

TESIS DE MÁSTER

“Estudio de la diversidad genotípica y del efecto del antibiótico azitromicina en la infección por el patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* no tipificable”

Lucía Caballero Coronado

Curso 2013-14

Directora: Dra. Juncal Garmendia García

Quiero agradecer al Dr. José Leiva y Sra. Carmen Losa por aportarme el material microbiológico usado en parte de este trabajo. A todas las personas que me han ayudado y enseñado, sobre todo a mi directora de tesis de Máster , Juncal Garmendia y todos los miembros del grupo del laboratorio.

A mi familia y amigos por su apoyo.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Características generales y clasificación de <i>Haemophilus influenzae</i>	8
1.2. Características generales de <i>H. influenzae</i> no tipificable e infección asociada a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	9
1.3. Variabilidad genómica de <i>H. influenzae</i> no tipificable	11
1.4. Variabilidad extracromosómica de <i>H. influenzae</i> no tipificable	12
1.5. Características generales de la infección por <i>H. influenzae</i> no tipificable	13
1.5.1. Infección de epitelio respiratorio por HiNT	13
1.5.2. Infección de macrófagos alveolares por HiNT	13
1.6. Tratamiento de agudizaciones de EPOC mediante administración del antibiótico macrólido azitromicina	14
2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivos	18
3.2. Extracción y restricción de ADN para electroforesis en campo pulsado	20
3.3. Electroforesis en campo pulsado	21
3.4. Extracción de ADN y Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	21
3.5. Mantenimiento de líneas celulares e infección de células en cultivo por HiNT	23
3.5.1. Mantenimiento de líneas celulares	23
3.5.2. Infección por HiNT	24
3.5.3. Tinción y microscopia de inmunofluorescencia	26
4. RESULTADOS	28
4.1. Genotipado mediante electroforesis en campo pulsado de una colección de cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes EPOC	28
4.2. Análisis de la presencia del gen <i>rob-1</i> en cepas de HiNT aisladas de pacientes EPOC .	30
4.3. Efecto del antibiótico macrólido azitromicina en la infección de células epiteliales y macrófagos alveolares por HiNT	32
6. CONCLUSIONES	42
7. BIBLIOGRAFÍA	43
8. ANEXO	46

ÍNDICE DE FIGURAS:

Fig. 1: “Hipótesis del círculo vicioso” en la progresión de la EPOC.

Fig. 2: Distribución de electrodos en el equipo de PFGE.

Fig. 3: Esquema del plásmido pB1000.

Fig. 4: Procesamiento de células en cultivo infectadas con HiNT375 y HiNT353.

Fig. 5: Electroforesis en campo pulsando.

Fig. 6: Comprobación de la correcta extracción de ADN genómico para ser empleado como molde en reacciones de PCR.

Fig. 7: Amplificación del gen *rob-1* en los aislados de HiNT de los pacientes 2, 6, 10 y 12.

Fig. 8: Porcentaje de co-localización HiNT:compartimento subcelular temprano (EEA-1) o tardío (LAMP-1).

Fig. 9: Cambios morfológicos de los compartimentos subcelulares por adicción de azitromicina.

Fig. 10: Infección de células A549 con HiNT375.

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Características generales de los aislados de HiNT de 13 pacientes EPOC.

Tabla 2: Susceptibilidad a antibióticos de las cepas de HiNT procedentes de los 13 pacientes EPOC en estudio.

Tabla 3: Cebadores usados en este trabajo.

Tabla 4: Anticuerpos primarios usados en este trabajo.

Tabla 5: Porcentajes de co-localización de HiNT375 con compartimentos subcelulares con características de endosoma temprano (EEA-1) y tardío (LAMP-1) en células A549.

Tabla 6: Porcentaje de co-localización de HiNT353 con compartimentos subcelulares con características de endosoma temprano (EEA-1) y tardío (LAMP-1) en células A549.

Tabla 7: Porcentajes de co-localización de HiNT375 con compartimentos subcelulares con características de endosoma tardío (LAMP-1) en macrófagos alveolares MH-S.

Tabla A1: Experimentos realizados (listado completo) y seleccionados (indicados en naranja) para la cuantificación de co-localizaciones HiNT:compartimento subcelular en células A549 y macrófagos alveolares MH.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Amoxicilina
AMC	Amoxicilina ácido clavulánico
BHI	Infusión de cerebro y corazón (del inglés, <i>brain heart infusion</i>)
β-NAD	β-nicotinamida adenin dinucleótido
βlac	β-lactamasa
°C	Grado celsius
CLA	Claritromicina
CLR	Cloranfenicol
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CRO	Ceftriaxona
Cy2	Cianina
dNTP	Dinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DOX	Doxiciclina
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EEA-1	del inglés, <i>early endosome antigen 1</i>
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
h	Horas
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2'-etanolsulfónico
Hi	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> serotipo b
HiNT	<i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable
IgA	Inmunoglobulina A
Kb	kilobase
LAMP	del inglés, <i>lysosomal associated membrane protein</i>
LEV	Levofloxacino
min	Minutos

MEM	Meropenem
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
pb	Par de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salino (del inglés, <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PFGE	Electroforesis en campo pulsado (del inglés, <i>pulsed fiel gel electrophoresis</i>)
PI3K	Fosfoinositol 3-kinasa
PRR	del inglés, <i>pattern recognition receptors</i>
RIF	Rifampicina
ROX	Cefuroxina
RRX	Rodamina-RedX
s	Segundos
SBF	Suero bovino fetal
sBHI	Infusión de cerebro y corazón suplementada con hemina y β-NAD
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TBE	del inglés, <i>tris borate EDTA</i>
TBS	Tris tampón salino
TE	Tampón tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	del inglés, <i>tripticase soy broth</i>

RESUMEN

Haemophilus influenzae no tipificable (HiNT) es una bacteria Gram negativa que forma parte de la microbiota nasofaríngea humana y un patógeno oportunista. En pacientes con patologías como la Enfermedad Obstructiva Pulmonar Crónica (EPOC), HiNT coloniza de forma persistente las vías respiratorias bajas, causando infecciones crónicas. Los pacientes EPOC sufren periodos de agudización de la enfermedad, en los cuales se puede aislar HiNT a partir de muestras respiratorias como el esputo.

En este trabajo, hemos determinado la variabilidad genética de cepas clínicas de HiNT aisladas de esputos de pacientes EPOC durante periodos de agudización de la enfermedad. La tipificación de las cepas recogidas se ha realizado mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). De esta forma, se ha determinado si la infección se ha producido por una o varias cepas en un total de 13 pacientes.

Además, HiNT puede adquirir un plásmido portador del gen *rob-1*, que proporciona resistencia a antibióticos β -lactámicos. En este trabajo hemos analizado la presencia del gen *rob-1* en cepas de HiNT procedentes de pacientes EPOC.

Por último, la azitromicina es un antibiótico macrólido administrado a pacientes EPOC para prevenir o tratar las exacerbaciones. Hemos determinado el efecto de la azitromicina durante la infección de células epiteliales y macrófagos alveolares por las cepas HiNT375 y HiNT353, que presentan distinto nivel de susceptibilidad a azitromicina.

ABSTRACT

Nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a Gram-negative bacterium part of the human respiratory microbiota, and an opportunistic pathogen. In Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) patients, NTHi colonizes the lower airways causing chronic respiratory infection. COPD patients suffer exacerbation episodes. NTHi can be isolated from respiratory samples such as sputum during COPD exacerbation.

In this study, we determined the genetic variability of NTHi clinical strains isolated from sputum samples of COPD patients during exacerbation. Strain genotyping was carried out by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE). We then determined the number of non-clonal strains associated to respiratory infection suffered by 13 COPD patients.

Moreover, NTHi clinical strains can contain a natural plasmid carrying the β -lactamase encoding gene *rob-1*. In this work, we analyzed the absence/presence of *rob-1* in our collection of NTHi strains isolated from COPD patients.

Finally, azithromycin is a macrolide antibiotic often administered to COPD patients, to prevent or treat exacerbation. We determined the effect of azithromycin on epithelial and alveolar macrophage

infection by the clinical strains NTHi375 and NTHi353, presenting different susceptibility to azithromycin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales y clasificación de *Haemophilus influenzae*

H. influenzae (Hi) es un patógeno oportunista humano que coloniza de forma asintomática la nasofaringe de la mayor parte de la población sana, formando parte de la microbiota normal. En determinadas circunstancias (edad temprana, inmunodepresión, etc.), Hi provoca infección sintomática (16).

Hi es una bacteria Gram negativa, pleomórfica, anaerobia facultativa, no flagelada y con forma de cocobacilo. Para su cultivo, requiere los factores de crecimiento X (hemina) y V (β -nicotinamida, β -NAD) (2, 15). En el laboratorio, *H. influenzae* crece en placas de agar-chocolate y de infusión de cerebro y corazón-agar (*brain heart infusion*, BHI) suplementadas con hemina y β -NAD (sBHI-agar). Asimismo, su crecimiento se ve favorecido por la presencia de 5% CO₂, 37°C y pH alcalino.

Los aislados de *H. influenzae* se clasifican en función de la presencia o ausencia de una cápsula polisacáridica en su superficie. La detección de la cápsula se realiza mediante ensayos de aglutinación con anticuerpos específicos. Las cepas capsuladas o tipificables se clasifican en seis serotipos capsulares denominados a, b, c, d, e y f, en función de su antígeno capsular (2, 6, 15). La cápsula polisacáridica es un factor de virulencia que media la infección y confiere a *H. influenzae* la capacidad de producir infecciones invasivas graves.

En concreto, *H. influenzae* serotipo b (Hib) causa infecciones invasivas en niños, meningitis, epiglotitis, artritis, celulitis y neumonía aguda (9). El desarrollo y aplicación de una vacuna conjugada específica frente a Hib, que contiene polisacárido capsular purificado, toxoide tetánico, y tiene como excipientes lactosa, ClNa y agua, ha provocado un descenso significativo en la incidencia de infección por Hib, hasta su práctica erradicación (2). Esta actuación ha facilitado el aumento significativo tanto de la colonización asintomática como de la infección sintomática por cepas de Hi no capsuladas, denominadas no tipificables (*Haemophilus influenzae* no tipificable, HiNT) (2). HiNT engloba un grupo heterogéneo de cepas, cuya diversidad ha sido observada a nivel genómico y fenotípico. En este trabajo, hemos analizado la diversidad de una colección prospectiva longitudinal de cepas de HiNT aisladas de pacientes adultos con una patología respiratoria de base.

1.2. Características generales de *H. influenzae* no tipificable e infección asociada a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

Haemophilus influenzae no tipificable (HiNT) ha desarrollado estrategias para colonizar la nasofaringe humana, formando parte de la microbiota respiratoria normal, y para ser un patógeno respiratorio oportunista. Así, HiNT es capaz de evadir la inmunidad humoral y celular en individuos con función pulmonar normal para causar una colonización nasofaríngea asintomática (9). Sin embargo, en ciertas circunstancias, frecuentemente asociadas a la inmunodepresión del hospedador, HiNT es el agente etiológico de otitis media pediátrica, neumonía, bronquitis aguda, sinusitis o conjuntivitis (10). Asimismo, HiNT es el patógeno bacteriano más frecuentemente aislado de las vías respiratorias bajas de pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (10, 16).

La EPOC es una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias y del parénquima pulmonar (18). Se caracteriza por la obstrucción irreversible del tracto respiratorio, infiltración de neutrófilos en las vías respiratorias e hipersecreción de moco. Todo ello, produce una pérdida progresiva de la función pulmonar, deterioro de la calidad de vida del paciente, y aumenta la tasa de mortalidad. La principal causa de desarrollo de EPOC es el tabaquismo, asociado a la exposición a agentes externos contaminantes o sustancias nocivas presentes en el humo del tabaco (9).

La EPOC cursa con empeoramientos intermitentes o periodos de agudización de los síntomas conocidos como exacerbaciones (18). Un alto porcentaje de las exacerbaciones se asocian a la infección por HiNT y, en menor medida, por virus u otros patógenos bacterianos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis* o *Streptococcus pneumoniae* (4).

Esta infección crónica asociada a la EPOC contribuye a la progresión de la enfermedad, amplificando los procesos inflamatorios. La “hipótesis del círculo vicioso” explica cómo la colonización bacteriana crónica de las vías respiratorias bajas en enfermos EPOC perpetúa la inflamación y contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad (**Fig. 1**). El punto central de esta hipótesis es que, una vez el patógeno alcanza las vías respiratorias bajas de individuos con el sistema muco-ciliar dañado por la exposición a humo de tabaco, la infección persiste y contribuye de forma activa e indefinida a amplificar el efecto deletéreo del humo de tabaco sobre el sistema respiratorio (9).

El humo de tabaco y la progresión de la EPOC dañan la inmunidad de la mucosa respiratoria. Este agente nocivo produce hipersecreción mucosa y daña las propiedades elásticas del epitelio

pulmonar. Además, los neutrófilos producen proteasas que degradan IgA, disminuyen los niveles de SP-A y SP-D, y disminuye la capacidad fagocítica de los fagocitos profesionales. Estas alteraciones favorecen la llegada de microorganismos a las vías respiratorias bajas de forma continua e indefinida, facilitando la colonización bacteriana de este nicho y la amplificación de la respuesta inflamatoria debido al reconocimiento constante de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en dichos microorganismos. Del mismo modo, los productos bacterianos (material secretado o material liberado al medio) contribuyen a la respuesta inflamatoria y consiguiente activación y/o reclutamiento de fagocitos profesionales, que amplifican el daño epitelial ya producido por la exposición a humo de tabaco. La amplificación del daño pulmonar favorece a su vez el acceso ininterrumpido de nuevos patógenos al pulmón. Por tanto, la infección crónica contribuye al deterioro del aparato respiratorio, mal funcionamiento de la inmunidad del individuo y acceso de microorganismos al tracto respiratorio inferior en un bucle sin fin denominado “círculo vicioso”. Este “círculo vicioso” amplifica indefinidamente la infección crónica y contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad respiratoria (9) (**Fig. 1**).

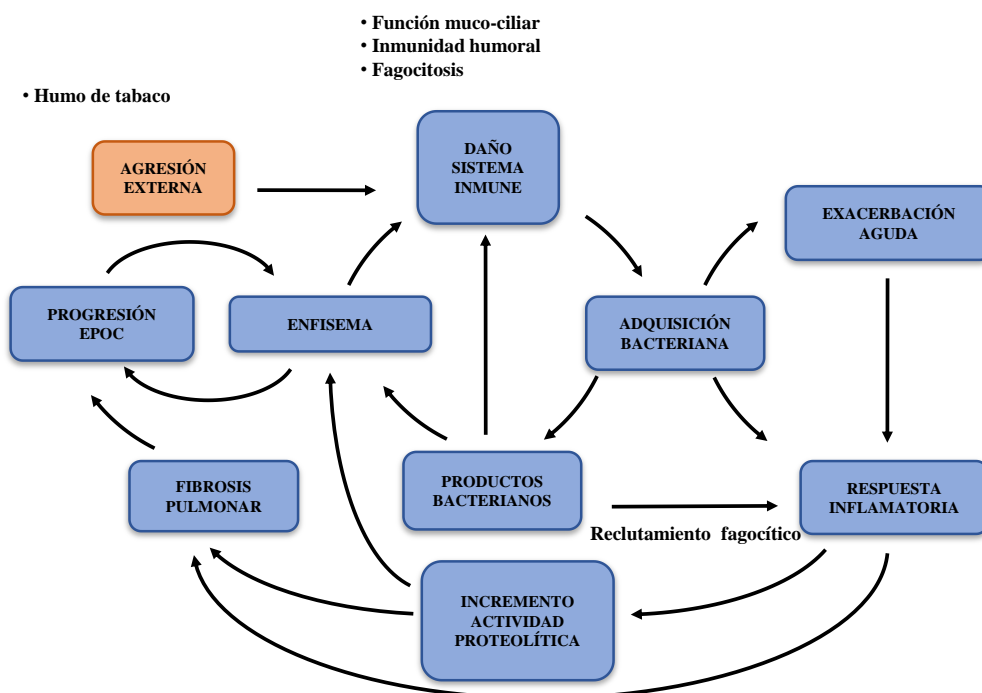


Fig. 1: “Hipótesis del círculo vicioso” en la progresión de la EPOC. La exposición continua a humo de tabaco deteriora el sistema inmune, permitiendo la colonización de las vías respiratorias bajas por patógenos oportunistas. Esta colonización produce un aumento de la respuesta inflamatoria, aumento de la actividad proteolítica y daño epitelial, facilitando una infección constante por microorganismos patógenos. La repetición cíclica de estos procesos contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad respiratoria crónica.

1.3. Variabilidad genómica de *H. influenzae* no tipificable

La variabilidad genética permite a los microorganismos sobrevivir en una variedad de nichos con distintas condiciones ambientales. La evolución adaptativa de los microorganismos conlleva la adquisición o pérdida de material genético, cambios en la secuencia de genes y/o regiones intergénicas, y modulación de la expresión génica. HiNT es un patógeno oportunista adaptado al aparato respiratorio humano. Una de sus estrategias de adaptación está basada en la variabilidad genética, y a su vez fenotípica, lo que facilita la evasión de la inmunidad humoral y celular del hospedador.

La diversidad genética de HiNT está mediada por: (i) captación de ADN del medio extracelular, debido a que HiNT es un microorganismo competente natural; (ii) polimorfismos genéticos como consecuencia de mutaciones puntuales, deleciones o duplicaciones, que pueden condicionar alteraciones en la secuencia y en la estructura de proteínas de la superficie bacteriana; (iii) alteración en la secuencia y/o expresión de genes por variación de fase. La secuenciación del genoma de *H. influenzae* Rd KW20 reveló una alta frecuencia de repeticiones de secuencias cortas de ADN. Estas secuencias cortas oscilan entre 1 y 9 nucleótidos y se denominan repeticiones de secuencia simple o SSRs (del inglés, *simple sequence repeats*). Las SSRs se encuentran en regiones promotoras o en pautas de lectura abierta. La SSR de un gen está conservada en secuencia y posición relativa. Sin embargo, el número de repeticiones de cada SSR de un determinado gen varía en función de la cepa. La introducción de cambios en el número de repeticiones de una SSR conlleva cambios en el marco traduccional de lectura (si la SSR está en la pauta abierta de lectura del gen) o cambios en el promotor. Estos cambios son generados por errores de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN que provocan un desapareamiento de hebras; (iv) hipermutación: se han descrito cepas Hi hipermutadoras que presentan defectos en el sistema de reparación de desapareamiento guiado por metilación o MMR (del inglés, *methyl-directed mismatch repair*) debido a mutaciones en el gen *mutS* (8, 11).

El análisis de la variabilidad genética de HiNT, y sus consecuencias en relación a la interacción del patógeno con el hospedador, es relevante para entender la dinámica de la colonización e infección por este microorganismo, y para la identificación de posibles dianas terapéuticas para su prevención y/o tratamiento. Existe un repertorio de técnicas pre-genómicas que permiten analizar la diversidad entre aislados de HiNT, entre los que se encuentra la electroforesis en campo pulsado (*pulse field gel electrophoresis*, PFGE). PFGE permite separar fragmentos de ADN (10 a 20 fragmentos, con un tamaño de 20 a 40 kb) procedentes de la digestión de ADN genómico de la bacteria en estudio con una enzima de restricción de baja

frecuencia de corte. La separación electroforética se debe a la acción de dos campos eléctricos localizados perpendicularmente, que orientan los fragmentos de ADN, y a la acción de una fila de electrodos que permite la migración electroforética de los fragmentos a lo largo del gel de agarosa (**Fig. 2**). La separación electroforética mediante PFGE genera un patrón de migración de fragmentos de ADN de distinto tamaño característico de cada aislado bacteriano. La comparación de patrones de migración de distintos aislados permite determinar si dichos aislados pertenecen al mismo o a distinto perfil de PFGE. Aislados con distinto perfil de PFGE son considerados cepas distintas. Aislados con el mismo perfil de PFGE pueden ser considerados el mismo clon, basado en PFGE (8).

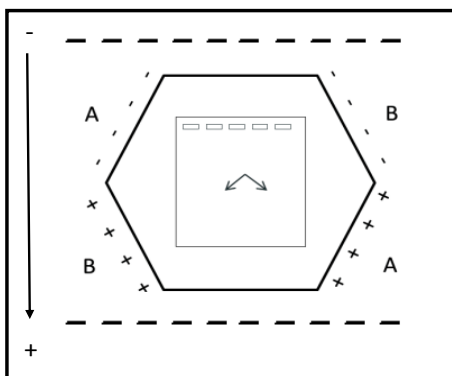


Fig. 2: Distribución de los electrodos en el equipo de PFGE. Los símbolos A y B muestran las posiciones de los pares de electrodos perpendiculares que orientan los fragmentos de ADN genómico.

1.4. Variabilidad extracromosómica de *H. influenzae* no tipificable

La resistencia a antibióticos es un fenómeno frecuentemente mediado por la adquisición de plásmidos naturales mediante transferencia horizontal, procedentes de microorganismos de la misma o distintas especies. La transferencia de plásmidos permite la adquisición de resistencia a numerosos antibióticos, entre los que se encuentran los β -lactámicos. Los genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos codifican enzimas que hidrolizan el antibiótico conocidas como β -lactamasas. Existen distintos tipos de β -lactamasas, incluyendo TEM y ROB (25).

En *H. influenzae*, la resistencia a β -lactámicos está fundamentalmente asociada a la β -lactamasa TEM. Sin embargo, estudios recientes han demostrado la presencia de *rob-1* en aislados clínicos de *H. influenzae* (21). Dicho gen está localizado en un plásmido natural identificado originalmente en cepas clínicas del patógeno porcino *Haemophilus parasuis*, aisladas de animales que sufrieron enfermedad de Glässer (21). Este plásmido, denominado pB1000, tiene 4,6 kb, origen de replicación ColE1, los genes de movilización *mobABC* y el gen *rob-1* (22) (**Fig. 3**). En nuestro laboratorio, hemos identificado un nuevo plásmido natural portador del gen *rob-1* en cepas de *H. parasuis* aisladas de la cavidad nasal de cerdos sanos al

destete. Este nuevo plásmido, denominado pJM-1, tiene 2,661 pb y el gen *rob-1*. Su posible presencia en cepas de HiNT clínicas ha sido objeto de estudio en este trabajo.

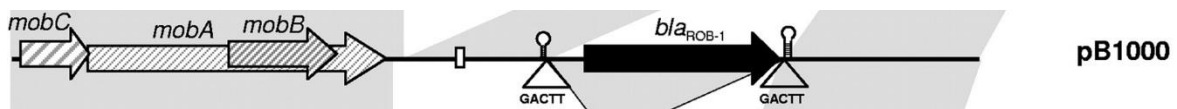


Fig. 3: Esquema del plásmido pB1000 (22).

1.5. Características generales de la infección por *H. influenzae* no tipificable

1.5.1. Infección de epitelio respiratorio por HiNT

El epitelio alveolar está formado por neumocitos tipos I y II. Los neumocitos tipo I cubren 95% de la superficie alveolar y generan una barrera delgada entre el espacio alveolar y los vasos sanguíneos. Los neumocitos tipo II cubren 5% de la superficie alveolar, pero son más abundantes en número que los de tipo I. Además de poseer actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, los neumocitos tipo II tienen diversas funciones: (i) mantener una baja tensión superficial en el pulmón, (ii) transportar agua y sodio, (iii) metabolizar compuestos xenobióticos, (iv) generar respuesta defensiva frente a patógenos y, (v) participar en procesos de regeneración pulmonar entre algunas de ellas (9).

HiNT invade el epitelio respiratorio humano a través de un mecanismo que implica el ensamblaje del citoesqueleto de microtúbulos, la organización de las balsas lipídicas de la membrana plasmática, y la activación de la cascada de señalización fosoinositol 3 quinasa (PI3K) (19). HiNT sobrevive en células del epitelio respiratorio, posiblemente mediante modulación de la fusión lisosomal (15). Las bacterias son metabólicamente activas en el interior celular pero no tienen capacidad proliferativa, y se encuentran en compartimentos subcelulares con características de endosoma tardío (*lysosomal associated membrane protein 1*, LAMP-1+, LAMP-2+, CD63+, lysotracker+), sin madurar a lisosomas (19). Los resultados disponibles sugieren que la supervivencia de HiNT en compartimentos subcelulares está asociada a la persistencia de la infección en pacientes EPOC (19).

1.5.2. Infección de macrófagos alveolares por HiNT

Los macrófagos alveolares son células mononucleares que contribuyen a la defensa frente a patógenos. Son células fagocíticas profesionales del sistema inmune innato, capaces de reconocer los patógenos mediante un amplio espectro de receptores celulares (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*), ingerirlos y eliminarlos. Además, los

macrófagos alveolares secretan citoquinas y quimioquinas cuando son estimulados por partículas procedentes de patógenos (18).

Los macrófagos alveolares fagocitan HiNT de forma eficiente y procesan el patógeno mediante la ruta fagolisosomal convencional (12). Tras ser fagocitadas, en un proceso dependiente de la correcta polimerización del citoesqueleto de actina, los compartimentos que albergan HiNT tienen características de fagosoma temprano, posteriormente tardío, y por último de fagolisosoma. Estos procesos se ven alterados por la exposición celular a sustancias nocivas presentes en el tabaco, produciendo una deficiencia de la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares, con la consiguiente reducción en los niveles de ingestión de HiNT (13).

1.6. Tratamiento de agudizaciones de EPOC mediante administración del antibiótico macrólido azitromicina

Los macrólidos son un grupo de antibióticos caracterizado por tener un anillo macrocíclico de lactona y poseer actividad antimicrobiana e inmunomoduladora (7). Un macrólido de uso destacado por su dualidad antibiótico-antiinflamatorio es la azitromicina. La azitromicina es un macrólido de segunda generación, de amplio espectro antibacteriano, cuyo mecanismo de acción está basado en la inhibición de la subunidad 50S del ribosoma, y por lo tanto de la síntesis de proteínas. Cabe destacar el uso de azitromicina como tratamiento frente a enfermedades respiratorias crónicas (1, 7, 18).

Estudios clínicos demuestran que la administración profiláctica de azitromicina a pacientes EPOC disminuye el número de agudizaciones de la enfermedad. Los datos clínicos disponibles sugieren que esta reducción puede estar asociada al efecto antiinflamatorio e inmunomodulador del antibiótico. Sin embargo, la administración profiláctica de azitromicina también conlleva un aumento del porcentaje de patógenos bacterianos resistentes al antibiótico. En la actualidad, los datos clínicos apuntan al potencial efecto beneficioso de la azitromicina en el tratamiento de la EPOC, pero también al riesgo que supone su uso en relación al aumento de la resistencia bacteriana a macrólidos (3).

La azitromicina, a nivel celular, atraviesa la membrana plasmática de células epiteliales y macrófagos, alcanzando alta concentración intracelular. Si bien la azitromicina no parece afectar la funcionalidad de las rutas de endocitosis/fagocitosis, causa una extensiva vacuolización y aumento de tamaño de las vesículas con características de endosoma tardío y lisosoma/fagosoma en epitelio y fagocitos (26, 27). Estas vesículas agrandadas no pueden fusionarse y/o aceptar

material de vesículas endocíticas tempranas de nueva formación. El efecto de la administración de azitromicina sobre la infección por HiNT asociada a la EPOC no ha sido evaluado a nivel celular. Asimismo, la relación entre el efecto de la administración de azitromicina y el nivel de resistencia de HiNT a este antibiótico no ha sido considerada. En este trabajo, hemos analizado el efecto de la administración de la azitromicina sobre la infección de epitelio respiratorio humano (neumocitos tipo II A549) y macrófago alveolar murino (células MH-S) por dos aislados clínicos de HiNT con distinto nivel de resistencia a este antibiótico macrólido.

2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

Hipótesis

La presión selectiva determina la evolución adaptativa de los patógenos para evadir la inmunidad del hospedador. En el caso de *H. influenzae* no tipificable (HiNT), la diversidad genotípica y fenotípica entre aislados es una estrategia de adaptación al aparato respiratorio humano que puede facilitar la infección crónica en pacientes EPOC. En este trabajo, nuestra primera **hipótesis** es: “existe diversidad genómica entre aislados de HiNT asociados a EPOC, que puede observarse entre cepas aisladas del mismo paciente y/o entre cepas aisladas de pacientes distintos”. Para testar esta hipótesis, hemos analizado la diversidad de 74 cepas de HiNT aisladas de esputos recogidos de 13 pacientes EPOC durante periodos de agudización. Además, dada la resistencia a antibióticos β -lactámicos de algunas cepas de HiNT por la adquisición de un plásmido portador del gen *rob-1*, hemos analizado la distribución de *rob-1* en los 74 aislados HiNT disponibles.

Por otro lado, HiNT es un patógeno oportunista que causa infecciones respiratorias y procesos periódicos de exacerbación en pacientes EPOC. La bacteria invade las células del epitelio respiratorio y es fagocitada por macrófagos alveolares, y su tráfico intracelular ha sido previamente caracterizado por nuestro grupo de investigación. El uso de antibióticos macrólidos inmunomoduladores como la azitromicina causa una disminución del número de agudizaciones sufridas por pacientes EPOC, si bien se desconoce su efecto a nivel celular, y sobre la infección por HiNT. En este trabajo, nuestra segunda **hipótesis** es: “la administración de azitromicina modula el tráfico intracelular de HiNT”. Para testar esta hipótesis, hemos analizado el efecto de la azitromicina sobre la infección de células epiteliales A549 y macrófagos alveolares MH-S por dos aislados clínicos de HiNT con distinto nivel de resistencia a este macrólido.

Objetivos

1. Caracterización de la diversidad genética de HiNT en aislados obtenidos de muestras de esputo recogidas en periodos de agudización de pacientes EPOC.
 - a. Genotipado mediante electroforesis en campo pulsado de una colección de cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes EPOC.
 - b. Análisis de la distribución del gen *rob-1* en una colección de cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes EPOC.

- 2.** Caracterización a nivel celular del efecto de la administración de azitromicina en la infección por HiNT.
 - a.** Análisis mediante microscopía de inmunofluorescencia del efecto de la azitromicina sobre la infección de células epiteliales A549 por los aislados clínicos HiNT375 y HiNT353.
 - b.** Análisis mediante microscopía de inmunofluorescencia del efecto de la azitromicina sobre la infección de macrófagos alveolares MH-S por los aislados clínicos HiNT375 y HiNT353.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivos

La colección de aislados clínicos de HiNT empleada en este trabajo se obtuvo mediante una colaboración establecida entre nuestro grupo de investigación y los servicios de Microbiología (Sra. Carmen Losa y Dr. José Leiva) y Neumología (Dr. Juan Pablo de Torres) de la Clínica Universidad de Navarra (CUN), Pamplona, Navarra. Se seleccionaron 13 pacientes EPOC en estado avanzado de la enfermedad, clasificados como exacerbadores frecuentes, con una historia de 2-3 visitas anuales como consecuencia de la agudización de la enfermedad. En cada visita, realizada entre Septiembre 2013-Marzo 2014, el servicio de Microbiología de la CUN procesó una muestra de esputo por paciente. En los casos de identificación positiva de HiNT, se aislaron 5 colonias independientes elegidas al azar, y se almacenaron a -80°C . La **Tabla 1** muestra las características de la colección de aislados de HiNT en estudio. Once pacientes realizaron una visita durante el tiempo de muestreo; dos pacientes realizaron dos visitas en este periodo.

La cepa HiNT375 (AZI^S) es un aislado pediátrico de otitis media empleado como cepa de referencia en nuestro grupo de investigación. Es una cepa sensible a azitromicina (concentración mínima inhibitoria, CMI=0.25 $\mu\text{g/ml}$). La cepa HiNT353 (AZI^R) es un aislado de un paciente EPOC, obtenido a partir de un esputo recogido en el Hospital Universitario Bellvitge, Barcelona, mediante una colaboración establecida con la Dra. Josefina Liñares. HiNT353 cepa resistente a azitromicina (CMI=8 $\mu\text{g/ml}$).

Todas las cepas de HiNT se crecieron en placas de agar-chocolate o sBHI-agar a 37°C con 5% CO_2 . Los *stocks* de todas las cepas se generaron a partir de la biomasa bacteriana de una placa fresca, que fue recogida, resuspendida en 1 ml de TSB-glicerol 20% y congelada a -80°C . Las cepas a ensayar fueron siempre reaisladas *de novo* a partir de los *stocks* correspondientes, 18 h antes de su uso.

Tabla 1: Características generales de los aislados de HiNT de 13 pacientes EPOC.

Paciente	Sexo	Edad	Episodio	Fecha de aislamiento	Nº muestra	Aislado HiNT	Perfil PFGE
1 (88389)	M	69	1	28/01/2013	B20130001548-4	1.1	A
					B20130001548-7	1.2	A
					B20130001548-8	1.3	A
					B20130001548-9	1.4	A
					B20130001548-10	1.5	A
2 (586055)	M	75	1	08/02/2013	B20130002315-1	2.1	B
					B20130002315-3	2.2	C
					B20130002315-4	2.3	C
					B20130002315-5	2.4	C
					B20130002315-6	2.5	C
3 (488802)	M	69	1	11/03/2013	B20130004079-2	3.1	D
					B20130004079-3	3.2	D
					B20130004079-4	3.3	D
					B20130004079-5	3.4	D
					B20130004079-6	3.5	D
4 (547915)	M	70	1	03/04/2013	B20130005407-2	4.1	E
					B20130005407-3	4.2	E
					B20130005407-4	4.3	E
					B20130005407-5	4.4	E
					B20130005407-6	4.5	E
5 (5463)	M	80	1	06/04/2013	B20130005599-1	5.1	F
					B20130005599-2	5.2	F
					B20130005599-3	5.3	F
					B20130005599-4	5.4	F
					B20130005599-5	5.5	F
6 (658458)	M	72	1	10/04/2013	B20130005766-2	6.1	G
					B20130005766-3	6.2	G
					B20130005766-4	6.3	G
					B20130005766-5	6.4	G
					B20130005766-6	6.5	G
7 (304307)	V	74	1	26/04/2013	B20130006647-1	7.1	H
					B20130006647-5	7.2	H
					B20130006647-6	7.3	H
					B20130006647-3	7.4	H
					B20130006647-4	7.5	H
8 (281924)	V	54	1	02/05/2013	B20130006942-6	8.1	I
					B20130006942-7	8.2	I
					B20130006942-5	8.3	I
					B20130006942-1	8.4	I
					B20130006942-4	8.5	I
9 (462219)	V	72	1	14/11/2013	B20130017555-1	9.1	J
					B20130017555-4	9.2	J
					B20130017555-2	9.3	J
					B20130017555-3	9.4	J
10 (599918)	V	77	1	26/06/2013	B20130010011-6	10.1.1	K
					B20130010011-5	10.1.2	K
					B20130010011-4	10.1.3	K
					B20130010011-2	10.1.4	K
					11/09/2013	B20130013726-1	10.1.5
	2	09/09/2013	B20130013612-4	10.2.1	K		
			B20130013612-1	10.2.2	K		
			B20130013612-5	10.2.3	K		
			B20130013612-2	10.2.4	K		
			B20130013612-3	10.2.5	K		

11 (276364)	V	70	1	17/06/2013	B20130009563-3	11.1.1	L
					B20130009563-5	11.1.2	L
					B20130009563-8	11.1.3	L
					B20130009563-7	11.1.4	M
					B20130009563-6	11.1.5	L
	71	2	13/09/2013	B20130013817-4	11.2.1	L	
				B20130013817-1	11.2.2	L	
				B20130013817-6	11.2.3	L	
				B20130013817-5	11.2.4	L	
				B20130013817-3	11.2.5	L	
12 (587727)	V	85	1	22/02/2014	B20140003175-1	12.1	N
					B20140003175-2	12.2	N
					B20140003175-3	12.3	N
					B20140003175-4	12.4	N
					B20140003175-5	12.5	N
					13 (659447)	M	63
B20140004052-4	13.2	O					
B20140004052-3	13.3	O					
B20140004052-5	13.4	O					
B20140004052-6	13.5	O					

3.2. Extracción y restricción de ADN para electroforesis en campo pulsado

La extracción, digestión y electroforesis en campo pulsado se realizó siguiendo el protocolo “tipificación molecular de microorganismos mediante electroforesis en campo pulsado” facilitado por el Institut Català de la Salut, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge del servicio de Microbiología del Hospital Universitario Bellvitge, Barcelona.

Las 74 cepas de HiNT, congeladas a -80°C , se sembraron en placas de agar-chocolate a 37°C y con 5% CO_2 , 18 h ante de cada ensayo. Se dispensaron 200 μl de PIV (Tris-HCl 0,01 M pH 8, NaCl 1M) por tubo, en tubos de 1,5 ml, y se inocularon aproximadamente 12 colonias/cepa, recogidas de la placa de agar-chocolate correspondiente, generando una suspensión bacteriana homogénea. Se añadieron 5 μl de cada suspensión bacteriana a cubetas de espectrofotómetro con 1 ml de PIV, para medir la densidad óptica (DO) a $\lambda=620\text{nm}$, que debió ser aproximadamente 0,025. Cuando se obtuvo un valor mayor, la turbidez de la suspensión se normalizó mediante adición de un volumen de PIV calculado como: $V_{o\ dil} = (OD_{620\text{nm}} \times 40 \times 210) - 210$. A continuación, se fundió agarosa de bajo punto de fusión (LM2) 1,5% en TE. Se mezclaron 150 μl de cada suspensión bacteriana previamente normalizada con 150 μl de agarosa. La mezcla se homogeneizó y se añadió a soportes rectangulares para su solidificación. Para obtener el ADN, los rectángulos de agarosa con el material microbiológico embebido se añadieron a tubos de 1,5 ml en los que se dispuso 1 ml de solución de lisis, cuyos componentes son: detergente Brij58 0,5%, Lisozima 100 $\mu\text{g/ml}$, RNAsa 50 $\mu\text{g/ml}$ y solución ST de lisis (6mM Tris-HCl pH 8; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA pH 8; 0,2% Desoxicolato sódico; 0,5 % Sarcosil). Los tubos se incubaron durante 5 h a 37°C . A continuación, se descartó la solución de lisis y se realizó un lavado con 1

ml de solución ES (EDTA 0,5 M pH 9; 1% Sarcosil). Tras el lavado, se añadió 1 ml de solución ES y proteinasa K (Sigma) (1 mg/ml) y se incubó durante 18 h a 50°C. Tras la incubación, se decantó la solución de ES con proteinasa K, y los fragmentos de agarosa se lavaron mediante 4 lavados de 30 min cada uno con solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8), en un agitador orbital y posición horizontal. Las muestras se guardaron en 1 ml de solución TE a 4°C hasta su uso. Antes de realizar la digestión subsiguiente, los rectángulos de agarosa se cortaron en cuatro fragmentos con una cuchilla, y se llevó a cabo la digestión de ADN de uno de los fragmentos de agarosa por muestra. Para ello, se añadieron 40 µl de solución de digestión (0,1 mg/ml BSA (1X); 1U de *Sma*I; NE Buffer 4 (1X); agua mQ), cubriendo por completo el fragmento de agarosa de cada muestra. Las digestiones se incubaron durante 18 h a 25°C. *Sma*I es una enzima de restricción de baja frecuencia corte, y lo hace en la secuencia CCC[^]GGG.

3.3. Electroforesis en campo pulsado

Se preparó un gel de agarosa D5 1% Pronadisa (Hispanlab) en TBS 0,5% (volumen total 100 ml) con ayuda de un soporte rectangular. Las muestras (rectángulos de agarosa de bajo punto de fusión con material microbiológico procesado) se añadieron al peine (en posición horizontal), y los fragmentos se fijaron con unas gotas de agarosa fundida. Una vez colocado el peine en posición vertical, se añadió la agarosa fundida y se dejó solidificar durante 10 min. Posteriormente, el gel se introdujo en la cubeta de electroforesis a la que se añadieron 2 l de TBE 0,5% (890 mM Tris, 890 mM Ácido bórico, 20 mM EDTA pH 8). Las condiciones para realizar la electroforesis fueron: 14°C, un pulso inicial de 1 s y un pulso final de 30 s, 6 voltios, y velocidad aproximada de 70 en el regulador de velocidad, durante 18 h (CHEF Electrophoresis Cell, Bio-Rad Labs). A continuación, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15-20 min, y se lavó con agua durante 15-20 min. Por último, el gel se visualizó con un transluminador de luz ultravioleta ChemiDoc XRS, y se realizó una captura de imagen mediante el programa Quantity One (R) versión 4.6.3 (Bio-Rad Labs).

3.4. Extracción de ADN y Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

Para analizar la presencia del gen *rob-1* mediante PCR, se emplearon los aislados HiNT cuyo antibiograma fue positivo frente a antibióticos β-lactámicos. La **Tabla 2** muestra las características de los antibiogramas de todos los aislados en estudio. En concreto, se analizaron 5 aislados del paciente 2, del paciente 6, del Paciente 12 y 10 aislados del Paciente 10.

Tabla 2: Susceptibilidad a antibióticos de las cepas de HiNT aisladas de los 13 pacientes EPOC en estudio. Cada número de muestra se corresponde con una visita médica de cada paciente. Los aislados con resistencia a β -lactámicos y amoxicilina se muestran en amarillo. AM: amoxicilina, β -lac: β -lactamasa, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, CLA: claritromicina, CLR: cloranfenicol, CRO: ceftriaxona, DOX: doxiciclina, LEV: levofloxacino, MEM: meropenem, RIF: rifampicina, ROX: cefuroxima y SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

Paciente	Muestra	AM	β lac	AMC	CLA	CLR	CRO	DOX	LEV	MEM	RIF	ROX	SXT
1	B20130001548	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	B20130002315	R	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
3	B20130004079	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	B20130005407	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	B20130005599	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	B20130005766	R	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	B20130006647	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
8	B20130006942	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	B20130017555	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	B20130010011	R	+	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
	B20130013612	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
11	B20130009563	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	B20130013817	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	B20140003175	R	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
13	B20140004052	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

Las cepas de interés se sembraron en placas de agar-chocolate e incubaron durante 18 h a 37°C con 5% CO₂. Para romper la membrana de las bacterias, se dispensaron 500 μ l de una solución de lisis (Tween 20 0,5% en agua mQ) en tubos de 1,5 ml. Se añadieron a cada tubo de 2 a 3 colonias recogidas de las placas de agar-chocolate, y se preparó una suspensión homogénea. Dicha suspensión fue sometida a 3 ciclos de 5 min a 95°C y 3 min en hielo. Por último, los tubos se centrifugaron durante 1 min a 10.000 g, y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos, donde se almacenó a -20°C hasta su uso.

La amplificación del gen *rob-1* se realizó con la pareja de cebadores rob-1R y rob-1F. Como control de la correcta preparación de ADN genómico, se emplearon las siguientes parejas de cebadores: lgtF-F1 y lgtF-R1 que amplifican el gen que codifica la enzima glucosiltransferasa (UDP glucosa) (LgtF); lic2A-Fs y lic2A-Rs que amplifican el gen que codifica la enzima galactosiltransferasa (Lic2A); lic3A-F1 y lic3A-R1 que amplifican el gen que codifica la sialiltransferasa (Lic3A); y los cebadores galU-F1 y galU-R1 que amplifican el gen que codifica la enzima UDP-glucosa sintasa (GalU). Como control de PCR, se empleó ADN genómico de la cepa HiNT375. Como control de la amplificación de *rob-1*, se empleó el plásmido pJM-1, portador del gen de resistencia. La secuencia de los cebadores empleados se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Cebadores usados en este trabajo.

Gen	Cebadores	Secuencia (5' → 3')
<i>rob-1</i>	rob-1F	TGTTGCAATCGCTGCC
	rob-1R	TTATCGTACACTTTCCA
<i>1gtF</i>	1gtF-F1	TGCTGGTGGGCAAGACGC
	1gtF-R1	AGCCTGAATTGCACAGCC
<i>lic2A</i>	lic2A-Fs	ATGAGTGCTATTGAAAATATTGTCATT
	lic2A-Rs	CTACATAAAACGAACAATTTCTTTACCTTG
<i>lic3A</i>	lic3A-FI	CTTAGGAGGTCATATGTCAAAGTCTGTCATTATTGCAGGTAATGG
	lic3A-RI	CCTAGGTCGACCTAATCCATTTTCTTGATTTTAAGGCGTG
<i>galU</i>	galU-F1	GAGCAATTGAGTGAAATTGAAACATTA
	galU-R1	ACACGATCGGATAGTTCCACGAAATTT

Para llevar a cabo la reacción de PCR se usó Taq Polimerasa. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l, con 21 μ l de solución de PCR y 4 μ l de muestra. La composición de la solución de PCR fue: tampón de reacción (1X), dNTPs (0,2 mM), cebador directo y reverso (0,4 mM), MgCl₂ (2 mM) y Taq Polimerasa (3,125U). Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización 8 min a 94° C, 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94° C, 1 min de anillamiento a 55°C, y 1 min a 72°C de elongación (tiempo variable en función del fragmento a amplificar), 10 min de elongación final a 72°C.

3.5. Mantenimiento de líneas celulares e infección de células en cultivo por HiNT

3.5.1. Mantenimiento de líneas celulares

La línea celular de carcinoma pulmonar humano derivada de neumocitos tipo II (A549, CCL-185) se creció en botellas de 25 cm² a 37°C con 5% CO₂ y una atmósfera húmeda. Las células A549 se cultivaron en medio RPMI-1640 completo (*roswell park memorial institute*), compuesto por: RPMI-1640, suero bovino fetal (SBF) inactivado 10%, HEPES 10 mM y una mezcla de antibióticos y antifúngicos (penicilina y estreptomina). Posteriormente, se depositaron 6x10⁴ células/pocillo sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro en placas de formato 24 pocillos, y se incubaron en RPMI-1640 completo durante 48 h, hasta obtener aproximadamente 2,4x10⁵ células/pocillo. El medio RPMI-1640 completo se sustituyó por RPMI-1640 con HEPES 10 mM y antibióticos, sin SFB 16 h antes de la infección, para sincronizar el ciclo celular de la monocapa epitelial.

La línea celular derivada de macrófagos alveolares MH-S (ATCC CRL-2019), fue crecida y mantenida de la misma forma que las células A549. Posteriormente, se depositaron 7×10^5 células/pocillo sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro en placas de formato 24 pocillos, se incubaron en RPMI-1640 completo durante 16 h, y se procedió a la infección. En todos los casos, se obtuvo aproximadamente 90% de confluencia previo a la infección.

3.5.2. Infección por HiNT

Antes de infectar, las células se lavaron 3 veces con 1 ml PBS atemperado, y se añadió 1 ml de EBSS (*earle's balanced salt solution*) por pocillo, medio en el que se realizaron todas las infecciones. Cuando fue necesario, las células se incubaron con 1 ml de EBSS con azitromicina 50 mg/ml durante 30 min a 37°C con 5% CO₂ (células pre-tratadas con azitromicina). Tras la incubación con azitromicina, los pocillos correspondientes se lavaron 3 veces con 1 ml PBS/pocillo, y se añadió 1 ml de EBSS previo a la infección. Las cepas HiNT375 y HiNT353 se crecieron en placas de agar-chocolate a 37°C con 5% CO₂, 18 h antes de ser empleadas para realizar la infección celular correspondiente. Para la infección, se recogió toda la biomasa bacteriana de la placa de agar-chocolate en 1 ml de PBS. Cada suspensión se ajustó a DO_{600nm}=1 en PBS, aproximadamente 10⁹ unidades formadoras de colonias (u.f.c./ml). Para llevar a cabo la infección, se añadieron 200 µl (epitelio) o 100 µl (macrófagos) de la suspensión bacteriana ajustada/pocillo, y la infección transcurrió durante 2h (epitelio) o 1h (macrófagos) a 37°C con 5% CO₂. A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS atemperado, y se añadió 1 ml de RPMI-1640 con HEPES 10 mM, SBF, y gentamicina 200 µg/ml por pocillo. La gentamicina tiene efecto bactericida sobre las bacterias extracelulares; sin embargo, no atraviesa la membrana plasmática eucariota, por lo que no actúa sobre las bacterias localizadas en el interior celular. Cuando fue necesario, se añadió 1 ml de RPMI-1640 con HEPES 10 mM, SBF 10%, gentamicina 200 µg/ml y azitromicina 50 mg/ml (células infectadas por HiNT y tratadas con azitromicina durante el periodo de incubación con gentamicina). Las células infectadas se incubaron en medio con gentamicina durante 15 o 60 min, a 37°C con 5% CO₂. Tras los tiempos de incubación necesarios, las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con 300 µl de paraformaldehído 3% (PFA 3%) durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS, y se añadió 1 ml de PBS/pocillo para preservar las células infectadas y fijadas a 4°C (**Fig. 4**).

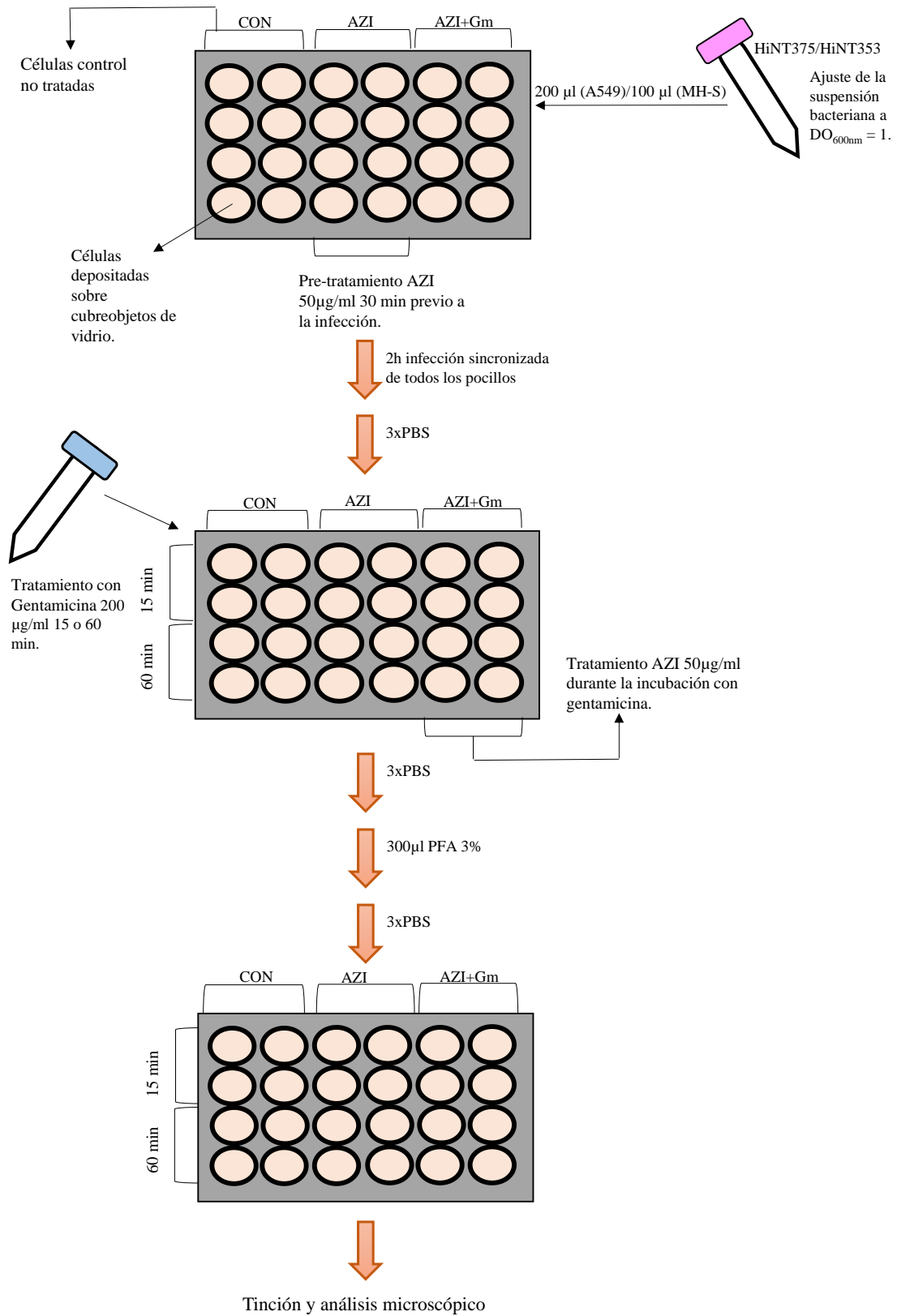


Fig. 4: Procesamiento de células en cultivo infectadas con HiNT375 y HiNT353.

3.5.3. Tinción y microscopia de inmunofluorescencia

Tanto las bacterias como los compartimentos subcelulares de células epiteliales y macrófagos se tiñeron de forma específica mediante inmunofluorescencia indirecta, para su posterior análisis microscópico. Los anticuerpos primarios usados en este trabajo se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Anticuerpos primarios usados en este trabajo.

Antígeno	Origen	Nombre del anticuerpo	Antígeno	Dilución	Proveedor
HiNT	Conejo		HiNT	1:600	Generado en el laboratorio
EEA-1	Cabra	N19	Endosoma temprano	1:50	Santa Cruz biotechnology
LAMP-1	Ratón	H4A3	Endosoma tardío	1:100	DSHB
LAMP-1	Rata	1DB4	Endosoma tardío	1:100	DSHB

HiNT se tiñó con un anticuerpo policlonal conejo anti-HiNT diluido 1:600; los endosomas tempranos se tiñeron con el anticuerpo policlonal cabra anti-EEA1 (*early endosome antigen 1*) N19 (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:50; los endosomas tardíos se tiñeron, en células epiteliales A549, con el anticuerpo monoclonal ratón anti-LAMP-1 humano H4A3 (Developmental Studies Hybridoma Bank-DSHB) diluido 1:100, y en macrófagos alveolares, con el anticuerpo policlonal rata anti-LAMP-1 murino 1DB4 (DSHB), diluido 1:100. El ADN se tiñó con el agente intercalante Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido 1:2500. Como anticuerpos secundarios, se utilizaron los anticuerpos burro anti-conejo conjugado con Cy2, burro anti-cabra conjugado con Rodamina RedX (RRX), o burro anti-ratón conjugado con RRX (Jackson Immunological). La dilución de los anticuerpos secundarios fue 1:100 en todos los casos. Todas las tinciones se realizaron en un volumen final de 40 μ l en PBS-saponina 0,1%, suero de caballo 10%, y los anticuerpos específicos correspondientes.

La tinción se realizó como sigue: los cubreobjetos se lavaron dos veces en PBS-saponina 0,1%, una vez en PBS, y se incubaron durante 30 min con el anticuerpo primario diluido en PBS-saponina 0,1% con suero de caballo 10% en una cámara húmeda en oscuridad. A continuación, los cubreobjetos se lavaron dos veces en PBS-saponina 0,1%, una vez en PBS, y se incubaron durante 30 min con el/los anticuerpo(s) secundario(s) diluidos en PBS-saponina 0,1%, con suero de caballo 10% en una cámara húmeda en oscuridad. Por último, las muestras se lavaron dos veces en PBS-saponina 0,1%, una vez

en PBS y una vez en agua mQ. Para el montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio, se usó un gel montador Aqua-Poly/Mount (Polysciences). Las muestras se conservaron a 4°C y oscuridad hasta su análisis mediante un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axioskop 2 plus. Las imágenes se capturaron con una cámara Carl Zeiss Axio Cam MRm monocromática.

4. RESULTADOS

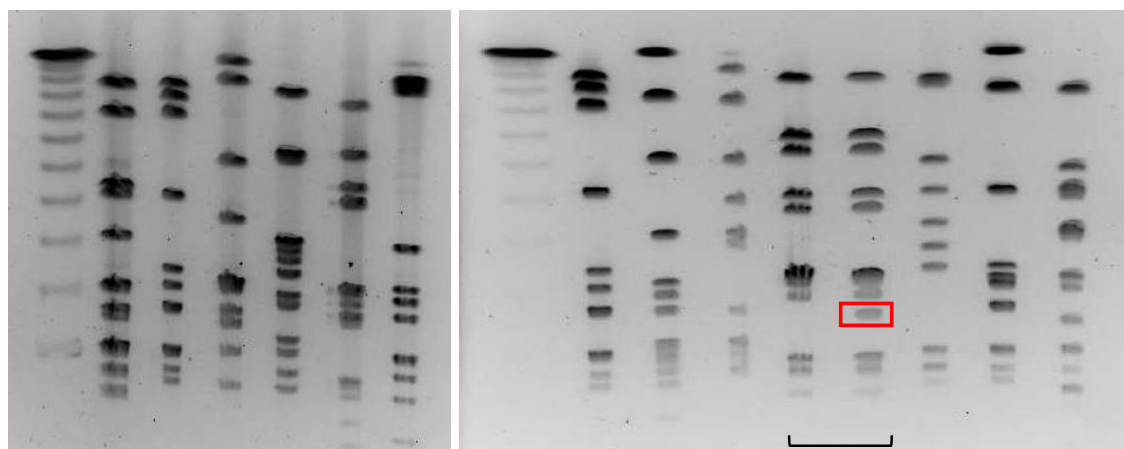
4.1. Genotipado mediante electroforesis en campo pulsado de una colección de cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes EPOC

Hemos analizado la diversidad genómica de HiNT en una colección de cepas aisladas de esputo de pacientes EPOC, recogidos de forma longitudinal y prospectiva durante episodios de exacerbación o agudización de la enfermedad.

Se emplearon 74 cepas de HiNT aisladas de 13 pacientes EPOC durante episodios de exacerbación. Las muestras de esputo se procesaron en el Servicio de Microbiología de la CUN para la identificación y aislamiento de HiNT. En caso de aislamiento positivo, se seleccionaron 5 colonias de HiNT por muestra, y se almacenaron como clones independientes a -80°C. En primer lugar, la colección de 74 cepas de HiNT fue duplicada, y conservada siguiendo el procedimiento indicado en la sección Material y Métodos. A continuación, las 74 cepas de HiNT fueron procesadas para la determinación de su perfil de PFGE. Los resultados obtenidos tras la separación electroforética en campo pulsado mostraron 15 perfiles de electroforesis distintos, nombrados PFGE-A a O (**Tabla 1**). Se realizó una comparación genotípica de cepas de HiNT, intra- e inter-paciente.

Así, los pacientes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,12 y 13 realizaron una visita médica en el periodo de muestreo y los 5 clones aislados por visita mostraron el mismo perfil de PFGE, característico de cada paciente. El paciente 2 realizó una visita en la que se aislaron 4 clones con el perfil C y un clon con el perfil B. El paciente 10 realizó dos visitas y los 10 clones que se aislaron mostraron el mismo perfil de PFGE (perfil K). El paciente 11 realizó dos visitas; en la primera de ellas, se aislaron 4 clones con el perfil L y un clon con el perfil M; en la segunda visita los 5 clones mostraron el mismo perfil L, observado como mayoritario en la primera visita (**Fig. 5**). Los aislados del paciente 11 se recogieron con un intervalo de 4 meses entre periodos de agudización.

A) Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11		9	12	13
Cepa HiNT	1.1	2.1	3.1	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	10.1	11.1.1	11.1.4	9.1	12.1	13.1
Perfil PFGE	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	J	N	O



Variabilidad intra-paciente e intra-visita

B) Paciente	11								
Visita	1					2			
Cepa HiNT	11.1.1	11.1.2	11.1.3	11.1.4	11.1.5	11.2.1	11.2.2	11.2.3	11.2.4
Perfil PFGE	L	L	L	M	L	L	L	L	L

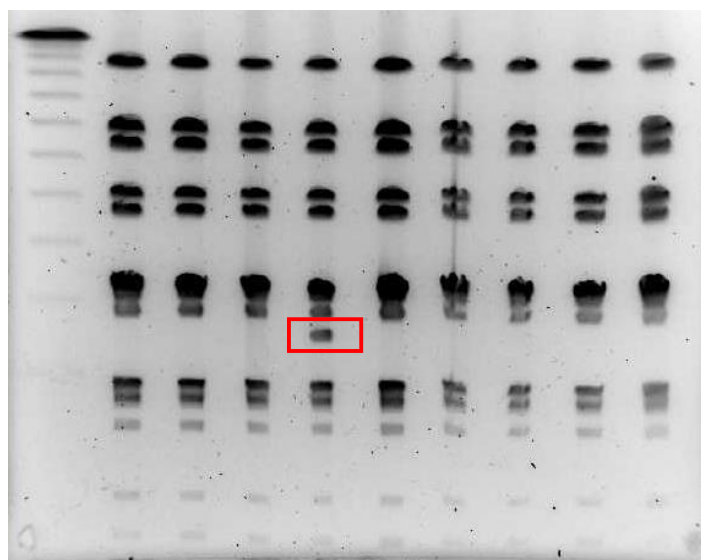


Fig. 5: Electroforesis en campo pulsando. A) La imagen de la izquierda muestra la separación electroforética del patrón de ADN genómico digerido con la enzima *SmaI* de los aislados de HiNT recuperados de pacientes del 1 al 6. Se muestra un perfil de PFGE por paciente. La imagen de la derecha muestra la separación electroforética del patrón de ADN genómico digerido con *SmaI* de los pacientes 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13. Todas las cepas presentan distinto perfil de campo pulsado. B) Patrón de bandas correspondiente a la separación electroforética de los aislados del paciente 11. Los carriles 1 a 5 corresponden a la separación electroforética del ADN genómico digerido con *SmaI* de los aislados 1 a 5, obtenidos a partir del esputo recogido en la primera visita médica del paciente. Las cepas 11.1.1, 11.1.2, 11.1.3 y 11.1.5, presentan el mismo perfil de bandas, mientras que la cepa 11.1.4, presenta una banda distinta, marcada en rojo. Separación electroforética del ADN genómico digerido con *SmaI* de los aislados 11.2.1, 11.2.2, 11.2.3 y 11.2.4, obtenidos a partir del esputo recogido en la segunda visita médica del paciente 11. Las cepas correspondientes a la segunda visita presentan el mismo perfil electroforético, similar al de las cepas 11.1.1, 11.1.2, 11.1.3 y 11.1.5, aisladas en la primera visita médica de este paciente.

4.2. Análisis de la presencia del gen *rob-1* en cepas de HiNT aisladas de pacientes EPOC

Se analizó la presencia del gen de resistencia a antibióticos β -lactámicos *rob-1* en la colección de 74 cepas disponible. El antibiograma se realizó de un clon/visita. Los resultados muestran que los pacientes 2, 6, 7, 10, 11, 12 y 13 presentan resistencia a β -lactamasa, ampicilina, doxiciclina, y trimetoprim-sulfametoxazol. Para este trabajo, solo se seleccionó aquellos aislados cuyo antibiograma determinó resistencia a los antibióticos β -lactámicos (β lac) y Amoxicilina (AM) (**Tabla 2**), asumiendo que si el clon/visita presentaba resistencia en el antibiograma, el resto de aislados también eran resistentes.

Los pacientes 2, 6, 10 y 12 presentaron aislados resistentes a antibióticos β -lactámicos. El paciente 10 realizó dos visitas médicas. Los aislados recogidos en la primera visita presentaron resistencia a β -lactámicos, mientras que los aislados de la segunda visita no. Se procesaron los 10 aislados del paciente 10, considerando las cepas aisladas en la segunda visita (sensibles a antibiótico β -lactámicos) como control negativo.

Las 25 cepas seleccionadas (5 del paciente 2, 5 del paciente 6, 10 del paciente 10 y 5 del paciente 12) se emplearon para determinar la presencia o ausencia del gen *rob-1* mediante PCR. Se realizó una preparación de ADN molde de cada cepa, tal y como se describe en la sección Material y Métodos. Para comprobar la adecuación de las extracciones de ADN bacteriano realizadas, se amplificaron los genes *lgtF*, *lic2A*, *lic3A* y *galU*. Trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación indica que estos genes están presentes en cepas de HiNT de forma universal. La amplificación de estos genes se realizó con las siguientes parejas de cebadores: para *lgtF*, lgtF-F1 y lgtF-R1; para *lic2A*, lic2A-Fs y lic2A-Rs; para *lic3A*, lic3A-FI y lic3A-RI; para *galU*, galU-F1 y galU-R1 (**Tabla 3**). Para optimizar la reacción de PCR, se testaron dos volúmenes de ADN molde, 2 y 4 μ l, usando como control dos aislados del paciente 5 (5.1 y 5.2). Se usó como control positivo ADN genómico de HiNT375 (cepa de referencia); como control negativo, no se añadió ADN molde a la mezcla de reacción de PCR (**Fig. 6**).

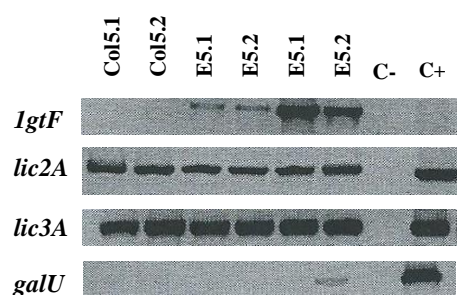


Fig. 6: Comprobación de la correcta extracción de ADN genómico para ser empleado como molde en reacciones de PCR. PCR de los aislados 5.1 y 5.2 del paciente 5. En los carriles 1 y 2, se usó como molde biomasa de colonias recogida directamente de la placa de agar-chocolate donde se reaislaron las cepas. En los carriles 3 y 4, se usó como molde extracto de ADN de cada aislado (2 μ l). En los carriles 5 y 6, se usó como molde una preparación de ADN de cada aislado (4 μ l). Control positivo: ADN genómico de HiNT375 (C+); control negativo, reacción sin molde (C-). Col: colonia, E: extracto.

En primer lugar, se llevó a cabo la amplificación del gen *rob-1*, usando como ADN molde, extracto de ADN de los aislados de los pacientes 2 y 6. El gen *rob-1* se amplificó con los cebadores rob-1R y rob-1R. Como control de ADN molde se amplificó *lic2A* con los cebadores lic2A-Fs y lic2A-Rs, que generó una banda de 1 Kb. En ningún caso se obtuvo producto de amplificación al emplear los cebadores rob-1F y rob-1R, por lo que no se detectó el gen *rob-1* en ninguna de las cepas analizadas. Como control positivo de la amplificación de *rob-1*, se empleó ADN de pJM-1, plásmido natural identificado en nuestro laboratorio portador de este gen de resistencia antibiótica. Por otro lado, se realizó la amplificación del gen *rob-1* usando como molde ADN de 15 aislados de HiNT procedentes de los pacientes 12 (5 aislados resistentes a β -lactámicos) y 10 (10 cepas, 5 resistentes aisladas en la primera visita y 5 sensibles aisladas en la segunda visita). Igualmente, se usaron las parejas de cebadores rob-1F y rob-1R, para amplificar el gen *rob-1*, y lic2A-Fs y lic2A-Rs, para amplificar el gen *lic2A*. En ninguno de los casos se obtuvo producto de amplificación al emplear rob-1F y rob-1R, por lo que no se detectó el gen *rob-1* en las cepas aisladas de los pacientes 10 y 12. Como control positivo de la amplificación de *rob-1*, se empleó ADN de pJM-1 (**Fig. 7**).

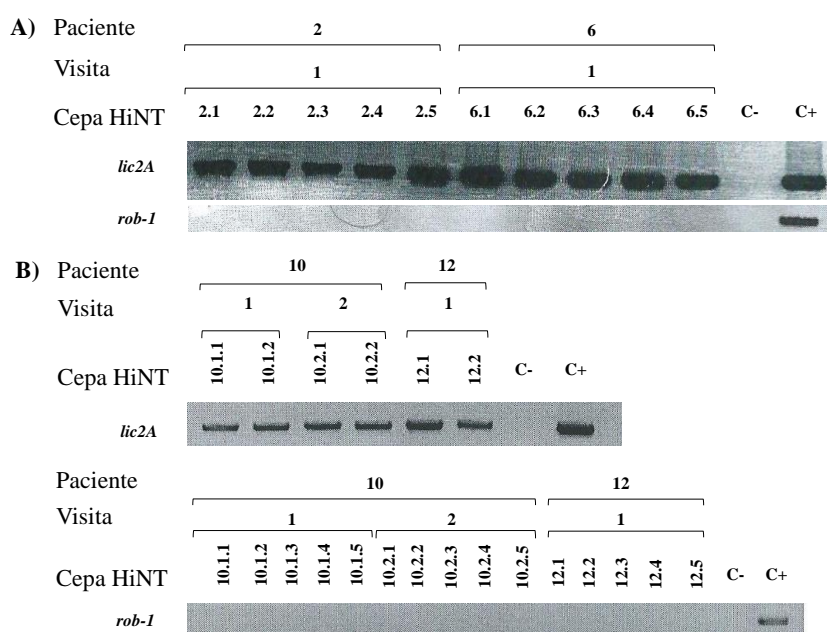


Fig. 7: Amplificación del gen *rob-1* en los aislados de HiNT de los pacientes 2, 6, 10 y 12. **A)** Amplificación de los genes *lic2A* y *rob-1* en los aislados procedentes de los pacientes 2 y 6. Gen *rob-1* (panel superior): los carriles 1 a 5 muestran la no amplificación de *rob-1* en aislados 1 a 5 del paciente 2. Los carriles 6 a 10 muestran la no amplificación de *rob-1* en los aislados del 1 a 5 del paciente 6. El carril 11 corresponde con el control negativo (C-). El carril 12 muestra el control positivo (C+); en el caso del gen *lic2A*, se empleó como control positivo ADN genómico de HiNT375, en el caso de *rob-1*, se usó el plásmido pJM-1 portador de *rob-1*. **B)** Amplificación de los genes *rob-1* y *lic2A* en los aislados procedentes de los pacientes 10 y 12. Gen *rob-1* (panel superior): los carriles 1 a 10 muestran la amplificación de *rob-1* en los aislados del paciente 10. Los carriles 11 a 15 muestran la amplificación de *rob-1* en los aislados 1 a 5 del paciente 12. El carril 13 corresponde al control negativo (C-). El carril 14 corresponde al control positivo (C+), en el que se empleó como molde pJM-1. La amplificación control del gen *lic2A* se realizó a partir de ADN de dos aislados por visita. Los carriles 1 y 2 corresponden a la amplificación de *lic2A* en 2 clones aislados en la primera visita del paciente 10; los carriles 3 y 4 muestran la amplificación de *lic2A* en 2 clones aislados en la segunda visita del mismo paciente. Los carriles 5 y 6 muestran la amplificación de *lic2A* en 2 aislados del paciente 12. El carril 7 corresponde con el control negativo (C-). El carril 8 corresponde con el control positivo (C+), en el que se empleó ADN genómico de HiNT375.

4.3. Efecto del antibiótico macrólido azitromicina en la infección de células epiteliales y macrófagos alveolares por HiNT

Trabajo realizado en nuestro grupo de investigación ha mostrado, mediante el uso de un modelo de infección intranasal murina por HiNT, que la administración oral de azitromicina disminuye la carga bacteriana de la cepa de HiNT375, sensible a azitromicina, en lavado broncoalveolar y pulmón, pero no de la cepa HiNT353, resistente a este antibiótico.

A nivel celular, el trabajo realizado en nuestro grupo ha mostrado que la exposición celular a azitromicina no provoca una reducción de la carga bacteriana adherida a la superficie de células epiteliales y macrófagos alveolares, pero sí de la carga bacteriana que invade el epitelio respiratorio y/o es fagocitada por macrófagos alveolares (Begoña Euba y Javier Molerés, datos no publicados). Esta observación puede ser debida a un posible efecto bactericida del antibiótico sobre bacterias intracelulares, posiblemente debido a la capacidad de la azitromicina para atravesar la membrana plasmática de las células eucariotas y alojarse en el interior celular (Begoña Euba y Javier Molerés, datos no publicados). Por otra parte, existen evidencias que indican que la azitromicina modula la maduración de los compartimentos de la ruta endocítica de células epiteliales y macrófagos (20). Dado que HiNT se localiza en compartimentos subcelulares de esta naturaleza en el interior de células epiteliales y macrófagos, en este trabajo hemos analizado mediante microscopia de inmunofluorescencia la localización subcelular de HiNT en células expuestas a azitromicina. Para ello, se emplearon: (i) células control no expuestas a azitromicina e infectadas por HiNT; (ii) células pre-expuestas a azitromicina e infectadas por HiNT; (iii) células infectadas por HiNT y expuestas a azitromicina durante el periodo de incubación con gentamicina (ver sección Material y Métodos). El diseño de este experimento se resume en la **Fig. 4**. Hemos empleado dos cepas de HiNT con distinto nivel de susceptibilidad a azitromicina: HiNT375 (CMI=0.25 µg/ml) y HiNT353 (CMI=8 µg/ml).

Se ha realizado una cuantificación de bacterias localizadas en el interior de vesículas con características de endosoma temprano (co-localización HiNT:EEA1) o tardío (co-localización HiNT:LAMP-1) mediante microscopia de fluorescencia. Una co-localización bacteria:compartimento subcelular se consideró positiva si: (i) el marcador de compartimento subcelular coincidió con el área ocupada por la bacteria; (ii) el marcador de compartimento subcelular contuvo una o varias bacterias. La cuantificación de la co-localización HiNT:compartimento subcelular se realizó en un mínimo de 100 células infectadas/experimento. Se procesó material infectado tras 15 o 60 min de incubación con gentamicina. Se realizaron 7 experimentos en células A549 (infección 1 a 7) y 3 experimentos en macrófagos MH-S

(infección 1 a 3). Para cuantificar el porcentaje de co-localización bacteria:compartimento, se emplearon los experimentos 3, 4, 5 y 7 en células A549, y los experimentos 1 y 3 en macrófagos MH-S. La **Tabla A1** (Anexo) muestra un resumen de los experimentos realizados, y de los seleccionados para realizar la cuantificación que se presenta a continuación. Los porcentajes de co-localización HiNT:compartimento subcelular se muestran en la **Tabla 5, 6, 7 y Fig. 8**.

En células epiteliales A549, se cuantificó el porcentaje de co-localización HiNT375:EEA1 en células control no tratadas, células pre-tratadas con azitromicina, y células tratadas con azitromicina durante incubación celular con gentamicina, durante 15 o 60 min. Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas, los datos sugieren una mayor co-localización en células pre-tratadas con azitromicina que en células control no tratadas, particularmente tras un periodo de incubación con gentamicina de 15 min. El porcentaje de co-localización HiNT375:LAMP-1 fue comparable en las distintas condiciones analizadas.

Por otra parte, se cuantificaron los porcentajes de co-localización HiNT353:EEA1 y HiNT353:LAMP-1 en células control no tratadas, células pre-tratadas con azitromicina, y células tratadas con azitromicina tras un periodo de incubación con gentamicina de 15 o 60 min. Los datos indican porcentajes de co-localización similares en todas las condiciones analizadas tras infección epitelial con HiNT353.

En macrófagos alveolares MH-S, se cuantificaron los porcentajes de co-localización HiNT375:LAMP-1 en células control no tratadas, células pre-tratadas con azitromicina, y células tratadas con azitromicina durante una incubación celular con gentamicina de 15 o 60 min. Los datos indican porcentajes de co-localización similares en todas las condiciones analizadas.

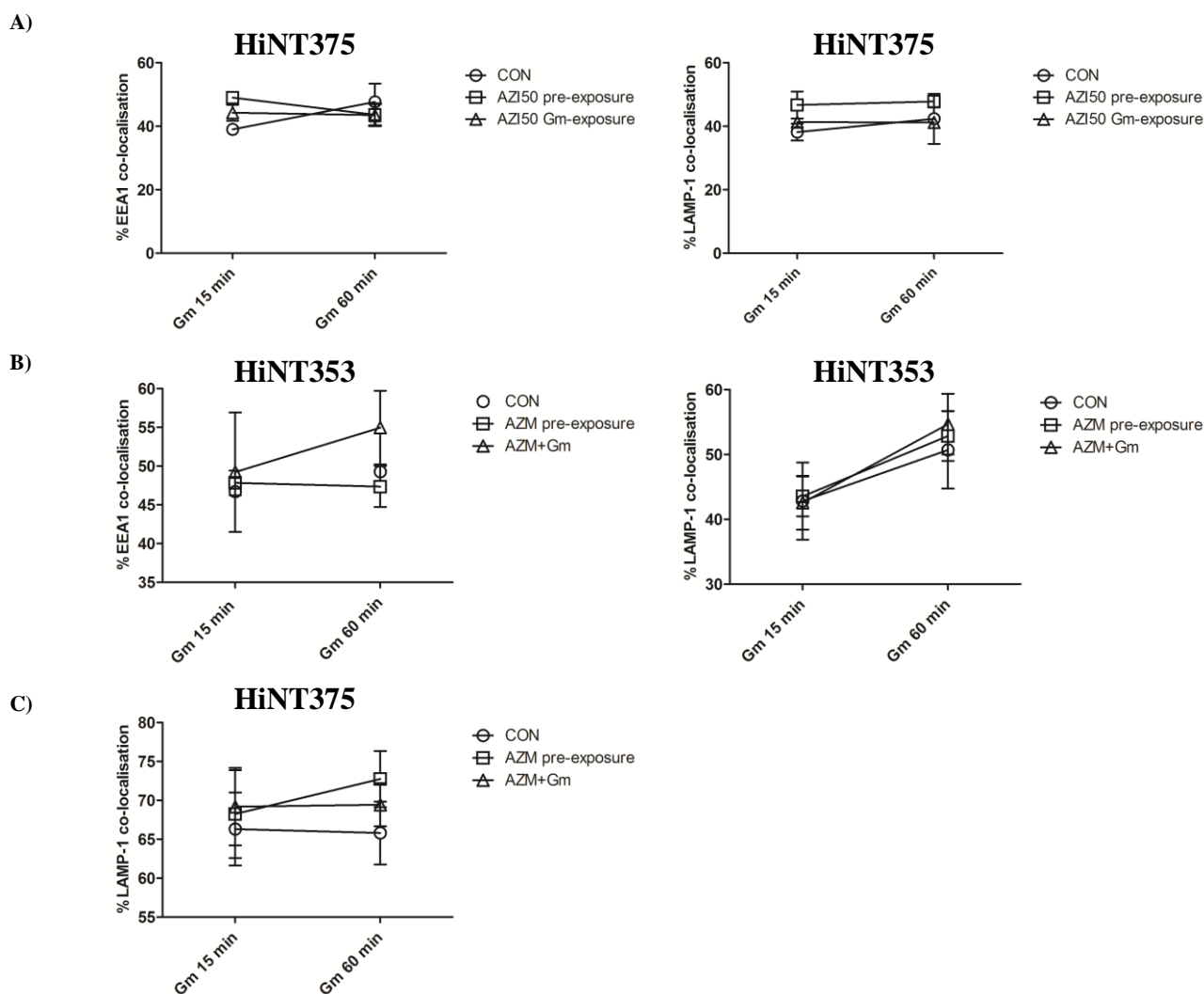


Fig. 8: Porcentaje de co-localización HiNT:compartmento subcelular temprano (EEA-1) o tardío (LAMP-1). **A)** Porcentajes de co-localización de HiNT375 con un marcador de endosoma temprano (EEA-1) y tardío (LAMP-1) en células A549 tras una incubación celular de 15 o 60 min. **B)** Porcentaje de co-localización de HiNT353 con un marcador de endosoma temprano (EEA-1) y tardío (LAMP-1) en células A549 tras una incubación celular de 15 o 60 min con gentamicina. **C)** Porcentaje de co-localización de HiNT375 con un marcador de endosoma tardío (LAMP-1) en macrófagos alveolares MH-S tras una incubación celular de 15 o 60 min con gentamicina. CON: células control infectadas no tratadas; AZM pre-exposure: células pre-tratadas con azitromicina; AZM+Gm: células tratadas con azitromicina durante el periodo de incubación con gentamicina, tras ser infectadas con HiNT.

Tabla 5: Porcentajes de co-localización de HiNT375 con compartimentos subcelulares con características de endosoma temprano (EEA-1) y tardío (LAMP-1) en células A549. AZI+gentamicina: células tratadas con azitromicina durante el periodo de incubación con gentamicina. HiNT375+: número de bacterias de la cepa HiNT375 con co-localización positiva con el marcador celular, en las condiciones indicadas en cada caso. HiNT375-: número de bacterias de la cepa HiNT375 con co-localización negativa con el marcador celular, en las condiciones indicadas en cada caso.

EEA-1 15 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización
Exp.3	130	216	37,57	136	139	49,45	136	190	41,72
Exp.4	91	186	40,38	130	138	48,51	128	146	46,72
Media+/-SD			38,98±1,99			48,98±0,67			44,22±3,53
EEA-1 60 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización
Exp.3	144	200	41,86	128	191	40,13	137	193	41,52
Exp.4	165	144	53,4	118	133	47,01	124	149	45,42
Media+/-SD			47,63±8,16			43,57±4,87			43,47±2,76
LAMP-1 15 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización
Exp.3	87	211	35,47	103	181	42,36	96	174	42
Exp.4	64	174	40,82	47	103	50,95	82	186	40,58
Media+/-SD			38,15±3,78			46,65±6,08			41,58±1,01
LAMP-1 60 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización	HiNT375+	HiNT375-	% co-localización
Exp.3	115	219	34,43	134	158	45,89	128	188	40,51
Exp.4	125	124	50,2	133	135	49,63	113	157	41,85
Media+/-SD			42,32±11,15			47,76±2,64			41,18±0,95

Tabla 6: Porcentaje de co-localización de HiNT353 con compartimentos subcelulares con características de endosoma temprano (EEA-1) y tardío (LAMP-1) en células A549. AZI+gentamicina: células tratadas con azitromicina durante el periodo de incubación con gentamicina. HiNT353+: número de bacterias de la cepa HiNT353 con co-localización positiva con el marcador celular, en las condiciones indicadas en cada caso. HiNT353-: número de bacterias de la cepa HiNT353 con co-localización negativa con el marcador celular, en las condiciones indicadas en cada caso.

EEA-1 15 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización
Exp.5	120	135	47,06	116	135	46,22	136	103	56,9
Exp.7	127	147	46,35	126	129	49,41	120	169	41,52
Media+/-SD			46,70±0,5			47,81±2,26			44,22± 3,53
EEA-1 60 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización	HiNT353 +	HiNT353 -	%co-localización	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización
Exp.5	123	106	53,71	116	116	50	123	83	59,71
Exp.7	134	165	44,82	130	165	44,07	125	124	50,2
Media+/-SD			49,26±6,29			47,03±4,19			54,95±6,72
LAMP-1 15 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización	HiNT353 +	HiNT353-	%co-localización	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización
Exp.5	119	125	48,77	131	150	46,62	128	146	46,72
Exp.7	122	209	36,86	123	181	40,46	119	191	38,39
Media+/-SD			42,81±8,42			43,54±4,35			42,55±5,89
LAMP-1 60 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización	HiNT353+	HiNT353-	%co-localización
Exp.5	136	104	56,67	123	94	56,68	124	85	59,33
Exp.7	123	152	44,73	122	127	49	113	113	50
Media+/-SD			50,70±8,44			52,84±5,43			54,67±6,6

Tabla 7: Porcentajes de co-localización de HiNT375 con compartimentos subcelulares con características de endosoma tardío (LAMP-1) en macrófagos alveolares MH-S. AZI+gentamicina: células tratadas con azitromicina durante el periodo de incubación con gentamicina. HiNT375+: número de bacterias de la cepa HiNT353 con co-localización positiva con el marcador celular LAMP-1, en las condiciones indicadas en cada caso. HiNT375-: número de bacterias de la cepa HiNT375 con co-localización negativa con el marcador celular LAMP-1, en las condiciones indicadas en cada caso.

LAMP-1 15 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT375+	HiNT375-	%co-localización	HiNT375+	HiNT375-	%co-localización	HiNT375+	HiNT375-	%co-localización
Exp.1	115	47	70,99	116	41	73,89	109	38	74,15
Exp.3	114	71	61,62	117	70	62,57	113	63	64,2
Media+/-SD			66,31±6,62			68,23±8			69,18±7,03
LAMP-1 60 min	Control			Pre-tratadas			AZI+gentamicina		
	HiNT375+	HiNT375-	%co-localización	HiNT375+	HiNT375-	%co-localización	HiNT375+	HiNT375-	%co-localización
Exp.1	113	70	61,75	116	36	76,32	122	47	72,19
Exp.3	132	57	69,84	121	54	69,14	118	59	66,67
Media+/-SD			65,80±5,72			72,73±5,07			69,43±3,91

La **Fig. 9** muestra varios ejemplos de co-localización de HiNT375 con el marcador de endosoma temprano (EEA-1) y tardío (LAMP-1) en células A549 control no tratadas y tratadas con azitromicina. Por otra parte, se observaron cambios en la morfología de los compartimentos subcelulares debido a la incubación con azitromicina. En concreto, se observó un aumento del tamaño de las vesículas respecto a las células control (**Fig. 10**).

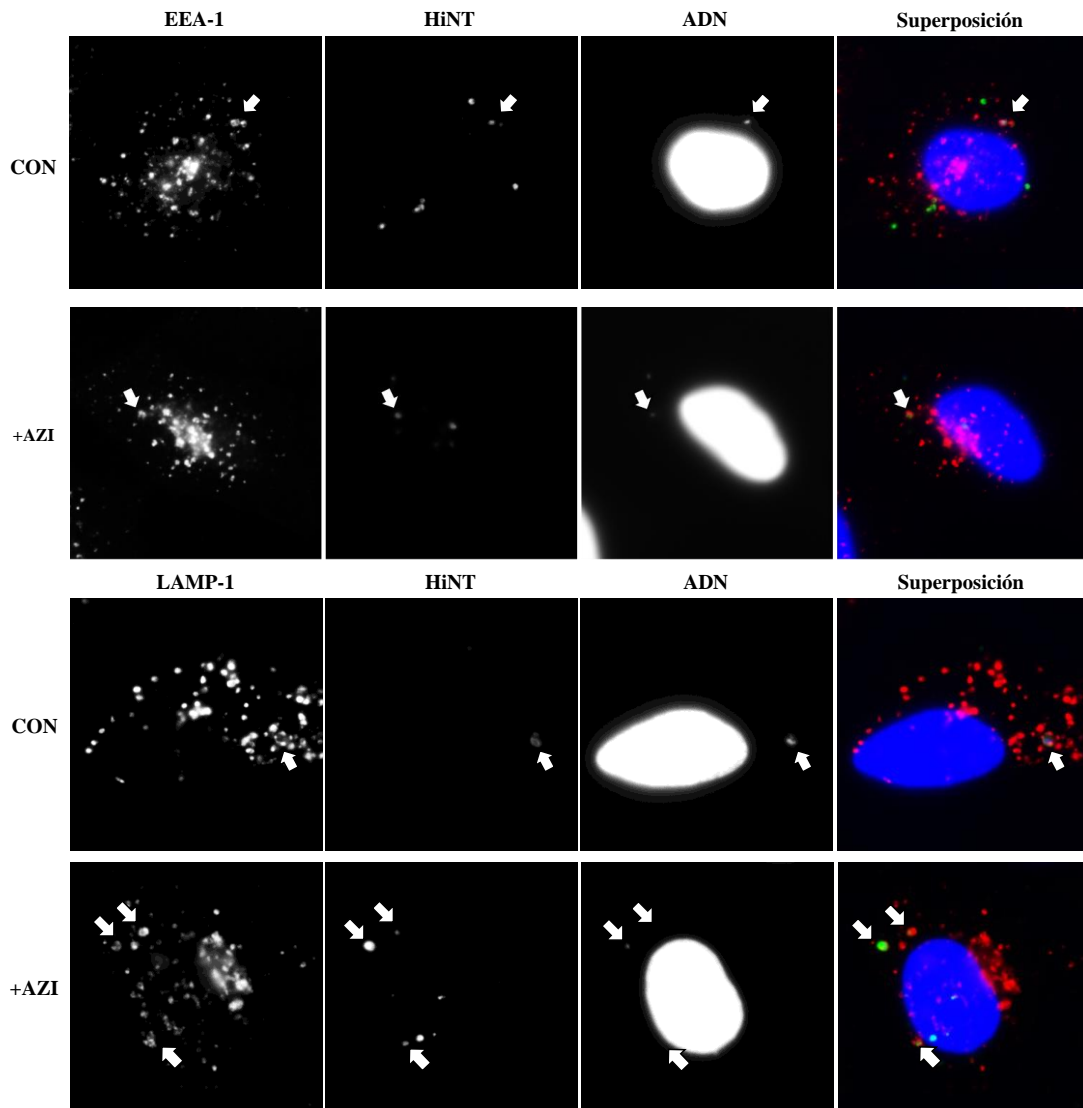


Fig. 9: Infección de células A549 con HiNT375. Observación mediante microscopía de inmunofluorescencia de la infección de células epiteliales, control y tratadas con azitromicina, por HiNT375. Los compartimentos celulares con características de endosoma temprano (EEA-1) se tiñeron con un anticuerpo policlonal cabra anti-EEA-1 y con el anticuerpo secundario burro anti-cabra conjugado con RRX (rojo). Los compartimentos celulares con características de endosoma tardío (LAMP-1) se tiñeron con un anticuerpo monoclonal ratón anti-LAMP-1 y con el anticuerpo secundario burro anti-ratón conjugado con RRX (rojo). HiNT375 se tiñó con anticuerpo conejo anti-HiNT y con el anticuerpo secundario burro anti-conejo conjugado con Cy2 (verde). El ADN de los núcleos eucariotas y las bacterias se tiñó con el agente intercalante Hoechst 33342 (azul). Las flechas muestran co-localización HiNT375:compartimento celular.

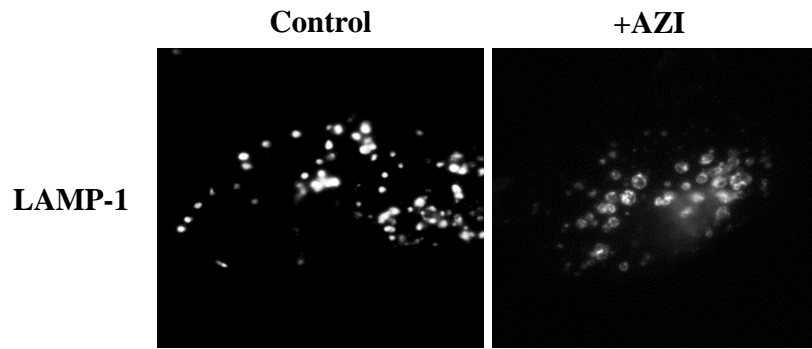


Fig. 10: Cambios morfológicos de los compartimentos subcelulares por adición de azitromicina. Aumento de tamaño de los compartimentos subcelulares debido la acción de la azitromicina.

5. DISCUSIÓN

HiNT es un patógeno oportunista de la nasofaringe humana que, bajo determinadas condiciones, causa infección sintomática. HiNT es causa importante de infecciones agudas y crónicas en el tracto respiratorio de pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas como la EPOC. Evidencias previas obtenidas en nuestro grupo de investigación y por otros autores, muestran la existencia de diversidad genotípica entre cepas de HiNT aisladas de muestras de esputo de pacientes EPOC, así como una posible asociación entre la adquisición de cepas nuevas y la ocurrencia de exacerbaciones de la enfermedad (24).

En este trabajo, hemos genotipado mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) 74 aislados de HiNT, procedentes de 13 pacientes EPOC. Las cepas se aislaron de muestras de esputo recogidas durante periodos de agudización de la enfermedad. Once pacientes realizaron 1 visita médica en el periodo de muestreo. Dos de ellos sufrieron dos exacerbaciones en el periodo de muestreo, y realizaron 2 visitas. Los resultados obtenidos muestran que cada paciente presenta un perfil de PFGE. En su mayoría, cada paciente presenta cepas con un perfil de PFGE igual en los 5 aislados recogidos por visita, pero distinto al perfil del resto de pacientes. Es decir, la infección en cada paciente está relacionada con un clon de HiNT distinto al de los demás pacientes. Por el contrario, dos pacientes presentaron 2 perfiles de PFGE distintos en cepas aisladas en una misma visita. En estos pacientes, la infección parece estar asociada a dos cepas de HiNT distintas. Temporalmente, observamos que, en los dos pacientes muestreados dos veces, la mayor parte de aislados corresponden al mismo clon por paciente. Esta observación apoya la noción de que cepas de HiNT que provocan infección crónica pueden también estar asociadas a episodios de exacerbación aguda.

PFGE es una técnica de análisis de diversidad genómica que tiene ventajas e inconvenientes. Es una técnica sencilla, que requiere como infraestructura un equipo CHEF Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Sin embargo, es una aproximación limitada, dado que no permite discriminar más allá de la migración de fragmentos de ADN generados mediante digestión, por lo que no permitirá evaluar mutaciones puntuales que condicionan polimorfismos, pequeñas inserciones o deleciones, etc. De hecho, trabajo realizado en nuestro grupo de investigación ha mostrado que tres cepas de HiNT con el mismo perfil PFGE, aisladas de un paciente EPOC en tres visitas consecutivas como consecuencia de tres agudizaciones de la enfermedad, presentan polimorfismos no sinónimos en nueve genes que codifican, lo que puede estar relacionado con el aumento progresivo de la resistencia a la muerte mediada por péptidos antimicrobianos observada en estos aislados (10). Por lo tanto, entendemos que el uso de PFGE para el análisis de la diversidad genómica en aislados de HiNT es útil para el escrutinio

de colecciones de aislados, lo que facilitará la selección de cepas de interés para su posterior estudio mediante secuenciación de genoma completo, u otros métodos de análisis.

Por otra parte, hemos analizado la presencia del gen de resistencia a antibióticos β -lactámicos *rob-1* en aislados de HiNT de la misma colección de cepas clínicas. Esta búsqueda dio resultado negativo, lo que sugiere que las cepas analizadas pueden portar un gen de resistencia a β -lactámicos distinto a *rob-1*, lo que explicaría un antibiograma positivo, tal y como se muestra en la **Tabla 3**.

HiNT presenta ciertas características para invadir las células del epitelio pulmonar y evadir el sistema inmune, sobreviviendo en el interior celular, y potencialmente produciendo una infección crónica. En este trabajo, se observó y cuantificó la localización de HiNT en vesículas celulares con características de endosoma temprano (positivas para el marcador EEA-1) y tardío (positivas para el marcador LAMP-1) en células epiteliales A549 y macrófagos alveolares MH-S. Los datos obtenidos en células epiteliales no muestran diferencias significativas en el porcentaje de co-localización bacteria:marcador entre células control no tratadas, pre-tratadas y post-tratadas (durante incubación con gentamicina) con azitromicina. Sin embargo, se observó una tendencia a una mayor co-localización HiNT375:EEA-1 en células pre-tratadas con azitromicina, infectadas durante 2 h, e incubadas con gentamicina durante 15 min. Estos datos apuntan a una posible modulación del tráfico subcelular de HiNT en células epiteliales como consecuencia de la administración del antibiótico macrólido, lo que puede condicionar la progresión de la infección. En macrófagos alveolares MH-S no se observaron diferencias en la co-localización HiNT375:EEA-1, lo que puede estar relacionado con las diferencias en la vida intracelular de HiNT en epitelio respiratorio y macrófago alveolar. En conjunto, estos datos son preliminares, y los resultados obtenidos pueden estar comprometidos por el diseño experimental empleado. Por ello, trabajo adicional será necesario para profundizar en la posible modulación del tráfico intracelular de HiNT por la administración del antibiótico macrólido azitromicina.

6. CONCLUSIONES

- a) Cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes EPOC presentan distinto perfil de PFGE, lo que sugiere que son clones distintos.
- b) En un muestreo de 5 clones/paciente y visita, la mayor parte de los aislados clínicos de HiNT de un mismo paciente presentan un mismo perfil de PFGE, lo que apoya la existencia de una asociación clon-paciente.
- c) Los 25 aislados de HiNT analizados no presentan el gen *rob-1*, lo que sugiere que las cepas resistentes a antibióticos β -lactámicos testadas son portadoras de otros mecanismos de resistencia a este tipo de antibióticos.
- d) La administración de azitromicina en células epiteliales A549 y macrófagos alveolares MH-S produce cambios (fundamentalmente agrandamiento) en el tamaño de los compartimentos subcelulares, observados al analizar la distribución de los marcadores de endosoma EEA-1 y LAMP-1.
- e) La administración de azitromicina no produce cambios estadísticamente significativos en la co-localización de HiNT375 (AZI^S):compartimentos subcelulares. Sin embargo, se observa una tendencia a una mayor co-localización HiNT375:EEA-1 en células tratadas con azitromicina que en células control no tratadas.
- f) No se observan variaciones en el porcentaje de co-localización HiNT353 (AZI^R):compartimentos subcelulares. Se observa una tendencia a una mayor co-localización HiNT353:LAMP-1 a lo largo del tiempo.
- g) La administración de azitromicina en macrófagos alveolares no produce cambios en el porcentaje de co-localización HiNT375:LAMP-1.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alder, J. D., P. J. Ewing, A. M. Nilius, M. Mitten, A. Tovcimak, A. Oleksijew, K. Jarvis, L. Paige & S. K. T. Tanaka, (1998) Dynamics of clarithromycin and azithromycin efficacies against experimental *Haemophilus influenzae* pulmonary infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 2385-2390.
2. Agrawal, A. & T.F. Murphy, (2011) *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* Type b conjugate vaccine era. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 3728-3732.
3. Albert, R.K., J. Connett, W.C. Bailey, R. Casaburi, J.A.D. Cooper, G.J. Criner, J.L. Curtis, M.T. Dransfield, M.L.K. Han, S.C. Lazarus, B. Make, N. Marchetti, F.J. Martinez, N.E. Madinger, C. McEvoy, D.E. Niewoehner, J. Porsasz, C.S. Price, J. Reilly, P.D. Scanlon, F.C. Sciurba, S.M. Scharf, G.R. Washko, P.G. Woodruff, N.R. Anthonisen & C.C.R. Network, (2011a) Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *New England Journal of Medicine* **365**: 689-698.
4. Celli, B.R. & P.J. Barnes, (2007) Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* **29**: 1224-1238.
5. Clementi, C.F. & T.F. Murphy, (2011) Non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion and persistence in the human respiratory tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **1**: 9.
6. De Chiara, M., D. Hood, A. Muzzi, D.J. Pickard, T. Perkins, M. Pizza, G. Dougan, R. Rappuoli, E.R. Moxon, M. Soriani & C. Donati, (2014) Genome sequencing of disease and carriage isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* identifies discrete population structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 5439-5444.
7. Friedlander, A. L. & R. K. Albert, (2010) Chronic macrolide therapy in inflammatory airways diseases. *Recent advances in chest medicine* **138**: 1202-1212.
8. Garmendia, J., P. Marti-Llitas, J. Moleres, C. Puig & J.A. Bengoechea, (2012a) Genotypic and phenotypic diversity of the noncapsulated *Haemophilus influenzae*: adaptation and pathogenesis in the human airways. *International Microbiology* **15**: 158-171.
9. Garmendia, J., P. Morey & J.A. Bengoechea, (2012b) Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *European Respiratory Journal* **39**: 467-477.
10. Garmendia, J., C. Viadas, L. Calatayud, J.C. Mell, P. Marti-Llitas, B. Euba, E. Llobet, C. Gil, J.A. Bengoechea, R.J. Redfield & J. Linares, (2014) Characterization of nontypable *Haemophilus influenzae* isolates recovered from adult patients with underlying chronic lung

- disease reveals genotypic and phenotypic traits associated with persistent infection. *Plos One* **9**: 17.
11. Gilsdorf, J.R., C.F. Marrs & B. Foxman, (2004) *Haemophilus influenzae*: Genetic variability and natural selection to identify virulence factors. *Infection and Immunity* **72**: 2457-2461.
 12. Hodge, S., G. Hodge, S. Brozyna, H. Jersmann, M. Holmes & P.N. Reynolds, (2006) Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. *European Respiratory Journal* **28**: 486-495.
 13. Hodge, S., G. Hodge, H. Jersmann, G. Matthews, J. Ahern, M. Holmes & P.N. Reynolds, (2008) Azithromycin improves macrophage phagocytic function and expression of mannose receptor in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **178**: 139-148.
 14. Hodge, S. & P.N. Reynolds, (2012) Low-dose azithromycin improves phagocytosis of bacteria by both alveolar and monocyte-derived macrophages in chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respirology* **17**: 802-807.
 15. LaCross, N.C., C.F. Marrs & J.R. Gilsdorf, (2013) Population structure in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infection Genetics and Evolution* **14**: 125-136.
 16. Lopez-Gomez, A., V. Cano, D. Moranta, P. Morey, F.G. del Portillo, J.A. Bengoechea & J. Garmendia, (2012) Host cell kinases, $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrins, and Rac1 signalling on the microtubule cytoskeleton are important for non-typable *Haemophilus influenzae* invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology-SGM* **158**: 2384-2398.
 17. Mammen, M.J. & S. Sethi, (2012) Macrolide therapy for the prevention of acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej-Polish Archives of Internal Medicine* **122**: 54-58.
 18. Martinez, F. J., J. L. Curtis & R. Albert (2008) Role of macrolide therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of COPD* **3**: 331-350.
 19. Morey, P., V. Cano, P. Marti-Llitas, A. Lopez-Gomez, V. Regueiro, C. Saus, J.A. Bengoechea & J. Garmendia, (2011) Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology-SGM* **157**: 234-250.
 20. Parnham, M.J., V.E. Haber, E.J. Giamarellos-Bourboulis, G. Perletti, G.M. Verleden & R. Vos, (2014) Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & Therapeutics* **143**: 225-245.
 21. San Millan, A., S. Garcia-Cobos, J.A. Escudero, L. Hidalgo, B. Gutierrez, L. Carrilero, J. Campos & B. Gonzalez-Zorn, (2010a) *Haemophilus influenzae* clinical isolates with plasmid

- pB1000 bearing bla(ROB-1): Fitness cost and interspecies dissemination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 1506-1511.
22. San Millan, A., J.A. Escudero, A. Catalan, S. Nieto, F. Farelo, M. Gibert, M.A. Moreno, L. Dominguez & B. Gonzalez-Zorn, (2007) β -lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid pB1000 bearing bla_(ROB-1). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 2260-2264.
23. Sethi, S., (2011) Molecular diagnosis of respiratory tract infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Infectious Diseases* **52**: S290-S295.
24. Sethi, S., N. Evans, B.J.B. Grant & T.F. Murphy, (2002) New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine* **347**: 465-471.
25. Tristram, S., M.R. Jacobs & P.C. Appelbaum, (2007) Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical Microbiology Reviews* **20**: 368-389.
26. Tyteca, D., P. Van der Smissen, M. Mettlen, F. Van Bambeke, P.M. Tulkens, M.P. Mingeot-Leclercq & P.J. Courtoy, (2002) Azithromycin, a lysosomotropic antibiotic, has distinct effects on fluid-phase and receptor-mediated endocytosis, but does not impair phagocytosis in J774 macrophages. *Experimental Cell Research* **281**: 86-100.
27. Tyteca, D., P. Van Der Smissen, F. Van Bambeke, K. Leys, P.M. Tulkens, P.J. Courtoy & M.P. Mingeot-Leclercq, (2001) Azithromycin, a lysosomotropic antibiotic, impairs fluid-phase pinocytosis in cultured fibroblasts. *European Journal of Cell Biology* **80**: 466-478.

8. ANEXO

Tabla A1: Experimentos realizados (listado completo) y seleccionados (indicados en naranja) para la cuantificación de co-localizaciones HiNT:compartmento subcelular en células A549 y macrófagos alveolares MH-S. SI: experimentos cuantificados. NO: experimentos no cuantificados por problemas técnicos. Gm: gentamicina. Exp: experimento. AZI+Gm: células tratadas con azitromicina durante el periodo de incubación con gentamicina.

Infección con la cepa HiNT375:

A549	EEA-1, 15 min Gm			LAMP-1, 15 min Gm			EEA-1, 60 min Gm			LAMP-1, 60 min Gm		
	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm
Exp. 1 (2/5/2014)	SI	NO	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI
Exp. 2 (8/5/2014)	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI	SI	NO
Exp. 3 (12/5/2014)	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Exp. 4 (20/6/2014)	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI

Infección con la cepa HiNT353:

A549	EEA-1, 15 min Gm			LAMP-1, 15 min Gm			EEA-1, 60 min Gm			LAMP-1, 60 min Gm		
	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm
Exp. 5 (19/5/2014)	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Exp. 6 (23/5/2014)	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Exp. 7 (4/8/2014)	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI

Infección con la cepa HiNT375:

MH-S	EEA-1, 15 min Gm			LAMP-1, 15 min Gm			EEA-1, 60 min Gm			LAMP-1, 60 min Gm		
	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm	Control	Pre-tratadas	AZI+Gm
Exp. 1 (2/7/2014)	NO	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO	NO	SI	SI	SI
Exp. 2 (21/7/2014)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	SI
Exp. 3 (5/8/2014)	NO	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO	NO	SI	SI	SI