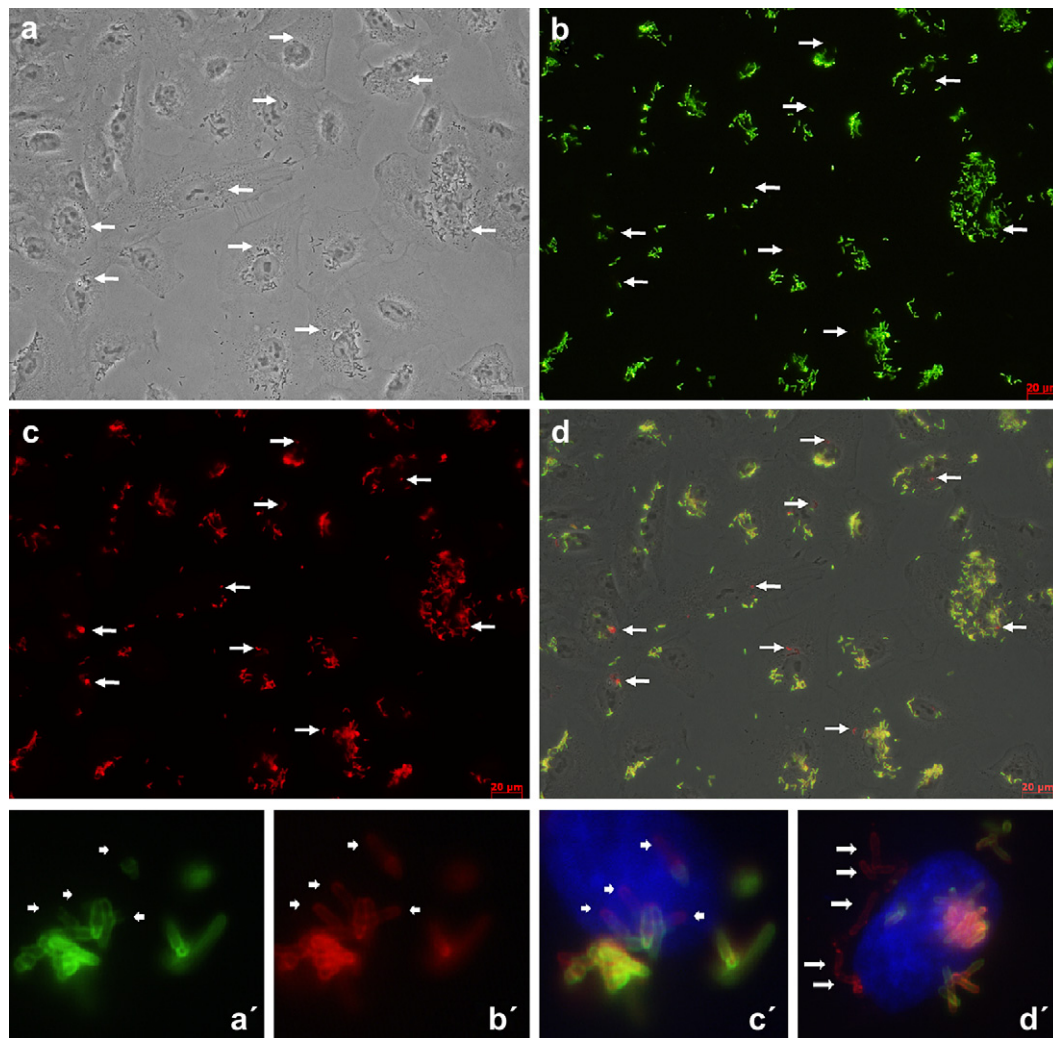


Fig. 1. Adherence and internalization of *R. equi* in A549 cells. A549 cells were infected for 120 min with *R. equi* RE55 (highly adherent strain), fixed and processed for double-immunofluorescence labeling. Phase contrast photomicrograph of A549 cells after infection and washing steps (a). Extracellular bacteria were detected with anti-*R. equi* rabbit antibody on non-permeabilized cells (b, a'). Total bacteria (extracellular + intracellular) were detected with the same antibody on permeabilized cells (c, b'). In merged images, extracellular bacteria are shown orange or yellow and intracellular bacteria in red (d, c', d'). Arrows indicate some intracellular bacteria (a, c, d, d') or their location (b). Arrows in the lower panel shows some bacteria that are penetrating in a cell (a'–c') or totally intracellular (d'). DAPI-stained nuclei are shown in blue (c', d'). Micrographs were originally captured at $\times 400$ magnification (a–d) or $\times 1000$ magnification (a'–d'). Scale bars, 20 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that human hosts are susceptible to a variety of *R. equi* strains, with or without plasmids, as has been previously reported [5].

Although *R. equi* is primarily a pathogen of foals, it also infects humans and other animal species. In this work we have studied the interaction of 16 *R. equi* human isolates with the human lung epithelial cell line A549. We have shown for the first time that *R. equi* invades and survives in human pulmonary cells. The 16 strains tested included VapA-positive, VapB-positive as well as plasmid-free isolates. Adhesion and invasion rates were different for the 16 strains but were not depending on the presence of the virulence plasmid neither the VapA or VapB genes.

As adherence is a prerequisite for bacterial internalization, we first study the adherence of our clinical isolates. All bacterial strains bound to the human cell line with variable levels. This result differs from those published with other mammalian non-phagocytic cell lines, where the absence of serum complement

factors is a prerequisite for adherence [26]. Plasmid less strains (RE55 and ATCC 33701⁻) adhere in the same or higher number of strains that carry the virulence plasmid. Other group showed similar results in the adherence to HeLa cells by *R. equi* animal isolates [27], and we also conclude that there is no relationship between the presence of the plasmid and adherence in our human isolates. In our study, the adhesive ability of the strains correlates with eukaryotic cell invasion ability. The mechanisms involved in entry of *R. equi* in human tissues are poorly understood despite the use of *in vitro* and *in vivo* models. While *R. equi* is easily internalized by macrophages, the information on mechanisms of entry in non-phagocytic cells is scarce [27]. In the present study, most of our strains were able to enter A549 cells with an invasion rate higher than 0.1% of the initial inocula. Ten strains can achieve rates of $\sim 0.2\%$, and four of these strains show the higher ratios of invasion, among them, the plasmid-less strain RE55 was the most invasive. The maximum

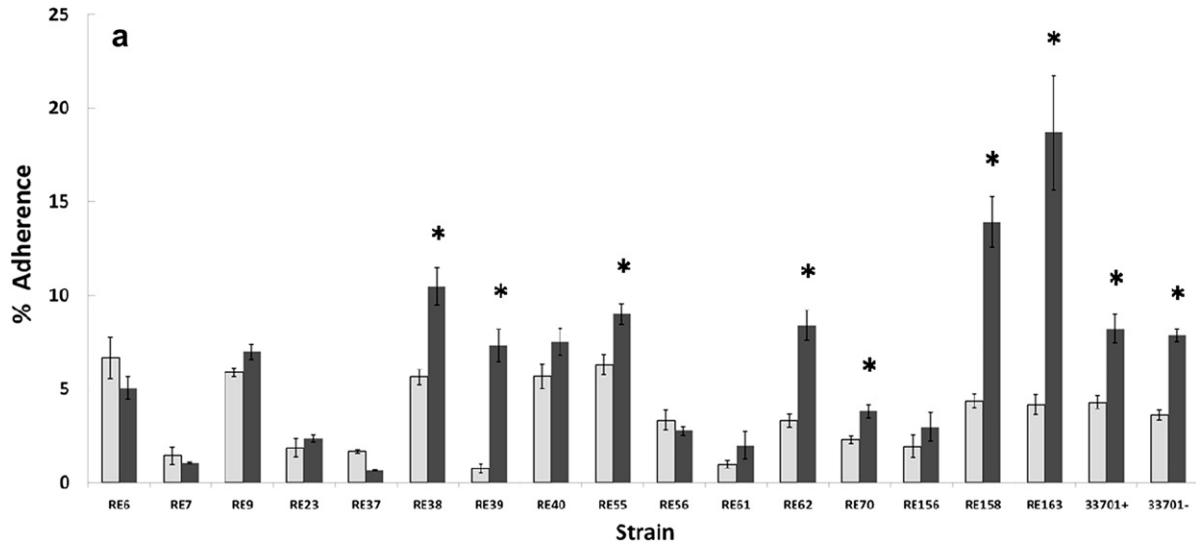


Fig. 2a. Adherence experiments. A549 cells were infected with *R. equi* strains during 120 min. *R. equi* strains were cultivated for 24 h (gray bars) or 48 h (black bars) and 10 μ l of bacteria are used for infections. Each adherence assay was performed in triplicate wells. All data are given as mean \pm SD from three independent experiments. *Denotes highly statistically significant difference ($P < 0.001$) between 48 h compared with 24 h.

invasion efficiency observed in the present study represents a percentage lower than those indicated for some human-invasive bacterial pathogens in epithelial cells such as *Brucella* [28] and *Salmonella* [29]. However, the invasion efficiencies found for several *R. equi* clinical strains were similar or higher than those reported for some other invasive species, i.e. *Campylobacter* [30,31], *Burkholderia* [32,33], *Hafnia* [19], and *Prevotella* [34], despite some differences in the epithelial cells and infection conditions used. Both adherence and internalization of this species depends greatly on the bacterial strain, time of infection and bacterial growth phase. After interaction of bacteria with host cells, we consistently recovered viable intracellular bacteria in almost all the strains, although the invasion rate varied depending on the strain. The number of

intracellular bacteria increased with increasing time of infection (from 30 min to 120 min) and with the age of the bacterial culture; bacterial cells from 48 h cultures adhere and enter better than bacteria from 24 h cultures. As all well-characterized entry systems triggered by pathogenic bacteria depend on actin filament polymerization, in order to preliminary determine if a cellular mechanism involving actins may be necessary for the internalization of *R. equi*, we treated A549 cells with the actin-disrupting agent cytochalasin D. Cytochalasin-D changed the morphology of A549 cells causing high cell retraction but not cell detachment during the 2 h period of infection. This actin-disrupting agent did not reduce drastically the number of intracellular bacteria for almost all strains. Also, experiments carried out at 4 $^{\circ}$ C did not strongly suppress invasion. Other

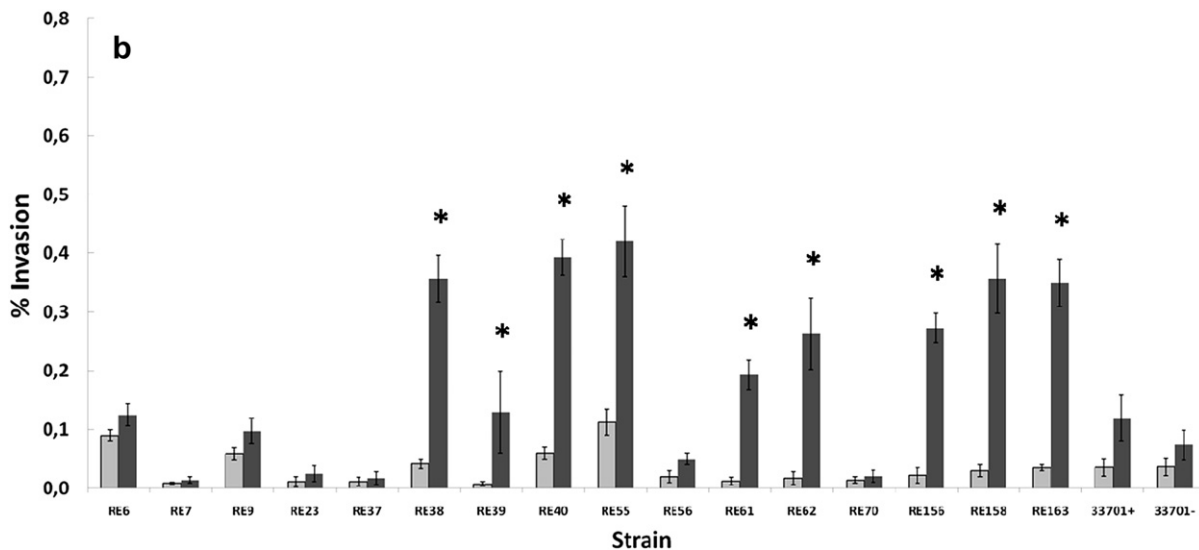


Fig. 2b. Invasion levels of *R. equi* are growth phase dependent. A549 cells were infected with *R. equi* strains during 120 min. *R. equi* strains were cultivated for 24 h (gray bars) or 48 h (black bars) and 10 μ l of bacteria are used for infections. Each invasion assay was performed in triplicate wells. All data are given as mean \pm SD from three independent experiments. *Denotes highly statistically significant difference ($P < 0.001$) between 48 h compared with 24 h.

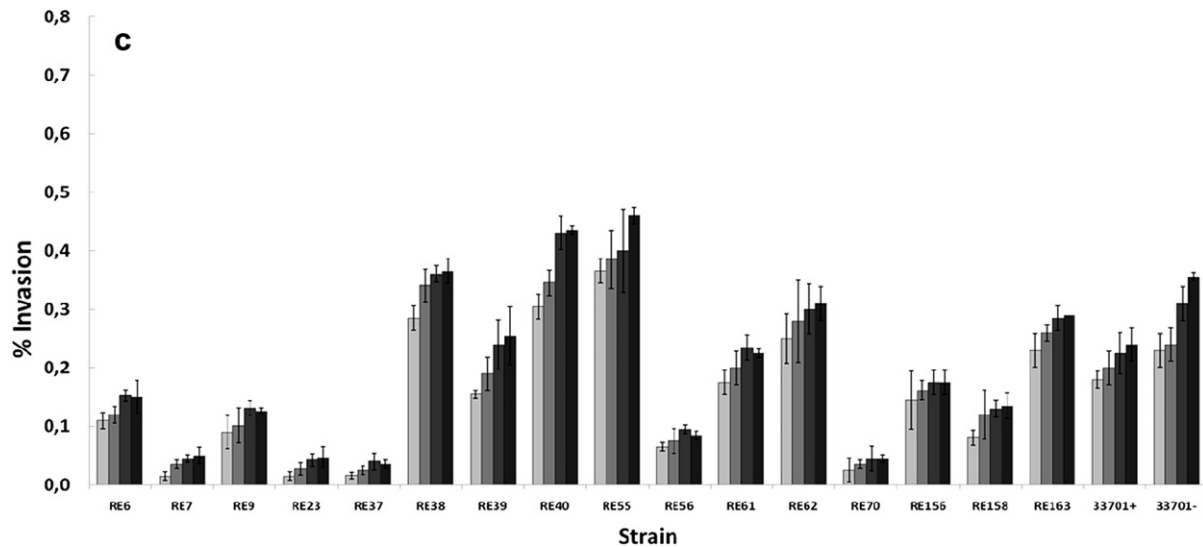


Fig. 2c. Invasion levels of *R. equi* strains are inocula dependent. A549 cells were infected with *R. equi* strains during 120 min. *R. equi* strains were cultivated for 48 h. Invasion experiments were performed with 5, 10, 15 and 20 μl of bacteria (from gray to black columns). Each invasion assay was performed in triplicate wells. Data are means \pm standard deviations of results from three independent experiments.

group showed similar results (bacteria inside vacuoles) using *R. equi* animal isolates, despite differences in epithelial cells, staining methodology, and different infection conditions were used [31]. All invasive strains were able to grow after an intracellular survival period but with different numbers, and as early as 4 h post-infection groups (of 3–6 bacteria) were observed within A549 cells. Time course experiments using vancomycin also demonstrated intracellular growth of some *R. equi* strains with a ratio of viable intracellular bacteria at 24 h to that at 2 h (I_{pro} value >1). These I_{pro} values were higher in cells infected with 24 h bacterial cultures than in cells infected with 48 h bacterial cultures, probably reflecting an influence of the different bacterial metabolic state and/or a different physiological state. In some instances, lysed human epithelial cells

with visible fissures in their surface were observed, with microcolonies apparently exiting the cell. The extracellular replication of these bacteria seems to be controlled/completely inhibited by the dose/concentration of vancomycin that we use extracellularly, that do not affect its intracellular replication. Other bacteria such as UPEC, *Salmonella*, *Legionella* and *Coxiella* undergo extensive intracellular proliferation within eukaryotic cells to form cytosolic, or intracellular microcolony biofilm-like structures [35–38]. All together, these data demonstrate that *R. equi* is capable of invading and replicating within non-phagocytic tissue culture cells, indicating that entry and multiplication within epithelial cells during *R. equi* infection may contribute to pathogenesis, spread of bacteria, and/or disease progression. The reduction in viable human epithelial

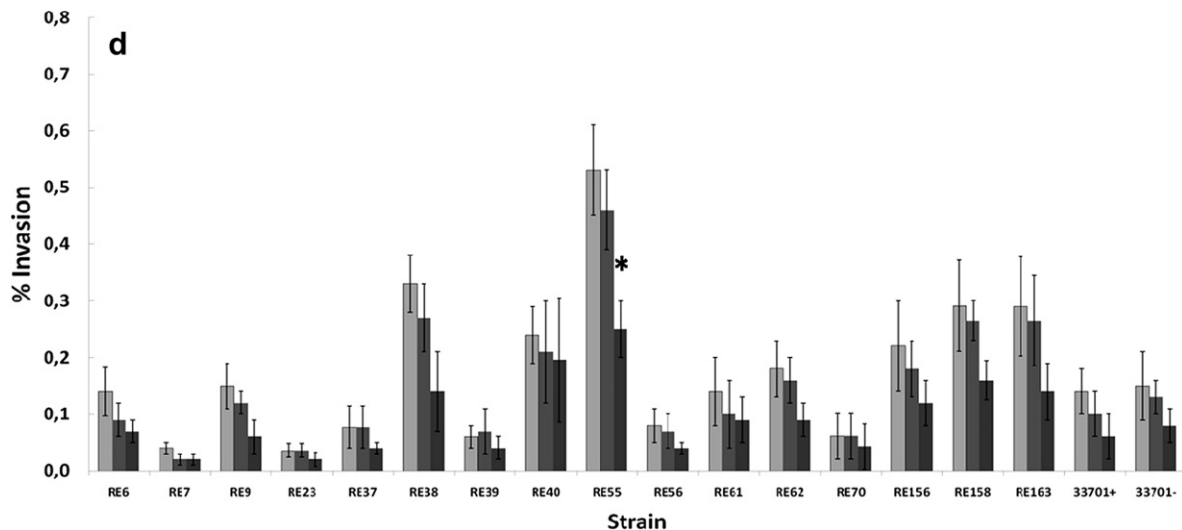


Fig. 2d. Effect of cytochalasin D and low temperature on *R. equi* internalization. A549 cells were infected with *R. equi* strains during 120 min. *R. equi* strains were cultivated for 48 h. Invasion experiments were performed with 10 μl of bacteria. Experiments without treatment, treatment with, and experiments performed at 4 $^{\circ}\text{C}$ are shown (from gray to black columns). Each invasion assay was performed in triplicate wells. All data are given as mean \pm SD from three independent experiments. *Denotes a statistically significant difference ($P < 0.01$) or ** ($P < 0.05$) between untreated and treated cells.

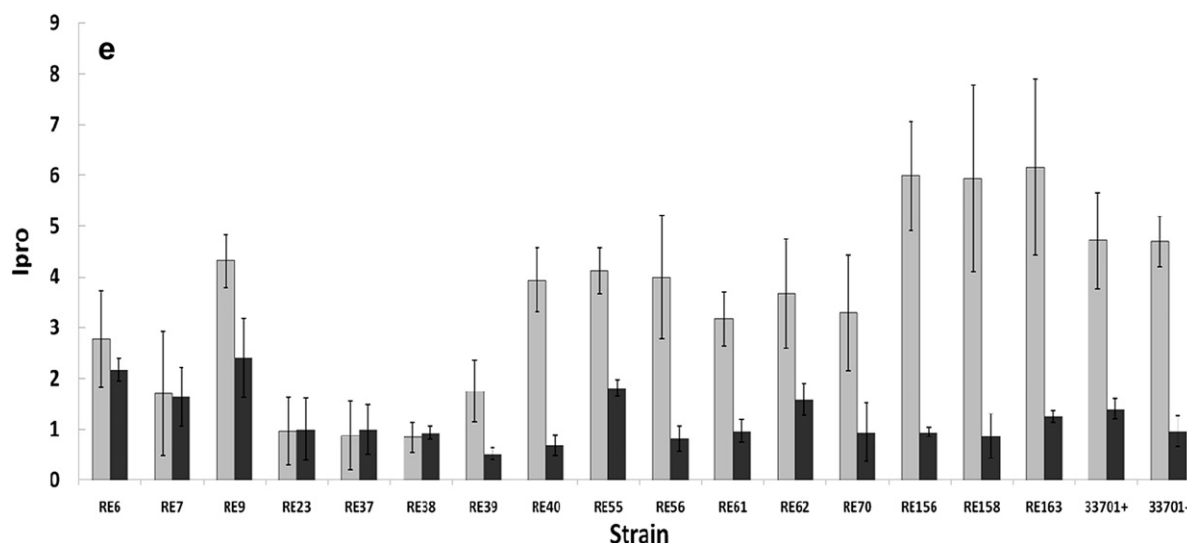


Fig. 2e. Intracellular growth rates (I_{pro} values) of *R. equi* after 24 h of infection in A549 cells. *R. equi* strains were cultivated for 24 h (gray bars) or 48 h (black bars). A549 cells were infected with *R. equi* strains during 120 min and maintained for 24 h. Each assay was performed in triplicate wells. All data are given as mean \pm SD from three independent experiments. $I_{pro} > 1$ denotes intracellular proliferation. $I_{pro} = 1$ denotes neither proliferation nor dead. $I_{pro} < 1$ denotes intracellular dead.

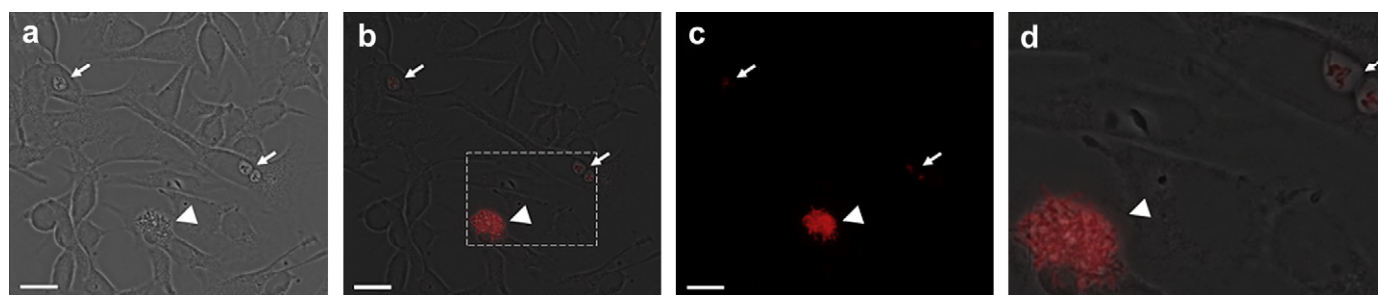


Fig. 3. A549 cells were infected for 120 min with *R. equi* strain RE55. Infection was carried out for 24 h and after washing, cells were fixed and processed for immunofluorescence labeling. Intracellular bacteria were detected with anti-*R. equi* rabbit antiserum and Alexa 594-conjugated secondary antibody. a, gray scale; b, gray scale merged with the fluorescent channel; c, fluorescent channel that shown bacteria in red; d, microcolonies of bacteria that are magnified from b. Arrows indicate bacteria inside vacuoles. Arrowheads indicate a bacterial microcolony emerging from an infected cell. Scale bars, 20 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cells after long time infection with the plasmid-less strain RE55 also indicates that *R. equi* is able to destroy/kill non-phagocytic cells. In this point, despite clinical manifestations of *R. equi* infections in immunocompromised people most frequently involve the lungs, other sites/organs such as the brain or kidney can be infected, suggesting that extrapulmonary diseases may be the result of tissular or hematogenous dissemination [39–41]. Our results also show/confirm that plasmids of *R. equi* human strains are not necessary to adhere, invade or to establish a replicative niche inside human non-phagocytic cells. Identification and characterization of the virulence factors required by *R. equi* in the intracellular environment would further elucidate the requirements for survival and spread of this pathogen in tissues.

Acknowledgments

JRV holds a Miguel Servet contract for Young Researchers from the Instituto de Salud Carlos III, Spain. LPO is recipient of a fellowship from the Agencia Española para la Cooperación

Internacional (A.E.C.I.). SRM holds a contract from the Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV).

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.micinf.2011.01.003.

References

- [1] K. von Bargen, A. Haas, Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*, *FEMS Microbiol. Rev.* 33 (2009) 870–891.
- [2] A.V. Yamshchikov, A. Schuetz, G.M. Lyon, *Rhodococcus equi* infection, *Lancet Infect. Dis.* 10 (2010) 350–359.
- [3] S. Giguere, J.F. Prescott, Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals, *Vet. Microbiol.* 56 (1997) 313–334.
- [4] M. Goodfellow, Genus *Rhodococcus*. in: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4. The William & Wilkins Co., Baltimore, Md, 1986, pp. 2362–2371.

- [5] A.A. Ocampo-Sosa, D.A. Lewis, J. Navas, F. Quigley, R. Callejo, M. Scotti, D.P. Leadon, U. Fogarty, J.A. Vazquez-Boland, Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on traA, vapA, and vapB virulence plasmid markers, *J. Infect. Dis.* 196 (2007) 763–769.
- [6] N. Ladron, M. Fernandez, J. Aguero, B. Gonzalez Zorn, J.A. Vazquez-Boland, J. Navas, Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the choE gene, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 3241–3245.
- [7] L. Pilares, J. Aguero, J.A. Vazquez-Boland, L. Martinez-Martinez, J. Navas, Identification of atypical *Rhodococcus*-like clinical isolates as *Dietzia* spp. by 16S rRNA gene sequencing, *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 1904–1907.
- [8] S. Giguere, M.K. Hondalus, J.A. Yager, P. Darrah, D.M. Mosser, J.F. Prescott, Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*, *Infect. Immun.* 67 (1999) 3548–3557.
- [9] S. Takai, C. Kobayashi, K. Murakami, Y. Sasaki, S. Tsubaki, Live virulent *Rhodococcus equi*, rather than killed or avirulent, elicits protective immunity to *R. equi* infection in mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24 (1999) 1–9.
- [10] S. Takai, T. Anzai, Y. Fujita, O. Akita, M. Shoda, S. Tsubaki, R. Wada, Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20 kDa protein (VapB) in foals, *Vet. Microbiol.* 76 (2000) 71–80.
- [11] B.A. Byrne, J.F. Prescott, G.H. Palmer, S. Takai, V.M. Nicholson, D.C. Alperin, S.A. Hines, Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins, *Infect. Immun.* 69 (2001) 650–656.
- [12] E. Fernandez-Mora, S.A. Hines, G.H. Palmer, Transfer of a CD4+ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung, *Infect. Immun.* 64 (1996) 1126–1132.
- [13] J.E. Madigan, S. Hietala, N. Muller, Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44 (1991) 571–578.
- [14] E. Fernandez-Mora, M. Polidori, A. Luhrmann, U.E. Schaible, A. Haas, Maturation of *Rhodococcus equi*-containing vacuoles is arrested after completion of the early endosome stage, *Traffic* 6 (2005) 635–653.
- [15] K. Toyooka, S. Takai, T. Kirikae, *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome, *J. Med. Microbiol.* 54 (2005) 1007–1015.
- [16] A. Casadevall, Evolution of intracellular pathogens, *Annu. Rev. Microbiol.* 62 (2008) 19–33.
- [17] S. Ehrh, D. Schnappinger, Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses, *Cell. Microbiol.* 11 (2009) 1170–1178.
- [18] M.D. Mutimer, J.B. Woolcock, Some problems associated with the identification of *Corinebacterium equi*, *Vet. Microbiol.* 6 (1981) 331–338.
- [19] D. Padilla, F. Acosta, J. Bravo, V. Grasso, F. Real, J. Vivas, Invasion and intracellular survival of *Hafnia alvei* strains in human epithelial cells, *J. Appl. Microbiol.* 105 (2008) 1614–1622.
- [20] E.D.L. Harlow, Immunizations. in: Lane EHaD (Ed.), *Antibodies, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988, pp. 53–137.
- [21] D. Padilla, F. Acosta, J.A. Garcia, F. Real, J.R. Vivas, Temperature influences the expression of fimbriae and flagella in *Hafnia alvei* strains: an immunofluorescence study, *Arch. Microbiol.* 191 (2009) 191–198.
- [22] R.R. Isberg, S. Falkow, A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12, *Nature* 317 (1985) 262–264.
- [23] D.A. Cano, M. Martinez-Moya, M.G. Pucciarelli, E.A. Groisman, J. Casadesus, F. Garcia-Del Portillo, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6463–6474.
- [24] I. Segura, J. Casadesus, F. Ramos-Morales, Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures, *J. Microbiol. Methods* 56 (2004) 83–91.
- [25] R. Jotwani, C.W. Cutler, Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th1 effector response, *Infect. Immun.* 72 (2004) 1725–1732.
- [26] M.K. Hondalus, M.S. Diamond, L.A. Rosenthal, T.A. Springer, D.M. Mosser, The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-1 to bind to mammalian cells, *Infect. Immun.* 61 (1993) 2919–2929.
- [27] A. de la Pena-Moctezuma, J.F. Prescott, Association with HeLa cells by *Rhodococcus equi* with and without the virulence plasmid, *Vet. Microbiol.* 46 (1995) 383–392.
- [28] J. Pizarro-Cerda, E. Moreno, J.P. Gorvel, Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells, *Microbes Infect./Institut Pasteur* 2 (2000) 829–835.
- [29] S.D. Mills, B.B. Finlay, Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells, *Microb. Pathog.* 17 (1994) 409–423.
- [30] L.M. Friis, C. Pin, B.M. Pearson, J.M. Wells, In vitro cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms, *J. Microbiol. Methods* 61 (2005) 145–160.
- [31] C.M. Byrne, M. Clyne, B. Bourke, *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro, *Microbiology* 153 (2007) 561–569 (Reading, England).
- [32] D.W. Martin, C.D. Mohr, Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 24–29.
- [33] M.P. Stevens, A. Friebe, L.A. Taylor, M.W. Wood, P.J. Brown, W.D. Hardt, E.E. Galyov, A *Burkholderia pseudomallei* type III secreted protein, BopE, facilitates bacterial invasion of epithelial cells and exhibits guanine nucleotide exchange factor activity, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 4992–4996.
- [34] B.R. Dorn, K.L. Leung, A. Progsulke-Fox, Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 6054–6057.
- [35] R.R. Isberg, T.J. O'Connor, M. Heidtman, The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 13–24.
- [36] D. Howe, R.A. Heinzen, *Coxiella burnetii* inhabits a cholesterol-rich vacuole and influences cellular cholesterol metabolism, *Cell. Microbiol.* 8 (2006) 496–507.
- [37] R.E. Berry, D.J. Klumpp, A.J. Schaeffer, Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* 77 (2009) 2762–2772.
- [38] J.H. Brumell, P. Tang, M.L. Zaharik, B.B. Finlay, Disruption of the *Salmonella*-containing vacuole leads to increased replication of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the cytosol of epithelial cells, *Infect. Immun.* 70 (2002) 3264–3270.
- [39] J.C. Rahamat-Langendoen, M. van Meurs, J.G. Zijlstra, J.R. Lo-Ten-Foe, Disseminated *Rhodococcus equi* infection in a kidney transplant patient without initial pulmonary involvement, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65 (2009) 427–430.
- [40] S. Olivieri, G. Oliveri, Cerebellar abscess due to *Rhodococcus equi* in an immunocompetent patient: case report and literature review, *J. Neurosurg. Sci.* 50 (2006) 127–129.
- [41] S.R. Paasche, *Rhodococcus equi* infection in a surgical wound, *Clin. Lab. Sci.* 22 (2009) 141–145.

