



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"*Rhodococcus equi*. DIAGNOSTICO,
TRATAMIENTO, Y PREVENCIÓN"

TRABAJO FINAL ESCRITO EN LA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA
EN LA MODALIDAD DE EQUINOS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
LUCERO DEL CASTRO MADRAZO



MÉXICO, D.F. 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

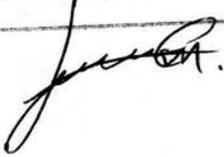
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: LUCERO DEL

CASTRO MADRAZO

FECHA: 17/02/04

FIRMA: 

Rhodococcus equi. DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

Lucero Del Castro Madrazo
Francisco Trigo Tavera

México D.F., 2004

Los experimentos contenidos en este trabajo fueron realizados en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas Equinas, que forma parte del Departamento de Medicina de Grandes Especies de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Texas A y M, bajo la dirección de Noah D. Cohen, VMD, MPH, PhD y Ronald J. Martens, DVM.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	4
PATOGENIA.....	10
EPIDEMIOLOGÍA.....	13
INMUNIDAD.....	15
DIAGNÓSTICO.....	18
TRATAMIENTO.....	26
PRONOSTICO.....	32
PREVENCIÓN.....	33

FASE EXPERIMENTAL

EXPERIMENTO I. AISLAMIENTO DE ADN DE *Rhodococcus equi* A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES Y EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

INTRODUCCIÓN.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	42
DISCUSIÓN.....	45

EXPERIMENTO II. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR
Rhodococcus equi CON MALTOLATO DE GALIO

INTRODUCCIÓN.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
RESULTADOS.....	54
DISCUSIÓN.....	58
REFERENCIAS.....	62

RESUMEN

DEL CASTRO MADRAZO LUCERO. *Rhodococcus equi*. Revisión de la enfermedad, diagnóstico y prevención (bajo la dirección de: Francisco Trigo Tavera)

En el presente estudio se presenta una revisión de la enfermedad causada por la bacteria *Rhodococcus equi*. Se describen las manifestaciones clínicas, la patogenia, epidemiología e inmunidad, además de mencionar las principales pruebas diagnósticas utilizadas en el reconocimiento de la enfermedad. También se describe el tratamiento que ha resultado ser más eficaz actualmente, así como el pronóstico y las medidas que pueden establecerse para prevenir este padecimiento. Posteriormente se describen dos experimentos, el primero habla del uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como método de diagnóstico de la infección por *R. equi* a partir de muestras de heces. Se estudió mediante el mismo método el hecho de que una de las principales fuentes de infección para los potros son las heces de sus madres. Investigaciones previas han demostrado que el microorganismo se encuentra disperso en el medio ambiente

de lugares donde habitan caballos y ha sido aislado de las heces de herbívoros, pero gracias al uso del PCR se puede diferenciar entre cepas virulentas o avirulentas. El resultado de este experimento fue la comprobación de la hipótesis de que las heces de las yeguas son una de las fuentes del microorganismo, así como la estandarización de los parámetros del PCR para poderlo establecer como método diagnóstico para esta enfermedad utilizando muestras de heces. En el segundo experimento se investigó la capacidad del maltolato de galio para inhibir el crecimiento de *R. equi* cuando se administra a ratones infectados experimentalmente con la bacteria. Dado que el galio es un inhibidor competitivo del fierro y por este motivo altera el metabolismo bacteriano. El resultado de este experimento fue una disminución en el grado de infección de los ratones que recibieron una dosis de 10 mg/kg de maltolato de galio. Se sugiere que el maltolato de galio puede utilizarse de manera profiláctica administrándolo a potros en lugares donde la enfermedad es endémica y que además puede ser coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad.

Introducción

Rhodococcus equi, una bacteria Gram-positiva, intracelular facultativa es una de las causas más comunes de neumonía en potros entre 3 semanas y 5 meses de edad. Aunque al parecer *R. equi* está presente en mayor o menor grado en todas las explotaciones equinas y los anticuerpos se encuentran ampliamente distribuidos entre la población caballar, la enfermedad clínica es enzoótica en algunas granjas, esporádica en otras e irreconocible en la mayoría. Probablemente esto es reflejo de diferencias medioambientales (temperatura, presencia de polvo, tipo de suelo, pH, etc.), de manejo y diferencias en la virulencia de la bacteria. En las zonas donde la enfermedad es enzoótica, los costos asociados con la atención veterinaria, diagnóstico temprano, duración del tratamiento y mortalidad son extremadamente altos. ^(10,12,13)

En el presente trabajo se hace una revisión actualizada de la enfermedad y se presentan también dos experimentos cuyos resultados pueden tener aplicación en el diagnóstico y la prevención de esta enfermedad.

Manifestaciones clínicas

Bronconeumonía

La manifestación más común de la infección por *R. equi* en potros es una bronconeumonía supurativa crónica, con abscesos pulmonares y linfadenitis supurativa. El esparcimiento lento de la infección junto con la habilidad del potro para compensar la progresiva pérdida funcional del pulmón dificulta el diagnóstico clínico temprano. Los signos clínicos iniciales solo incluyen un leve aumento de la frecuencia respiratoria y fiebre moderada, por lo que frecuentemente son imperceptibles. Esto permite el progreso de la enfermedad y por este motivo, en la presentación crónica de la enfermedad, los signos clínicos parecen presentarse de forma aguda y estos pueden ser disminución del apetito, letargia moderada, fiebre (de 38.8°C hasta 41.5°C), taquipnea y dificultad para respirar, caracterizada por aleteo de los ollares y marcado esfuerzo abdominal. En algunos casos puede presentarse tos y descarga nasal bilateral. La mayoría de los potros enfermos presentan buena condición corporal, pero cuando la enfermedad se hace crónica la pérdida de peso se vuelve aparente. La enfermedad también puede presentarse de forma subaguda,

estos animales muestran dificultad respiratoria aguda, fiebre alta, o muerte sin previa historia de enfermedad respiratoria. Estos potros generalmente mueren después de dos o tres días a pesar del tratamiento administrado.

A la auscultación, los sonidos pulmonares varían considerablemente dependiendo de la presentación de la enfermedad, los hallazgos pueden confundirse con sonidos del tracto respiratorio superior. A la inspiración y espiración pueden escucharse sibilancias o estertores sobre las áreas afectadas, comúnmente en localización cranioventral. En zonas de consolidación pulmonar los sonidos están disminuidos, así como en zonas de abscesos periféricos o efusión pleural (aunque es raro encontrar efusión pleural en casos de *R. equi*). Los hallazgos a la auscultación no necesariamente tienen relación con la severidad de la neumonía. La percusión torácica es de gran ayuda para la detección de zonas de consolidación o abscesos. (6,12)

A la necropsia la forma subaguda se caracteriza por la presencia de neumonía piogranulomatosa miliar (Figura 1), la madurez de las lesiones sugieren daño pulmonar previo a la presentación de los signos clínicos. (6,12,24)

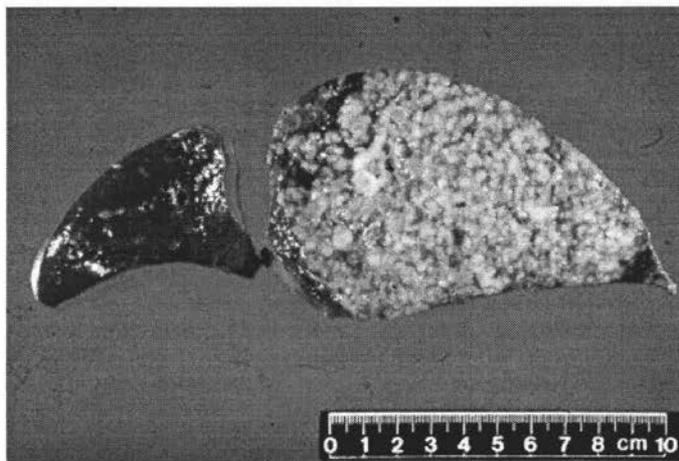


Figura 1. Pulmón de un potro con bronconeumonía por *R. equi*.
Fuente: Laboratorio de Enfermedades Infecciosas Equinas, Texas A&M.

Manifestaciones intestinales

Aproximadamente el 50% de los potros con neumonía también presentan manifestaciones intestinales. Puede presentarse peritonitis y el microorganismo puede ser aislado del liquido peritoneal. Los signos clínicos asociados a la presentación intestinal incluyen fiebre, depresión, anorexia, pérdida de peso, cólico y diarrea. La marcada obstrucción linfática asociada a un aumento de proteínas en el liquido peritoneal e hipoproteïnemia pueden conllevar a ascitis. La forma intestinal de infección por *R. equi* se caracteriza a la necropsia por una enterocolitis ulcerativa multifocal y tiflitis sobre la zona de las Placas de Peyer,

con inflamación granulomatosa o supurativa de los linfonodos colónicos, mesentéricos o ambos. Ocasionalmente el único hallazgo es un sólo absceso abdominal (normalmente en un linfonodo mesentérico) con adhesiones al intestino delgado o grueso. Estos animales tienen un pobre pronóstico debido a la extensa inflamación de la mucosa y submucosa colónicas y linfonodos mesentéricos. (6,12,24)

Polisinovitis inmunomediada

La deposición de complejos inmunes en estructuras sinoviales, particularmente en las articulaciones tibiotarsal y femoro-tibio-patelar se presenta en un tercio de los casos de neumonía por *R. equi*. En algunas ocasiones todas las articulaciones se ven afectadas. El grado de efusión articular es variable, y en la mayoría de los casos no hay claudicación aparente, solamente se presenta cierta rigidez al caminar. El examen de líquido sinovial revela pleocitosis mononuclear no séptica, y el cultivo bacteriológico generalmente resulta negativo. El examen histológico de la membrana sinovial presenta sinovitis linfoplasmocítica. La tinción de la membrana sinovial con anticuerpos anti-IgG equina marcados con fluoresceína

muestra evidencia de inmunoglobulinas. Factores reumatoides (por ejemplo anticuerpos contra la porción Fc autóloga o heteróloga de las inmunoglobulinas) se han identificado en el líquido sinovial de potros enfermos. No se recomienda tratamiento local, ya que la efusión desaparece sin aparentes consecuencias al paralelo de la resolución de la infección primaria con terapia antimicrobiana. La presencia de polisinovitis inespecífica en un potro entre 1 y 6 meses de edad es altamente sugerente de infección por *R. equi* y requiere investigación a profundidad. ^(12,24)

La deposición de complejos inmunes también puede contribuir al desarrollo de uveítis, anemia y trombocitopenia en algunos animales. ^(12,30)

Artritis séptica y osteomielitis

La artritis séptica y osteomielitis pueden ser resultantes de bacteremia, por paso del microorganismo de los pulmones o el tracto gastrointestinal a la sangre, aunque en ocasiones puede presentarse sin una fuente de infección pulmonar o intestinal aparente. El grado de claudicación en los potros con artritis séptica los distingue fácilmente de los casos de polisinovitis inmunomediada. Muchas veces los

hallazgos clínicos y patológicos tienen gran similitud con metafisitis primaria (osteomielitis tipo P). La extensión de la infección ósea a la corteza metafiseal y el tejido circundante pueden conllevar a celulitis y algunas veces a artritis séptica. La osteomielitis vertebral o discoespondilitis se ha descrito frecuentemente, los signos clínicos incluyen fiebre, letargia, rigidez al andar, resistencia al movimiento y a la palpación. Es común que el diagnóstico se realice cuando la infección se ha extendido al espacio epidural por la presentación de signos de compresión espinal. Estos signos incluyen paresia, ataxia, parálisis, o cauda equina, dependiendo de la severidad y el sitio de compresión. El examen radiográfico es indispensable para confirmar el diagnóstico de osteomielitis vertebral. Los cambios radiográficos en el cuerpo vertebral pueden no ser aparentes hasta después de 2-8 semanas del establecimiento de los signos clínicos. El uso de gammagrafía o tomografía computarizada es muy útil en la localización de las lesiones en la fase insipiente de la enfermedad. Siempre que se presente efusión articular debe realizarse cultivo bacteriológico y examen del líquido sinovial. Además de terapia antimicrobiana, estos animales requieren tratamiento local. El pronóstico es reservado.⁽¹²⁾

Otras manifestaciones

Se han reportado linfangitis, celulitis y abscesos subcutáneos. También se ha presentado uveítis, panoftalmitis, empiema gutural, sinusitis, pericarditis, nefritis y abscesos renales y hepáticos. (2)

La presentación de enfermedad debida a *R. equi* en caballos adultos es rara. Hay algunos informes de enfermedad similar a la observada en potros, involucrando principalmente los pulmones, el colon, los nódulos linfáticos, y raramente heridas infectadas y normalmente está asociado a casos de inmunosupresión. En contadas ocasiones se ha podido aislar al microorganismo de yeguas infértiles y fetos abortados. (12,27)

Patogenia

Rhodococcus equi es un patógeno intracelular facultativo, su infectividad *in vitro* se limita a la línea celular de macrófagos y monocitos. La habilidad de *R. equi* para persistir, y eventualmente destruir a los macrófagos alveolares parece ser la base de su patogenicidad. La

persistencia intracelular parece estar relacionada con la ausencia de la fusión fagosoma-lisosoma.⁽¹⁰⁾

La habilidad de *R. equi* para inducir enfermedad en potros depende en gran parte de factores del hospedador y del microorganismo. El conocimiento de los mecanismos de virulencia de *R. equi* era especulativo hasta el descubrimiento del plásmido de virulencia. A diferencia de los aislamientos de *R. equi* del medio ambiente, los aislamientos provenientes de potros con neumonía contienen un plásmido de 80-90 kb, el cual codifica para una familia de proteínas asociadas a virulencia designadas VapA hasta VapH. La proteína asociada a virulencia A (VapA) se expresa en la superficie de la bacteria, su expresión esta regulada por la temperatura, ocurriendo entre 34°C y 41°C (Figura 2). Clonas de *R. equi* en las que se ha eliminado el plásmido pierden la habilidad de sobrevivir y replicarse en los macrófagos y tampoco son capaces de provocar neumonía, pudiendo ser eliminadas por completo del pulmón del potro en después de 2 semanas de una infección intrabronquial (experimental), confirmando de esta manera la necesidad del plásmido para la virulencia de la bacteria. Un derivado recombinante de *R. equi* sin el plásmido, pero que si expresaba la VapA fue capaz de sobrevivir y de replicarse en macrófagos, demostrando que la expresión de esta

proteína por si sola es suficiente para restituir completamente la virulencia, mientras que clonas de la bacteria que no poseen el gen que codifica para la VapA (pero si los genes para las demás proteínas asociadas a virulencia) se comportaron igual que las clonas de *R. equi* sin el plásmido de virulencia. Todas las proteínas asociadas a virulencia poseen secuencias similares, por lo que se sospecha que tienen funciones redundantes, pero el papel preciso que cada uno de estos genes juega en la patofisiología de la infección por *R. equi* y en la virulencia de la bacteria todavía no se ha determinado.^(10,16)

Los glicolípidos que contienen ácido micólico en la pared celular de la bacteria también contribuyen a la virulencia de este microorganismo. Las cepas que contienen cadenas de carbono mas largas en el ácido micólico han demostrado ser mas virulentas que aquellas con cadenas cortas según lo observado en la letalidad y formación de granulomas en ratones. Otros factores que se pueden considerar para la virulencia de la bacteria, pero aun no han sido estudiados a profundidad, incluyen los polisacáridos capsulares, las colesteroloxidasas, fosfohidrolaza-colina y exonenzimas de fosfolipasa C (factores equi). Sin embargo, tanto las enzimas capsulares como las exoenzimas son producidas por cepas virulentas y

no virulentas, lo que sugiere que su contribución en la virulencia, si es que existe, es insignificante en comparación con las funciones mediadas por plásmidos. ^(9,10)

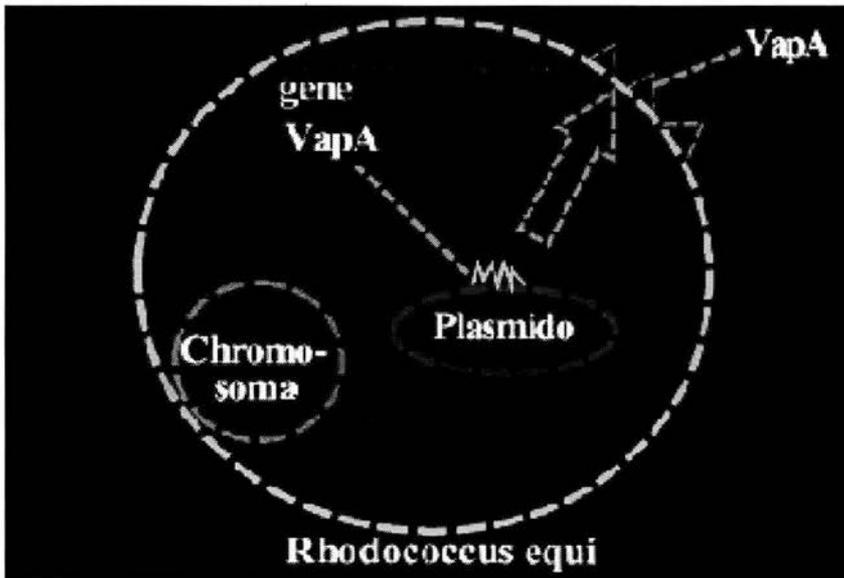


Figura 2. Esquema de la expresión de la proteína asociada a virulencia A.

Epidemiología

Rhodococcus equi es un microorganismo con simples requerimientos para su crecimiento por lo que se puede considerar ubicuo. La carga intestinal de herbívoros adultos representa la adquisición del microorganismo a partir de pasto contaminado. ⁽²⁷⁾

Esta bacteria puede multiplicarse en el intestino de un potro de tres meses de edad alcanzando concentraciones de

mas de 10^5 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de heces. Debido a que los potros enfermos tragan el esputo infectado, la bacteria llega al intestino y se multiplica, por lo cual, las heces de los potros positivos a *R. equi* son una de las mayores fuentes de contaminación del ambiente con microorganismos virulentos. Bajo condiciones ambientales favorables, la bacteria puede multiplicarse en el suelo 10,000 veces en sólo en 2 semanas. Un solo gramo de suelo contaminado con heces de un potro enfermo puede contener millones de bacterias virulentas. La inhalación de partículas de polvo que contengan *R. equi* virulento parece ser la ruta de infección más común. La ingestión del microorganismo es una fuente de exposición e inmunización importante, pero es raro que ocasione neumonía (vía hematógena) a menos que se trate de exposición a grandes cantidades de la bacteria. ^(10,27)

Rhodococcus equi también puede causar neumonía en humanos inmunocomprometidos, pero en estas infecciones la bacteria suele ser oportunista y puede causar enfermedad aunque no posea el plásmido de virulencia, lo que sugiere que la enfermedad en humanos no es igual a la de los potros. ⁽¹⁰⁾

Nunca se han aislado bacterias con virulencia intermedia (expresión de VapB) de potros con infección

adquirida naturalmente. Se ha provocado enfermedad en potros infectados experimentalmente, pero con dosis mucho mayores que la necesaria para inducción de neumonía con cepas que expresan VapA. ⁽¹⁰⁾

Inmunidad

Inmunidad humoral

La respuesta inmune contra *R. equi* depende de los dos componentes, humorales y celulares, del sistema inmune, pero su base exacta aun no se ha determinado. La edad en que se desarrolla la neumonía por *R. equi* coincide y puede estar en parte relacionada con la disminución de los anticuerpos maternos, sin embargo, la mayor evidencia del papel de los anticuerpos ante la infección por *R. equi* se ha visto con el efecto protector que proporciona la transferencia pasiva de plasma equino hiperinmune anti-*R. equi*. Los mecanismos mediante los cuales el plasma hiperinmune confiere protección no se han entendido por completo. La lista de posibles moléculas efectivas incluye anticuerpos y factores no específicos como fribronectina, componentes del complemento, citocinas y proteínas de fase aguda. La opsonización de la bacteria con anticuerpos

específicos ha demostrado promover la fagocitosis y muerte de la bacteria por macrófagos alveolares designando a los anticuerpos como un componente muy importante del plasma hiperinmune. En todos los estudios en los que se evalúa el efecto protector del plasma hiperinmune los donadores de plasma fueron inmunizados con vacunas de células completas o mezcla de varios antígenos solubles haciendo imposible determinar el papel de los anticuerpos contra antígenos específicos de *R. equi*. ^(10,30)

Estudios más recientes se han enfocado en el efecto de los anticuerpos contra las proteínas de virulencia codificadas por el plásmido (VapA). Un anticuerpo monoclonal para VapA y suero de caballos inmunizados con VapA demostró tener actividad opsonizante. Las inmunoglobulinas purificadas a partir de plasma de caballos vacunados con VapA parcialmente purificada tuvieron efecto protector en ratones inoculados con *R. equi* vía intraperitoneal, comparado con inmunoglobulinas de caballos no inmunizados. Recientemente, la administración intravenosa de inmunoglobulinas purificadas obtenidas de caballos inmunizados con VapA y VapC recombinantes a potros demostró reducir la severidad de la neumonía después de la infección experimental con *R. equi*. ^(10,29,30)

Inmunidad celular

Debido a que *R. equi* es un patógeno intracelular facultativo se cree que los mecanismos de inmunidad celular son de gran importancia en la resistencia a esta enfermedad. ^(10,12,30)

Los dos mecanismos principales por los que los linfocitos T actúan contra patógenos intracelulares son la secreción de citocinas y la citotoxicidad directa. Aunque ambas células T, CD4 (cooperadoras) y CD8 (citotóxicas), contribuyen a la defensa contra *R. equi*, los linfocitos TCD4 se consideran más importantes. ^(10,30)

La analogía entre la neumonía causada por *R. equi* en humanos con inmunodeficiencia sugiere que los potros con esta enfermedad tienen algún tipo de inmunosupresión, o bien, las cepas virulentas de esta bacteria alteran la respuesta inmune en algún grado. La respuesta por citocinas en potros infectados con *R. equi* virulento y avirulento se ha estudiado recientemente. Los potros infectados con cepas virulentas mostraron una marcada reducción en la expresión de ARNm para IFN γ por linfocitos TCD4 de linfonodos bronquiales, en comparación con linfocitos aislados de potros infectados con cepas avirulentas, además, la IL-10,

citocina que se inhibe la activación de linfocitos Th1 en otras especies, solo se expresó en los pulmones de potros infectados con la cepas virulentas. Estos estudios sugieren que el *R. equi* virulento tiene un importante efecto inmunomodulador en la patogenia de la enfermedad. ⁽¹⁰⁾

Diagnóstico

La diferenciación entre infecciones del tracto respiratorio bajo causadas por *R. equi* y otros patógenos es problemática. Varias técnicas diagnósticas, incluyendo hemograma, medición de los niveles de fibrinógeno, radiografías y pruebas serológicas son útiles para distinguir la neumonía causada por *R. equi* de la de otros patógenos, sin embargo, el cultivo bacteriano combinado con el examen citológico de exudado traqueobronquial es lo más indicado para llegar a un diagnóstico definitivo. ⁽¹⁰⁾

Actualmente el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basado en la secuencia del gene que codifica para la proteína asociada a virulencia A (VapA) puede ser un medio mas rápido y sensible para identificar a *R. equi*, además de que presenta ciertas ventajas sobre otros métodos diagnósticos, como se menciona posteriormente en este trabajo.

Pruebas de laboratorio

El hemograma debe incluir niveles de proteínas plasmáticas y fibrinógeno y debe realizarse en todos los casos en que se sospeche neumonía por *R. equi*. El hallazgo clínico mas consistente es la hiperfibrinogenemia, aunque en algunas ocasiones la concentración de fibrinógeno puede ser normal. También es común una leucocitosis neutrofílica con o sin monocitosis. ^(1,12)

Imagenología

Las radiografías de tórax son útiles para evaluar la severidad de la neumonía, así como la respuesta al tratamiento. Un patrón alveolar caracterizado por regiones definidas de consolidación pulmonar es la anormalidad encontrada más frecuentemente. Las zonas de consolidación se ven como lesiones cavitarias y nodulares, compatibles con abscesos pulmonares. (6)

En potros menores de tres meses de edad, la evidencia radiográfica de lesiones nodulares en pulmón y linfadenopatía son altamente sugestivos de infección por *R. equi*, aunque no se debe descartar a *S. zooepidemicus* ya

que es otra causa de abscesos pulmonares en potros de tres meses y mayores. En algunos casos de neumonía por *R. equi* el único hallazgo radiográfico es un patrón broncointersticial moderado o severo. ⁽¹⁰⁾

La ultrasonografía es una herramienta diagnóstica importante, en especial cuando están involucradas áreas periféricas del pulmón, aunque no es tan útil como los rayos X para evaluar la extensión de las lesiones ya que los abscesos detrás del pulmón con aire no son visibles. Pueden utilizarse transductores de 7.5 o 5.0 Mhz. ⁽¹⁰⁾

Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas pueden dividirse en tres tipos: inmunodifusión en gel, inhibición de la hemólisis y ELISA. El diagnóstico serológico de *R. equi* es problemático debido a que la sobreexposición de los potros a este microorganismo ocasiona producción de anticuerpos, sin la necesaria presentación de la enfermedad clínica. En algunas de estas pruebas, los anticuerpos de origen materno pueden ocasionar resultados falsos positivos. ⁽¹⁰⁾

Inmunodifusión en gel

Todas las cepas de *R. equi* son capaces de producir enzimas membranolíticas originalmente llamadas "factores equi". Estas exoenzimas son fosfolipasas C y colesteroloxidasas. La inmunodifusión en gel detecta principalmente anticuerpos que se precipitan contra estas exoenzimas, pero en ocasiones también detectan otros antígenos desconocidos. La mayoría de los caballos adultos son negativos a la precipitación de anticuerpos con esta prueba, por lo cual no existen resultados falsos positivos por anticuerpos de origen materno. ⁽¹²⁾

Inhibición de la hemólisis (sinérgica)

Las exoenzimas previamente descritas son capaces de interactuar con una fosfolipasa D producida por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o la toxina beta del *Staphylococcus aureus*, para en conjunto destruir las membranas de eritrocitos de mamíferos, causando hemólisis. La presencia de anticuerpos contra estas exoenzimas resulta en una inhibición de la hemólisis. ^(12,25)

ELISA

Se han descrito cuatro tipos de ELISA para medir la respuesta humoral a *R. equi*. Todas estas pruebas se desarrollaron usando antígenos diferentes, que en la mayoría de los casos están pobremente definidos. Estudios hechos con ELISA han demostrado que los anticuerpos contra *R. equi* están ampliamente distribuidos entre la población equina, pero no hay relación aparente de los títulos de ELISA con la enfermedad clínica. ⁽¹²⁾

La principal ventaja diagnóstica de ELISA es la capacidad de detectar la exposición tanto a cepas virulentas como no virulentas, pero la sensibilidad y especificidad de este ensayo no han podido ser evaluadas clínicamente. ⁽¹²⁾

En resumen, la información obtenida de pruebas serológicas no es muy confiable ya que estas carecen de especificidad y sensibilidad adecuadas. Estos ensayos tienen mayor utilidad a nivel de granja para detectar la exposición al microorganismo, más que para diagnóstico a nivel individual. El basarse solamente en pruebas serológicas puede llevar tanto a diagnóstico de falsos-positivos por la cantidad de anticuerpos presentes contra

esta bacteria, como falsos-negativos en etapas tempranas de la enfermedad.

Cultivo y citología

El cultivo bacteriano combinado con el examen citológico del aspirado traqueobronquial es el método mas aceptable para llegar a un diagnóstico definitivo de esta enfermedad. El aspirado traqueobronquial se obtiene por aspiración transtraqueal percutánea (Figura 3), o pasando un tubo estéril de polietileno a través del canal para biopsias de un endoscopio. La endoscopia tiene la ventaja de permitir la visualización del exudado cuando esta presente, aunque es común la contaminación bacteriana de origen nasal o faríngeo. El procedimiento debe evitarse en animales con severa dificultad para respirar. ⁽¹⁰⁾

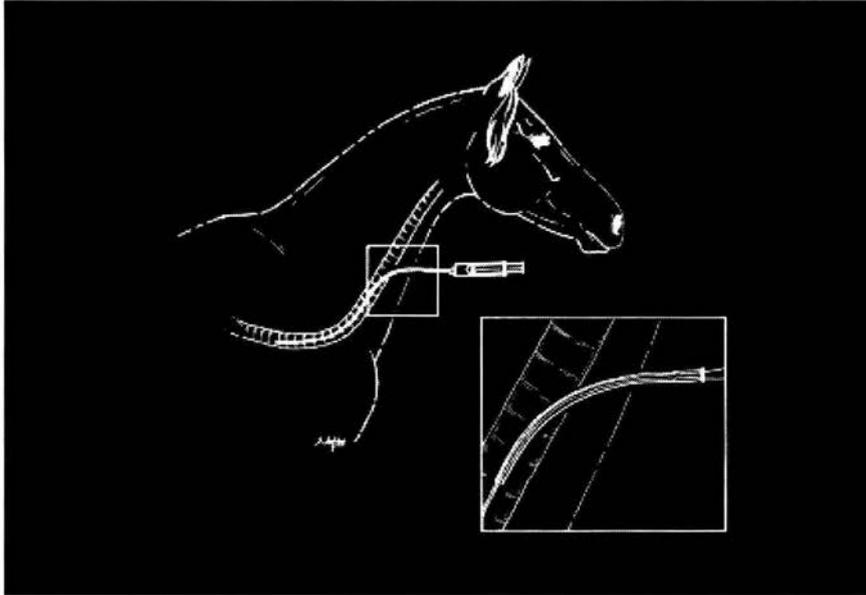


Figura 3. Aspirado traqueobronquial vía transtraqueal.

R. equi puede aislarse después de 48 horas de cultivo de especímenes frescos, obtenidos antes de iniciada la antibioterapia, los cultivos deben ser incubados por 72 horas ya que algunas colonias pueden no ser evidentes, especialmente si hay contaminación con otros microorganismos. El cultivo puede tardar varios días en crecer si el potro ha sido previamente tratado con antibióticos, o puede aislarse solamente en condiciones anaeróbicas. ^(10,12)

Los animales que no presentan la enfermedad clínica pueden resultar positivos al cultivo bacteriano ya que pueden poseer *R. equi* en la traquea debido a la inhalación de polvo en ambientes contaminados con el microorganismo, por tal motivo, el cultivo bacteriológico del aspirado traqueobronquial debe ser interpretado en el contexto de la evaluación histológica, examen físico y resultados de las pruebas de laboratorio. El exudado traqueobronquial es también la muestra de elección para realizar examen citológico. En este caso se pueden identificar bacilos pleomorficos Gram-positivos. El líquido proveniente de un lavado bronquioalveolar no es una muestra útil para el diagnóstico citológico de neumonía, ya que aproximadamente el 50% de los caballos con neumonía confirmada presentan líquido bronquioalveolar normal a pesar de la evidencia de inflamación aguda en el examen citológico del exudado traqueobronquial. El cultivo a partir de hisopos fecales o nasales no se puede tomar como evidencia de la infección por *R. equi* ya que este microorganismo puede ser aislado a partir de heces de caballos sanos. El cultivo cuantitativo de heces de potros en intervalos semanales puede ser utilizado para diagnóstico temprano de enteritis por *R. equi*, ya que la cantidad de bacterias por gramo de heces aumenta al paralelo del aumento de los signos clínicos, sin

embargo, una sola muestra de heces de un potro no tiene valor diagnóstico debido a la variación entre individuos y entre granjas del número de microorganismos que puedan estar presentes en la heces. ⁽¹²⁾

Tratamiento

En estudios realizados *in vitro*, una gran variedad de antimicrobianos han resultado ser efectivos contra *R. equi*, pero dado que esta bacteria es intracelular, sobrevive y se replica dentro de los macrófagos, y causa lesiones granulomatosas con un material caseoso espeso, muchos de estos medicamentos no son efectivos *in vivo*. ⁽¹²⁾

La combinación de rifampicina con eritromicina se ha convertido en el tratamiento de elección para animales infectados por *R. equi*. Desde su introducción, se ha logrado reducir la mortalidad por esta enfermedad dramáticamente. ^(12,30)

Ambos medicamentos tienen acción bacteriostática contra *R. equi*, pero la combinación de estos es sinérgica, *in vivo* e *in vitro*, además de que reduce el desarrollo de resistencia a ambas cuando se usan al mismo tiempo. La rifampicina y en menor grado la eritromicina son

liposolubles, lo que les permite penetrar el material caseoso. ⁽¹²⁾

La dosis recomendada de rifampicina es de 5 mg/kg cada 12 horas o 10 mg/kg cada 24 horas por vía oral. Este medicamento puede ocasionar que la orina y otros fluidos corporales (lagrimas, saliva, etc.) tomen una coloración anaranjada, pero normalmente es bien tolerada cuando se administra por vía oral durante largos periodos. La administración endovenosa de rifampicina puede ocasionar diversos efectos, como debilidad, incoordinación, sudoración profusa. La dosis recomendada de eritromicina es de 25 mg/kg cada 8 horas. ^(1,10)

En el caso de que la enfermedad este complicada con otro agente microbiano resistente al la rifampicina, a la eritromicina o a ambas, será necesario el uso de un tercer medicamento antimicrobiano. ^(10,12)

La resolución de los signos clínicos y las lesiones radiográficas, así como la normalización de los niveles de fibrinógeno, son la guía para la duración del tratamiento que usualmente va de 4 a 9 semanas. El mejor criterio consiste en discontinuar el tratamiento una semana después de que el fibrinógeno alcanza niveles normales. La terapia de largo plazo es cara, pero necesaria ya que puede

presentarse una recaída si el tratamiento se descontinúa tempranamente. ⁽¹²⁾

Aunque la combinación de rifampicina con eritromicina es bien tolerada por la mayoría de los potros, es común que cause un reblandecimiento de las heces. En la mayoría de los casos, este efecto es autolimitante y no requiere la suspensión del tratamiento, pero es importante monitorear a estos animales ya que puede llegar a presentarse diarrea severa y depresión que conlleva a deshidratación y pérdida de electrolitos. En tal caso debe administrarse terapia de fluidos y cesar la administración oral de eritromicina. Si la infección por *R. equi* es severa al momento de la presentación de la diarrea, la eritromicina puede administrarse vía intravenosa a dosis de 5 mg/kg, diluido en solución salina por infusión lenta cada 6 horas. La administración intravenosa de eritromicina junto con rifampicina oral y terapia de soporte ha resultado en el cese de la diarrea, aunque la eritromicina se excrete por la bilis. ⁽¹²⁾

Los potros que presentan diarrea severa por el tratamiento con eritromicina pueden desarrollar una bacteremia por microorganismos Gram-negativos como *Salmonella* spp. u otros organismos entéricos. En tal caso

se requiere tratamiento adicional contra estas bacterias.

(12)

La combinación de gentamicina o amikacina con eritromicina o rifampicina *in vitro* tienen actividad antagónica contra *R. equi*, comparándolo con cualquiera de estos medicamentos por separado, por lo tanto no se recomienda la administración de un aminoglucósido con eritromicina o rifampicina para el tratamiento de esta enfermedad. (1,12)

Otra complicación asociada con el inicio del tratamiento con eritromicina y rifampicina puede ser anorexia parcial, cólico moderado y bruxismo, como ocurre con las úlceras gástricas. Estos signos normalmente desaparecen con la suspensión temporal del tratamiento (1 o 2 dosis). Durante épocas de altas temperaturas ambientales, una reacción caracterizada por hipertermia severa, taquipnea y aumento de las enzimas hepáticas y muerte se ha descrito en potros tratados con eritromicina. La administración de antipiréticos, así como mantener al potro en un ambiente fresco son suficientes para resolver este problema. También se ha observado la presentación de diarrea o enteritis por *Clostridium difficile* en las yeguas cuyo potro está siendo tratado con eritromicina, esto puede deberse a una conducta coprofágica, que lleva a la

ingestión de suficiente eritromicina activa para perturbar la flora intestinal de la yegua. ⁽¹²⁾

Otros medicamentos antimicrobianos

Existen otras alternativas para el tratamiento de la enfermedad causada por *R. equi*. La administración de sulfonamidas-trimetoprim a dosis altas (30 mg/kg cada 8-12 horas) resulta efectiva en potros con neumonía leve sin evidencia de abscesos pulmonares o como continuación de la terapia en animales que hayan respondido bien a otros antimicrobianos. Sin embargo, las sulfas-trimetoprim no son tan efectivas como la rifampicina y eritromicina en el tratamiento de casos severos ya que tiene poca actividad en material caseoso y contra patógenos intracelulares. ⁽¹²⁾

La enrofloxacin sola o en combinación con otros medicamentos se ha utilizado recientemente para tratar un numero limitado de potros con cultivos positivos a *R. equi* donde el tratamiento convencional no era posible por resistencia bacteriana, costos, o bien, diarrea inducida por eritromicina. A dosis de 5 mg/kg vía oral cada 24 horas, por mas de 5 semanas no se presentó ningún efecto secundario, pero unos cuantos animales que recibieron dosis ligeramente más altas presentaron efusión articular y

claudicación, que se resolvió con la suspensión del tratamiento. En modelos experimentales en potros, la administración de enrofloxacin por vía oral a dosis tan bajas como 5 mg/kg/día resultó en lesiones del cartílago articular, acompañado por claudicación y efusión articular, la severidad de estos efectos depende de la dosis. ^(12,30)

La azitromicina y claritromicina son dos macrólidos de nueva generación comúnmente usados en medicina humana. Comparados con la eritromicina, son mas estables tienen una biodisponibilidad mayor y alcanzan mayores concentraciones en células fagocíticas y tejidos. Basándose en la farmacocinética y la concentración mínima inhibitoria contra *Rhodococcus equi*, la administración de azitromicina a dosis de 10 mg/kg cada 24 horas por vía oral, o claritromicina a dosis de 7.5 mg/kg cada 12 horas pueden ser apropiadas para el tratamiento de esta enfermedad en potros, aunque se requiere de estudios adicionales para confirmar la eficacia y seguridad de estas dosificaciones en casos clínicos. ⁽¹⁰⁾

Tratamiento adicional

Es importante mantener al potro en un ambiente fresco y bien ventilado, además de adecuada nutrición e hidratación.

En animales que presentan hipoxia moderada esta indicada la terapia con oxígeno. La administración de antiinflamatorios no esteroidales es útil para reducir la fiebre y mejorar la actitud y el apetito en animales muy deprimidos y con anorexia. Estos medicamentos deben usarse con precaución ya que pueden ocasionar úlceras gastrointestinales y nefrotoxicidad, principalmente si el potro presenta hipovolemia. La nebulización puede ser de utilidad en los casos con secreción constante y tos no productiva. ^(12,30)

El uso de plasma hiperinmune es efectivo para la prevención de la enfermedad, pero deja de ser útil una vez que la enfermedad se ha establecido. Puede ser de utilidad explorar la eficacia de las citocinas (IL-2, INF γ , IL-12) en el tratamiento de neumonía por *R. equi*. ^(11,12,20)

Pronóstico

Antes de la introducción de la combinación de eritromicina-rifampicina como tratamiento de elección, el pronóstico de los casos de neumonía por *R. equi* era pobre, con mortalidades reportadas de hasta 80%. ⁽¹⁰⁾

Hasta hace poco no se tenía información del impacto de las infecciones por *R. equi* en el futuro desempeño atlético de los animales, pero varios estudios han demostrado que no hay diferencia significativa entre los caballos que se recuperan de neumonía y caballos sanos. ⁽¹²⁾

Prevención

Disminución de fuentes de infección

Se ha visto una mayor incidencia de esta enfermedad en lugares con alta densidad de población y localizados en zonas cálidas, muy polvosas y con suelos arenosos. A pesar de que el número total de *R. equi* en el ambiente puede ser similar, las granjas enzoóticas se encuentran infectadas con mas microorganismos virulentos (VapA positivos) que en las que la enfermedad no esta presente. ^(10,12)

Aunque las condiciones medioambientales son una de los principales factores que contribuyen a la adquisición de esta enfermedad es muy difícil o imposible modificarlas. Es muy importante que los potros estén en lugares bien ventilados, sin polvo y evitar establos sucios y con muchos animales. Se debe realizar rotación de pastizales para

evitar la formación de polvo y la consecuente inhalación de la bacteria. (5,12,27)

El establecimiento de prácticas reproductivas que resulten en tener la época de partos en meses fríos disminuye considerablemente la incidencia de la enfermedad ya que de este modo las fuentes de infección se minimizan durante el periodo en que los potros son más susceptibles. (12)

Diagnóstico temprano

El temprano reconocimiento de los casos de *R. equi* con aislamiento y tratamiento de los animales infectados reduce las pérdidas, previene el esparcimiento del microorganismo y limita el costo del tratamiento. (10,12)

En lugares donde la enfermedad es enzoótica se recomienda realizar un examen físico completo que incluya auscultación pulmonar semanalmente y la medición periódica de niveles de fibrinógeno para detectar la enfermedad en etapas tempranas. El leucograma es un buen indicador para detectar casos de neumonía por esta bacteria. Potros con niveles de leucocitos > 14,000 células/ μ l deben de ser sujetos a más pruebas diagnósticas, o debe darse tratamiento. Si los niveles de leucocitos son >13,000 pero

< 14,000 células/ μ l debe repetirse la prueba hasta la resolución de la leucocitosis. ⁽¹⁰⁾

Inmunización pasiva

Aunque la vacunación de las yeguas no provee protección contra *R equi* puede aumentar los niveles de anticuerpos específicos contra esta bacteria en el calostro para la transferencia pasiva de anticuerpos al potro. ⁽¹⁰⁾

Todavía no se determina la forma en que el plasma hiperinmune protege contra el microorganismo. La inmunización pasiva de los potros ha demostrado ser benéfica en la prevención de la enfermedad o en la disminución en la severidad de los casos, además de que no implica un costo elevado, pero la desventaja es que no provee protección en todas las ocasiones. La determinación del tiempo ideal de administración y la dosis mínima efectiva del plasma hiperinmune no se ha encontrado todavía. La administración del plasma hiperinmune debe realizarse antes de que se de la infección por *R. equi*, sin embargo, la administración temprana puede resultar en la disminución de los anticuerpos transferidos pasivamente a niveles no protectores en el momento que los potros son sumamente susceptibles y la carga medioambiental es alta.

La administración intravenosa de 1 litro de plasma hiperinmune durante la primera semana de edad, seguida de una segunda dosis aproximadamente a los 25 días de edad, aunque caro, es la forma de obtener mejores resultados. Si el potro esta en una región fría, o nace en meses invernales, una sola administración antes de que se eleve la temperatura ambiental es suficiente. ^(10,11,12,20)

Inmunización activa

Puede ser considerablemente mas conveniente el control de la neumonía por *R .equi* mediante la inmunización activa de las yeguas y sus potros con un antígeno protector, que la administración de grandes volúmenes de plasma. Es necesario investigar estos principios basados en un mejor entendimiento de los antígenos de importancia y el adyuvante requerido para producir las respuesta inmune con células Th1, necesarias para la protección contra la neumonía por *Rhodococcus equi*. ^(6,10,24)

FASE EXPERIMENTAL

EXPERIMENTO I

AISLAMIENTO DE ADN DE *Rhodococcus equi* A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES Y EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Introducción

Estudios epidemiológicos han revelado que cepas avirulentas de *Rhodococcus equi* están esparcidas en las heces y el medio ambiente de caballos. Los lugares en los que esta enfermedad es endémica demuestran una alta contaminación con cepas virulentas, a diferencia de los lugares en donde no se encuentra la enfermedad. Los organismos virulentos solo han podido aislarse de lesiones de potros infectados naturalmente, indicando que la infección es provocada únicamente por bacterias virulentas. Los animales enfermos excretan grandes cantidades de *R. equi* virulento en sus heces, siendo este el principal mecanismo de diseminación de la enfermedad. ^(22,27)

Esta enfermedad se considera oportunista ya que la alta susceptibilidad de los potros a este microorganismo puede deberse a una falla en la transferencia de anticuerpos maternos, inmadurez del sistema inmune o incapacidad de montar una adecuada respuesta inmune celular. ^(27,28)

Mientras que la mayoría de las bacterias en el suelo se encuentran al menos a 30 centímetros de profundidad, las mayores concentraciones de *R. equi* se han encontrado en la superficie. La bacteria también se ha aislado a partir del aire en establos, y se ha visto que el número de microorganismos aumenta en días secos y con viento. ⁽²⁷⁾

Rhodococcus equi se ha aislado de las heces de yeguas, encontrando en promedio concentraciones de 10^2 a 10^3 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de heces. En potros de 1 a 8 semanas de edad la cantidad promedio de *R. equi* en las heces es de 10^4 a 10^5 bacterias por gramo, esta cantidad empieza a decaer después de las 10 semanas de edad hasta llegar a los mismos niveles que las yeguas. Los potros que presentan neumonía por *R. equi* excretan una mayor cantidad de microorganismos, entre 10^6 y 10^8 UFC/gramo de heces. La excreción de tal cantidad de bacteria sin duda juega un papel importante en la contaminación y expansión de las fuentes de infección. Los estudios realizados son solo cuantitativos debido a que no se puede diferenciar

entre cepas de *R. equi* virulentas y no virulentas, por lo que se requiere de la determinación más exacta de la fuente de bacterias virulentas. ⁽²⁷⁾

Se ha propuesto que la incidencia de la infección por *R. equi* depende de la magnitud de contaminación en el ambiente. La dosis mínima infectante de *R. equi* virulento para potros es aproximadamente 10^4 UFC. ⁽²⁷⁾

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha utilizado para detectar *R. equi* a partir de muestras clínicas de potros enfermos. El PCR es más rápido y sensible que el cultivo microbiológico, además de ser altamente específico ya que se pueden detectar microorganismos por debajo de los niveles alcanzados con el cultivo bacteriano y los resultados están disponibles en unas cuantas horas, además de que la administración de antibióticos no interfiere con el resultado. ⁽³⁾

Con este estudio se trató de estimar la sensibilidad del PCR en la detección de *R. equi* virulento a partir de muestras de heces para confirmar el hecho de que una de las principales fuentes de infección de la enfermedad son las heces de las madres de los potros.

Material y métodos

Cepas bacterianas y muestras fecales

Se utilizó la cepa ATCC (American Tissue Culture Collection) 33701+ de *Rhodococcus equi* para la siembra en muestras fecales y como control positivo en el PCR. Esta cepa se caracteriza por poseer el plásmido que codifica para la proteína asociada a virulencia A(VapA). Como controles negativos se utilizaron las cepas ATCC 33703 de *Rhodococcus equi* aislada a partir de una muestra clínica de un cerdo y la cepa ATCC 33701- de *R. equi*, que no carece del plásmido de virulencia. ^(17,29)

Las muestras de heces fueron obtenidas de caballos adultos sanos. No fue posible descartar que estas muestras estuvieran libres de *R. equi* debido a la dificultad para aislar un solo agente bacteriano a partir de una muestra de heces. Previo a su procesamiento, las muestras se conservaron en refrigeración a 4°C.

Se recolectó una muestra de heces de un potro positivo a *R. equi* y de la madre de este potro y ambas se sometieron al mismo análisis que las muestras sembradas en el laboratorio.

Prueba de sensibilidad del PCR

Para estimar la sensibilidad del PCR las muestras de heces fueron sembradas con diluciones de la cepa ATCC 33701+ de *Rhodococcus equi* en solución salina buferada (SSB) en el rango de 10^0 a 10^8 UFC/ml. Un volumen de 500 μ l de cada dilución se adicionó a 1 gramo de heces disuelto en 45ml de SSB, se agitaron para mezclar los componentes y se dejaron reposar para permitir la sedimentación, el sobrenadante se transfirió a tubos limpios y se centrifugó a 2,400 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet restante se utilizó para el aislamiento del ADN utilizando una versión modificada de la técnica de Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamilico (PCI). ^(14,15,17)

Amplificación con PCR

Las secuencias de los iniciadores utilizados en el PCR son las siguientes: iniciador adelante 5'AGTGCGATTCTCAATAGTGCGG e iniciador reversa 5'GTGAACGTCGTACTIONGCTGCTCTT. Estos iniciadores amplifican una secuencia del plásmido que codifica para VapA, lo que permite la detección de cepas virulentas. El producto amplificado es de aproximadamente

150 bp identificable como una banda en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, mediante el uso de un transiluminador ultravioleta. ⁽³⁾

Resultados

Mediante el uso del PCR se pudieron detectar cantidades tan bajas como 10 UFC de *R. equi* por gramo de heces. Este número es solo una aproximación debido a que no se sabe el contenido bacteriano inicial en la muestra debido a la dificultad para aislar cualquier microorganismo mediante cultivo microbiológico a partir de una muestra de heces (Figuras 4 y 5).

La muestra de heces del potro positivo a *Rhodococcus equi* en el cultivo del aspirado traqueobronquial también resulto positiva al PCR, así como la muestra de las heces de la madre de este potro (Figura 6).

Al tratar de amplificar el ADN de otras cepas de *R. equi* las cuales no contienen el plásmido que codifica VapA, así como una especie de *Nocardia* no se pudo detectar banda alguna, lo que indica que los iniciadores utilizados solo son capaces de amplificar el ADN del plásmido presente en las cepas virulentas de *R. equi* (Figura 7).

En este ensayo se trató principalmente de estandarizar los parámetros del PCR y la técnica de aislamiento de ADN a partir de muestras fecales por lo que se requiere el posterior procesamiento de muestras clínicas con estos métodos para confirmar el valor diagnóstico y la sensibilidad de dichos procedimientos.

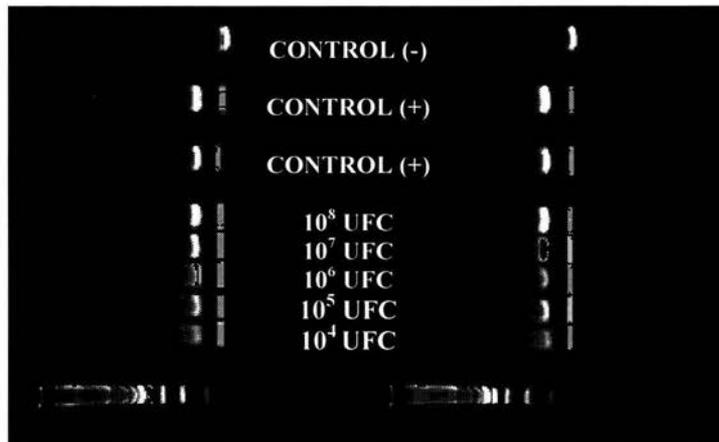


Figura 4. Fotografía de los productos amplificados del PCR. Muestras de heces sembradas con 10⁴ -10⁸ UFC/ml de *R. equi* cepa ATCC 33701+. Control positivo ADN cepa ATCC 33701+. Control negativo sin ADN.



Figura 5. Fotografía de los productos amplificados del PCR. Muestras de heces sembradas con 10-10 UFC/ml de *R. equi* cepa ATCC 33701+ y muestra de heces sin sembrar *R. equi*. Muestras de heces de un potro positivo a *R. equi* y heces de la madre del potro. Control positivo ADN cepa ATCC 33701+. Control negativo sin ADN.

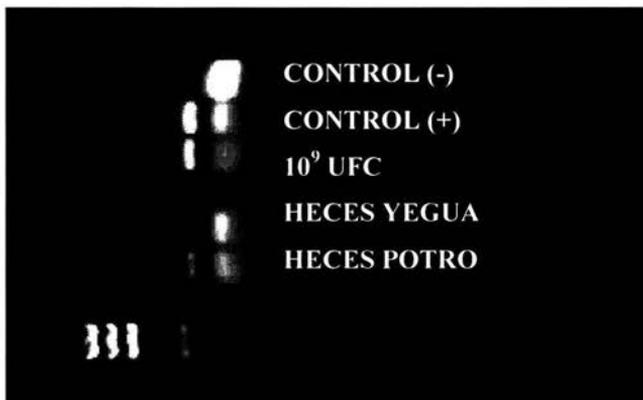


Figura 6. Fotografía de los productos amplificados del PCR. Muestras de heces de un potro positivo a *R. equi* y heces de la madre del potro. Control positivo ADN cepa ATCC 33701+. Control negativo sin ADN.

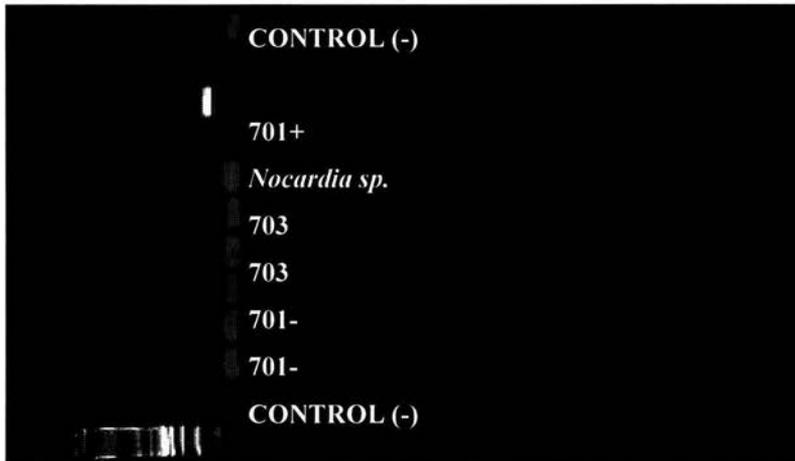


Figura 7. Fotografía de los productos amplificados del PCR. Cepas sin plásmido ATCC 33701- y 33703. Control positivo ADN cepa ATCC 33701+. Control negativo sin ADN.

Discusión

El momento exacto en el que los potros se infectan con *R. equi* se desconoce. Conocer cuando se da la infección y la fuente de la bacteria es importante para permitir el establecimiento óptimo de medidas profilácticas y para facilitar el diagnóstico y el tratamiento oportuno. ^(5,22)

Hasta ahora no se han descrito infecciones *in utero* y el único evento común en todos los potros con esta enfermedad es el nacimiento, por lo tanto se considera que el periodo inmediato al nacimiento es cuando ocurre la infección, facilitado por una falla en el sistema inmune. Se conoce que los potros en lugares endémicos ya han estado

expuestos al microorganismo al tercer día de edad y que animales de menos de dos semanas de edad son mas susceptibles a la enfermedad. Estos hallazgos corroboran la hipótesis de que la infección por *R. equi* se da de manera muy temprana en la vida de un potro y que la bacteria esta presente en su ambiente, incluyendo las heces de sus madres. (5,22,27)

Las muestras de heces son uno de los especimenes mas complejos para la realización de PCR debido a la presencia de inhibidores de PCR que normalmente se extraen junto con el ADN bacteriano. Los inhibidores potenciales para el PCR encontrados en las heces incluyen heme, bilirrubinas, sales biliares y carbohidratos complejos. La falta de uniformidad de las muestras fecales en términos de materia física, organismos blanco y flora asociada hacen la extracción de ADN muy variable de espécimen a espécimen en términos de pureza y cantidad de ADN. La obtención de resultados falsos-negativos en el PCR puede deberse a la presencia de un pequeño numero de organismos blanco en el volumen de heces muestreado, a la disminución de la estabilidad de las células con el almacenamiento, así como a la presencia de los inhibidores antes mencionados. Es importante trabajar en la identificación de este tipo de sustancias y desarrollar métodos para removerlas. También es necesario

optimizar el proceso de extracción para obtener mayor cantidad de ADN bacteriano y reducir la presencia de ADN competitivo de la microflora coexistente. Se han tratado de caracterizar los inhibidores utilizando procesos de eliminación, pero los resultados son muy variados debido a que los inhibidores no están presentes en todas las muestras en la misma concentración. (7,14,15,21,31)

Mediante la aplicación de nuevas técnicas como es el PCR cuantitativo en tiempo real (qr-PCR), el cual hace posible cuantificar la cantidad de ácido nucleico en una muestra mediante el uso de marcadores fluorescentes, será posible determinar la cantidad exacta de bacterias como *R. equi* en muestras de heces y utilizarlo en el diagnóstico y monitoreo del tratamiento de la enfermedad. (26)

Gracias a este estudio obtuvimos evidencia de que la bacteria virulenta se encuentra presente en las heces de las yeguas y esto puede ser una de las principales rutas de infección, a diferencia del microorganismo aislado a partir del suelo que no posee el plásmido de virulencia. No se pudo estimar la cantidad exacta de bacterias en las heces de la yegua, pero la banda identificada en el gel de agarosa tiene similitud a la banda que se obtiene después de agregar aproximadamente 10 UFC a un gramo de heces, por

lo que se puede suponer que una cantidad similar de bacterias es lo que se encuentra en la muestra (Figura 6).

El mantener a los animales susceptibles alejados del excremento de sus madres puede ser un manejo clave en la disminución de la presentación de la enfermedad causada por *Rhodococcus equi* y el uso del PCR puede ser establecido como herramienta diagnóstica, descartando de este modo el uso de otros procedimientos invasivos que ponen en peligro la vida del animal, son más tardados y menos específicos y sensibles.

EXPERIMENTO II

PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR

Rhodococcus equi CON MALTOLATO DE GALIO

Introducción

Actualmente no existen vacunas efectiva contra *R. equi*, el único método que ha probado ser parcialmente efectivo en la prevención de la enfermedad es la transfusión de plasma hiperinmune. Debido a que las medidas preventivas son difíciles de establecer, la terapia antimicrobiana es esencial en el manejo de estas infecciones. Aunque el tratamiento temprano y específico es exitoso, en la mayoría de los casos los antibióticos más efectivos y más utilizados (eritromicina y rifampicina) están asociados con efectos adversos potencialmente fatales. Además, cada vez se encuentran mas cepas de *R. equi* resistentes a estos medicamentos. ^(6,30)

El Galio (Ga) es un semimetal que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de hipercalcemia en humanos. El Ga también ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de linfomas, cáncer de próstata, mieloma múltiple y otros

tipos de cáncer, y ha mostrado eficacia *in vivo* e *in vitro* contra infecciones por micobacterias. (7,23)

En medicina humana, el radioisótopo de Ga es comúnmente utilizado como medio de contraste para la localización y diagnóstico de neoplasias malignas e infecciones, debido a que se concentra en zonas de inflamación, donde hay proliferación de tejido y en bacterias. La acumulación de Ga en estos sitios se atribuye a la similitud química entre el Ga^{3+} y el Hierro (Fe^{3+}). En el suero sanguíneo en equilibrio, el Ga es capaz de ocupar los receptores para Fe en la proteína transportadora conocida como transferrina. Las células cancerosas en proliferación tienen altos requerimientos de Fe, debido a que requieren a la enzima ferrica ribonucleótido-reductasa para la síntesis de ADN, y expresan gran cantidad de receptores para Fe para satisfacer este requerimiento. Estas células utilizan el Ga unido a la transferrina, el Ga compite con el Fe y puede ser incorporado a la ribonucleótido-reductasa, lo que vuelve a la enzima no funcional. La competencia con el Fe puede inhibir la síntesis de ADN, la división celular y puede causar apoptosis en células cancerosas, sin embargo, el Ga no es capaz de unirse a proteínas que normalmente contienen Fe^{2+} , como la hemoglobina y los citocromos, por lo

que no puede ingresar a los glóbulos rojos e interferir con los mecanismos de transporte de oxígeno. (4,7,19)

De forma similar, los macrófagos infectados con micobacterias toman el Ga de la transferrina, y la micobacteria lo utiliza en lugar del Fe, inhibiendo de esta manera la síntesis de ADN y ocasionando la subsiguiente muerte de la bacteria y el macrófago infectado. (2,23)

En sitios de inflamación, una proteína transportadora de Fe similar a la transferrina, la lactoferrina, es secretada, esta también tiene afinidad por el Ga. (4)

Con base en las actividades conocidas del galio, es razonable pensar que el Ga es capaz de concentrarse en las lesiones piogranulomatosas en los pulmones asociadas a la neumonía por *R. equi*, y que puede ser utilizado por los macrófagos infectados y por la bacteria infectante. Estudios recientes han demostrado la importancia del Fe para la supervivencia de *Rhodococcus equi*, y que la transferrina y la lactoferrina son fuentes de Fe para la bacteria. Cantidades insuficientes de Fe disponible resultan en la inactividad de enzimas dependientes de Fe indispensables para la bacteria. (2,17)

Algunas estrategias profilácticas y terapéuticas diseñadas con base en la dependencia de Fe de los organismos patógenos y la interferencia para su adquisición

han probado ser efectivas en el manejo de varias enfermedades infecciosas. Parece ser que el Ga, un inhibidor competitivo de la actividad del Fe en sistemas enzimáticos metabólicos y reproductivos, tiene un gran potencial para el control de la enfermedad causada por *R. equi* en potros. Como se menciona anteriormente, el Ga es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias intracelulares como *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales están altamente relacionadas con *R. equi*, mediante la interrupción del metabolismo del Fe en la bacteria. En adición a esto, un estudio reciente ha demostrado la habilidad del Nitrato de Ga de inhibir el crecimiento de *R. equi in vitro* por la interferencia con el metabolismo del Fe. (2,9,17)

Recientemente el maltolato de Galio (GaM) ha probado tener alta biodisponibilidad después de la administración oral. La administración oral del GaM no se asocia con toxicidad renal, como ocurre con la administración intravenosa del nitrato de Galio y tampoco causa irritación gástrica, como la ocasionada por la administración oral de nitrato de Galio o cloruro de Galio. Además, el GaM oral se une en mayor proporción a la transferrina del plasma que el nitrato de Ga intravenoso. Por lo tanto, por su seguridad y

eficacia, se prefiere el GaM para la administración sistémica. (4,18,19,25)

El propósito de esta investigación fue evaluar la capacidad del maltolato de Galio de disminuir la concentración de *R. equi* en los tejidos de ratones infectados experimentalmente.

Material y métodos

Dieciocho ratones BALB/c se dividieron en 3 grupos de 6 animales cada uno. Al **Grupo 1** (control) se le administró 0.3 ml de agua desionizada por vía oral (PO) cada 24 horas durante 9 días. Al **Grupo 2** (dosis baja de GaM) se le administró 10 mg/kg de peso de GaM en 0.3 ml de agua desionizada PO cada 24 horas durante 9 días. Al **Grupo 3** (dosis alta de GaM) se le administró 50 mg/kg de peso de GaM en 0.3 ml de agua desionizada PO cada 24 horas durante 9 días. Todos los animales estuvieron sujetos a alimentación *ad libitum* (alimento para roedores no suplementado con Fe con un contenido aproximado de 600 ppm de Fe). Al tercer día de iniciado el tratamiento con GaM todos los animales se infectaron con aproximadamente 2×10^4 *R. equi* por mililitro por vía intraperitoneal (IP), la cepa utilizada fue la ATCC 33701+. Las bacterias fueron

cultivadas en caldo de infusión cerebro-corazón a 37°C por 48 horas y luego lavadas y resuspendidas en solución salina (SSB). Todos los animales fueron sacrificados de manera humanitaria después de 9 días de tratamiento una hora después de haber recibido la última dosis de GaM. Se colectaron los pulmones, el hígado y el bazo de cada uno de los ratones para determinar la concentración de *R. equi* por gramo de tejido. Cada uno de los órganos se colocó en una caja de petri estéril para registrar el peso del órgano, después se transfirieron a tubos de vidrio estériles que contenían 2 ml de SSB para homogeneizar cada órgano. Se realizaron diluciones seriadas del homogeneizado de cada órgano en SSB estéril y se sembraron y cultivaron en agar sangre a 37°C por 48 horas. Los resultados fueron expresados en el valor de log 10 *R. equi* por 1 gramo de tejido. ⁽²⁹⁾

Resultados

Los dos grupos de ratones bajo tratamiento con maltolato de Ga presentaron un menor número de unidades formadoras de colonia por gramo de tejido en los órganos examinados comparado con los ratones del grupo control, como puede apreciarse en los Cuadros 1 y 2.

El grupo que recibió una dosis de 10 mg/kg de Maltolato de Ga fue el que presentó la menor cantidad de *Rhodococcus equi* en los tres órganos en los que se cuantificó la cantidad de bacterias, los promedios de UFC/ gramo de tejido se presentan en el cuadro 2 y se puede apreciar la diferencia entre los grupos en la Figura 8.

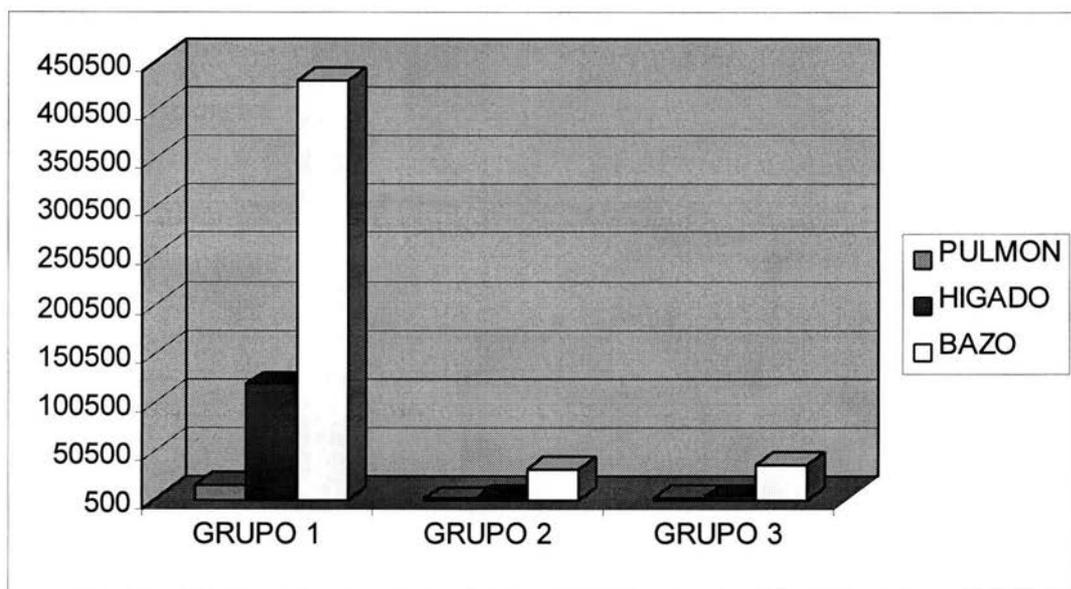
Cuadro 1. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA DE *Rhodococcus equi* POR GRAMO DE TEJIDO EXAMINADO

GRUPO	ID RATON	DOSIS GaM	PULMON	HIGADO	BAZO
1	1	na	76,100	609,000	2,040,000
1	2	na	866	3,330	13,600
1	3	na	14,000	91,300	460,000
1	4	na	531	1,598	51,600
1	5	na	0	3,820	9,500
1	6	na	3,600	396	14,300
PROMEDIO			15,850	118,241	431,500
2	1	10mg/kg	2,940	1,970	1,470
2	2	10mg/kg	303	268	6,240
2	3	10mg/kg	238	1,989	22,800
2	4	10mg/kg	1,260	6,090	140,000
2	5	10mg/kg	0	2,180	14,500
2	6	10mg/kg	0	0	0
PROMEDIO			790	2,083	30,835
3	1	50mg/kg	916	430	14,100
3	2	50mg/kg	2,410	3,630	82,600
3	3	50mg/kg	1,400	6,290	43,200
3	4	50mg/kg	897	3,130	67,100
3	5	50mg/kg	0	2,200	1,110
3	6	50mg/kg	0	2,530	3,370
PROMEDIO			937	3,035	35,247

Cuadro 2. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA DE *Rhodococcus equi* POR GRAMO DE TEJIDO EXAMINADO. PROMEDIOS DE CADA GRUPO

GRUPO	1	2	3
Pulmón	15,850	790	937
Hígado	118,241	2,083	3,035
Bazo	431,500	30,835	35,247

Figura 8. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA DE *Rhodococcus equi* POR GRAMO DE TEJIDO



Discusión

Para sobrevivir dentro de los macrófagos, *R. equi* es capaz de adaptarse a un ambiente intracelular que posee un potente carga de defensas antimicrobianas. Uno de estos mecanismos de defensa es la limitación de Fe disponible. La disponibilidad y adquisición de Fe es crucial para la sobrevivencia y crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas. La virulencia de algunos microorganismos se ve marcadamente incrementada cuando existe una mayor cantidad de Fe disponible. A pesar de la abundancia de Fe en los fluidos corporales del hospedador, la concentración de Fe libre es muy baja como resultado de la unión a proteínas transportadoras. La bacterias patógenas frecuentemente toman este ambiente bajo en Fe como una señal para inducir, o bien, no reprimir varios factores de virulencia como son quelantes de Fe de alta afinidad como los sideróforos y proteínas asociadas a la membrana para transporte de Fe, así como toxinas reguladas por Fe. ^(4,17)

Se ha investigado el crecimiento *in vitro* de *R. equi* así como la expresión de proteínas de la bacteria en respuesta a variaciones en la disponibilidad de Fe, y se ha podido concluir que el Fe es esencial para la supervivencia

y crecimiento de la bacteria y que las fuentes de Fe para y los mecanismos de adquisición de este elemento *in vivo* influyen en la presentación de factores de virulencia. En el caso en *R. equi*, la expresión de VapA esta regulada por la cantidad de Fe disponible. La importancia de estos descubrimientos es el hecho de poder desarrollar nuevas terapias y estrategias inmunoproliféricas para el control de la infección por *R. equi*.^(2,17)

Debido a que el Ga es un inhibidor competitivo de la actividad del Fe en los sistemas enzimáticos y a sus efectos antimicrobianos, mediante este experimento se trató de determinar si la infección experimental de *R. equi* puede ser controlada o disminuida con la administración de maltolato de Ga.⁽⁴⁾

Los resultados de este experimento demostraron que si hay una diferencia en la infección por *R. equi* en los animales no tratados con maltolato de Ga, teniendo mayor cantidad de UFC por gramo de tejido en los órganos examinados (pulmón, hígado y bazo) en comparación con los ratones a los que se les administró maltolato de Ga. En este caso se probaron dos dosis de maltolato de Ga, dando mejor resultado la dosis de 10 mg/kg. Los ratones que recibieron una dosis de 50 mg/kg de maltolato de Ga presentaron mayor cantidad de UFC de *R. equi* por gramo de

tejido en los tres órganos que los que recibieron 10 mg/kg posiblemente por la saturación de receptores en las proteínas transportadoras.

Debido al constante aumento de la resistencia bacteriana inducida por la administración de antibióticos, así como el potencial de los antibióticos de inducir daño intestinal y problemas de malabsorción al administrarse por vía oral es apropiado buscar opciones de tratamiento alternativas a los antimicrobianos comúnmente utilizados que como en este caso, provean sinergismo con los sistemas de defensa endógenos del hospedador como es la privación de Fe para las bacterias patógenas.

El maltolato de Ga también puede utilizarse como profilaxis contra este tipo de infecciones, debido a que no hay vacuna efectiva existente y los resultados de otros procedimientos, como la administración de suero hiperinmune no ha sido concluyente en la demostración de niveles adecuados de protección contra el microorganismo, además de ser una opción para disminuir los costos de prevención y tratamiento de esta enfermedad.

Es necesaria la realización de más estudios para determinar biodisponibilidad, niveles terapéuticos y concentración mínima inhibitoria del maltolato de Ga para determinar la dosis adecuada de maltolato de Ga para la

posterior extrapolación de la terapia a los potros; así como la creación de una pasta para la administración oral de este compuesto a los potros que se sospeche son más susceptibles a la enfermedad, para tratar de prevenir la infección por *R. equi*, o bien administrarla a los potros infectados para disminuir la concentración de microorganismos en los tejidos y de este modo reducir la cantidad y el tiempo de administración de los antibióticos utilizados.

Referencias

- 1) **Adams R. H.** Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State University Press/AMESS. 8th. ed. Iowa. 2001.
- 2) **Andrews S.C, Robinson A.K, Rodríguez-Quñones F.** Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiology Reviews. 2003;27:215-237.
- 3) **Arriaga J.M, Cohen N.D, Derr. J.N, Chaffin M.K, Martens R.J.** Detection of *Rhodococcus equi* by polymerase chain reaction using species-specific nonproprietary primers. J. Vet. Diagn. Invest. 2002;14:347-353
- 4) **Bernstein L.R, Tanner T, Godfrey C, Noll B.** Chemistry and pharmacokinetics of gallium maltolate, a compound with high oral Gallium bioavailability. Metal-based Drugs. J. Clin. Microbiol. 200;7:33-47.
- 5) **Cohen N.D., Horowitz M.L., Takai S. Becu T., Chaffin M. K., Magdesian G. Chu K. K., Martens R.J.** Evidence that foals with *Rhodococcus equi* pneumonia become infected early in life. AAEP Proceedings 2001;47:400-405.
- 6) **Colhan P.T, Mayhew I.G, Merrit A.M, Moore J.N.** Equine Medicine and Surgery Vol I. Mosby. 5th. ed. St.Louis. 1999.

- 7) **Collery P, Keppler B, Madoulet C, Desoize B.** Gallium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002;42:283-296.
- 8) **Emery T.** Exchange of iron by gallium in siderophores. *Biochemistry*. 1986;25:4629-4633.
- 9) **Fettman M.J, Brooks P.A, Robert L.J, Mero K. N, Phillips R.W.** Antimicrobial alternatives for calf diarrhea: Enteric responses to *Escherichia coli*, deferoxamine, or gallium in neonatal calves. *Am.J.Vet.Res.* 1987;48:596-577.
- 10) **Giguere S.** *Rhodococcus equi* pneumonia. *AAEP. Proceedings* 2001;47:456-467.
- 11) **Giguere S. Gaskin J.M, Miller C, Bowman J.L.** Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *JAVMA*. 2002;220:59-63.
- 12) **Giguere S., Prescott J.F.** Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet. Microbiol.* 1997;56:313-334.
- 13) **Goodfellow M.** The Taxonomic status of *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.* 1987;14:205-209.
- 14) **Gumerlock P.H, Tang Y.J, Meyers F.J, Silva J.** Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct

detection of *Clostridium difficile* in human feces.
R.I.D.1991;13:1053-1060.

15) **Holland J.L, Louie L, Simor A.E, Louie M.** PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7 directly from stools: Evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:4108-4113.

16) **Jain S, Bloom B.R, Hondalus M.K.** Deletion of *vapA* encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Molecular Microbiology.* 2003;50:115-128.

17) **Jordan M.C, Harrington J.R, Cohen N.D, Tsolis R.M, Dangott L.J, Weinberg E.D, Martens R.J.** Effects of iron modulation on growth and viability of *Rhodococcus equi* and expression of virulence-associated protein A. *Am.J.Vet.Res.* 2003;64:1337-1346.

18) **Kelsen D.P, Alcock N, Yeh S, Brown J, Young C.** Pharmacokinetics of gallium nitrate in man. *Cancer.* 1980;46:2009-2013.

19) **Krakoff I.H, Newman R.A, Goldberg R.S.** Clinical toxicologic and pharmacologic studies of gallium nitrate. *Cancer.* 1979;44:1722-1727.

20) **Martens R.J, Martens J.G, Fiske R.A.** *Rhodococcus equi* foal pneumonia: Protective effects of immune plasma in

experimentally infected foals. Equine Vet. J.1989;21:249-255.

21)Monteiro L., Bonnemaision D., Verkis A., Petry K.G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J., Megraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. J. Clin. Microbiol. 1997;35:995-998.

22)Morton A.C, begg A.P, Anderson G.A, Takai S, Lammler C, Browning G.F. Epidemiology of *Rhodococcus equi* strains on throughbred horse farms. Appl.Environ. Microbiol.2001;67:2167-2175.

23)Olakanmi O, Britigan B.E, Schlesinger L.S. Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages. Infect Immun. 2000;68:561-627.

24)Pasquini C, Pasquini S, Woods P. Guide to Equine Clinics. Vol. I. Sudz Publishing. 3rd. ed. Texas.1998.

25)Prescott J.F, Lastra M, Barksdale L. *Equi* Factors in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. J. Clin. Microbiol. 1982;16:988-990.

26)Provenzano M, Rossi R.C, Mocellin S. The usefulness of quantitative real-time PCR in immunogenetics. ASHI.Third quarter 2001:89-91.

- 27) **Takai S.** Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. *Vet. Microbiol.* 1997;56:167-176.
- 28) **Takai S, Chaffin M. K, Cohen N.D, Hara M, Nakamura M, Kakuda T, Sasaki Y, Tsubaki S, Martens R.J.** Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi*-endemic horse breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001;13:489-494.
- 29) **Takai S., Sasaki Y., Tsubaki S.** Influence of inoculation route on virulence of *Rhodococcus equi* in mice. *Microbiol. Immunol.* 1992;36:895-898.
- 30) **Tizard I.R.** *Inmunología Veterinaria.* Mc.Graw-Hill Interamericana. 5a. ed. México.1996.
- 31) **Wilde J, Eiden J, Yolken R.** Removal of inhibitory substances from human fecal Specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J.Clin Microbiol.*1990;28:1300-1307.