

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



**Efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos
sobre las interacciones Fibronectina-Staphylococcus aureus**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ziad Daoud Ghafary

Directores

José Prieto Prieto

M^a Luisa Gómez-Lus Centelles.

Madrid

ISBN: 978-84-8466-833-6

© Ziad Daoud Ghafary, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. DE MICROBIOLOGIA II



***EFECTO DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS
DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES
FIBRONECTINA-Staphylococcus aureus.***

TESIS DOCTORAL

AUTOR : ZIAD DAOUD

DIRECTORES: Dr J. PRIETO PRIETO

y Dra ML GOMEZ-LUS CENTELLES

TUTOR : Dr C. NOMBELA CANO

MADRID, 1995



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

28040 MADRID

Dr. D. JOSE PRIETO PRIETO, CATEDRATICO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y D^{ña} M^a LUISA GOMEZ-LUS CENTELLES, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL MISMO DEPARTAMENTO

CERTIFICAN: Que el presente trabajo de investigación titulado:

"EFECTO DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES FIBRONECTINA-*Staphylococcus aureus*"

constituye la memoria presentada por D. ZIAD DAOUD para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia, y ha sido realizado en este departamento bajo nuestra dirección. Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Septiembre de mil novecientos noventa y cinco.

Director

Co-Directora

Fdo. J. Prieto

Fdo. M^aL. Gomez-Lus

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi especial agradecimiento al Pr. J. Prieto Prieto, catedrático del departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina-UCM, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación bajo su dirección y por su inestimable ayuda y constante interés, como por la confianza depositada en mí lo que ha sido una gran motivación a lo largo del trabajo. También a la Dra. ML Gomez-Lus, profesora titular del mismo departamento por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Pr. C. Nombela Cano, catedrático y director del departamento de Microbiología II de la facultad de Farmacia de la UCM por sus inestimables consejos y ayuda desde el primer día.

En especial a M^a Carmen y Hady, quienes han estado siempre a mi lado, por su ayuda y apoyo en todo momento, y por haberme brindado todo lo que necesitaba especialmente su comprensión y cariño.

A todos los compañeros del Dpto. de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la UCM, especialmente a Elisa por su amistad y su verdadera colaboración en la realización de este trabajo, a Guadalupe y Alvaro por su buena compañía, a mis compañeros de trabajo Eva, Luis, Miguel, Elena, y Olga a quienes deseo mucha suerte.

A Ricardo Mesanza, a Pedro Barquero y a todo el personal de Sani-Lab por su colaboración.

A mis padres y Fady, por su apoyo.

A las mejores mañanitas

y la mejor compañía,

A David Marcos con todo el amor de su tío,

*"Efecto de concentraciones subinhibitorias
de antimicrobianos sobre las interacciones
fibronectina-Staphylococcus aureus"*

INDICE

AVREVIATURAS	VII
I. INTRODUCCION	1
1. LA FIBRONECTINA	2
1.1. CONCEPTO Y CONOCIMIENTO HISTORICO	2
1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES	2
1.2.1. Estructura	2
1.2.2. Propiedades	4
1.3. FISIOLOGIA	5
1.4. FUNCIONES BIOLÓGICAS	6
1.5. INTERACCIONES FIBRONECTINA-SUPERFICIE	
CELULAR	9
1.5.1. La matriz extracelular	9
1.5.2. Adhesión de la fibronectina a la superficie celular . . .	10
1.5.3. Receptores de la adhesión celular (c.a.r.)	10
1.5.4. Receptores de la adhesión matricial (m.a.r.)	10
1.5.5. Moléculas que afectan las interacciones	11
1.6. INTERACCIONES FIBRONECTINA-<i>S.aureus</i>	11
1.6.1. Receptores de <i>S.aureus</i> en la fibronectina	11
1.6.2. Receptores de la fibronectina en <i>S.aureus</i>	12
1.7. SEPSIS Y FIBRONECTINA	13
1.7.1. Terapia de la sepsis con fibronectina	13
1.8. ENDOCARDITIS INFECCIOSA Y FIBRONECTINA	14
1.8.1. Definición	14
1.8.2. Fisiopatología	14
1.9. COAGULACION Y FIBRONECTINA	15
1.9.1. Interacciones fibronectina-fibrina/fibrinógeno	16
1.9.2. Interacciones fibronectina-colágeno y fibronectina-GAG	16
1.9.3. Fibronectina y plaquetas	16
2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS	17
2.1. DESCRIPCION	17
2.2. ESTRUCTURA ANTIGENICA	17
2.3. ACCION PATOGENA	18
2.3.1. Antígenos de superficie	18
2.3.2. Toxinas	18
2.3.3. Enzimas	19

2.4. CUADROS CLINICOS	20
2.4.1. Acción directa20	20
2.4.2. Acción fundamentalmente exotóxica	21
3. EFECTOS DE CONCENTRACIONES BAJAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS BACTERIAS	22
3.1. DEFINICIONES	22
3.2. EFECTOS SOBRE LA ESTRUCTURA BACTERIANA	23
3.3. EFECTOS SOBRE LA VIRULENCIA BACTERIANA	24
3.4. EFECTOS SOBRE LA ADHERENCIA BACTERIANA	24
4. ANTIMICROBIANOS	26
4.1. AMPICILINA	26
4.2. SULTAMICILINA	27
4.3. CEFOTAXIMA	28
4.4. TETRACICLINA	28
4.5. AZITROMICINA	30
4.6. KANAMICINA	31
4.7. CIPROFLOXACINO Y NORFLOXACINO	32
4.8. TEICOPLANINA	33
4.9. CLINDAMICINA	34
4.10. ESTRUCTURAS QUIMICAS	36
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	38
III. MATERIALES Y METODOS.	41
1. CALIBRACION DEL NEFELOMETRO	42
1.1. IMPRECISION	42
1.2. LIMITES DE DETECCION	42
1.3. LINEALIDAD	43
2. MICROORGANISMOS	43
3. ANTIMICROBIANOS	43
4. FIBRONECTINA HUMANA	44
5. ANTISUEROS	44
6. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS	44
7. PREPARACION DE LAS BACTERIAS PARA LOS ENSAYOS	45
8. ENSAYO ESTANDAR DE ADHESION DE LA FIBRONECTINA SOLUBLE A <i>S.aureus</i>	45
9. INFLUENCIA DE LOS PARAMETROS EN LAS	

INTERACCIONES FIBRONECTINA- <i>S.aureus</i>	46
9.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA	46
9.2. EFECTO DEL INOCULO BACTERIANO	46
9.3. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION	46
9.4. EFECTO DE LA FASE DE CRECIMIENTO	47
10. DETECCION DE LA COAGULASA Y DEL "CF"EN <i>S.aureus</i>	47
11. COAGULOS DE FIBRINA	48
11.1. PREPARACION	48
11.2. ENSAYO DE ADHESION A LOS COAGULOS	48
12. EFECTO DE CSI DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES FIBRONECTINA- <i>S.aureus</i>	49
12.1. CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS CON CSI	49
12.1.1. Determinación de las densidades ópticas	49
12.1.2. Preparación de las bacterias para los ensayos	49
12.2. ENSAYO DE ADHESION	50
12.1. Adhesión a la fibronectina libre	50
12.2. Adhesión a coágulos de fibrina	50
13. METODOS ESTADISTICOS	51
IV. RESULTADOS	52
1. CALIBRACION DEL NEFELOMETRO	53
1.1. IMPRECISION INTRA E INTERSERIE	53
1.2. LIMITES DE DETECCION	53
1.3. LINEALIDAD	53
2. DETERMINACION DE LA FN EN PLASMA Y SUERO	54
3. DETERMINACION DE LA FN TRAS INCUBACION DE <i>S.aureus</i> CON PLASMA, SUERO Y FN PURIFICADA	54
3.1. DETERMINACION TRAS INCUBACION CON PLASMA	54
3.2. DETERMINACION TRAS INCUBACION CON SUERO Y FN	55
4. EFECTO DE LOS PARAMETROS	56
4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA	56
4.2. EFECTO DEL INOCULO BACTERIANO	58
4.3. EFECTO DE LA FASE DE CRECIMIENTO	60
4.4. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION	62
5. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS	66
6. EFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES	

FIBRONECTINA- <i>S.aureus</i>	67
6.1. ANTIMICROBIANOS QUE DISMINUYEN	67
6.2. ANTIMICROBIANOS QUE AUMENTAN	79
6.3. ANTIMICROBIANOS QUE NO AFECTAN	86
7. FIBRONECTINA-COAGULOS DE FIBRINA	91
7.1. EFECTO DE LA FIBRONECTINA EN LA ADHESION DE <i>S.aureus</i> A COAGULOS DE FIBRINA	91
7.2. EFECTO DE LA REPLECION Y SATURACION	91
7.3. EFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA ADHESION A COAGULOS DE FIBRINA	94
8. EFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES FIBRINOGENO- <i>S.aureus</i>	96
V. DISCUSION	100
1. EVALUACION DEL MODELO EXPERIMENTAL	101
1.1. NEFELOMETRIA	101
1.2. USO DE PLASMA COMO FUENTE DE FIBRONECTINA	101
1.3. CRECIMIENTO DE <i>S.aureus</i> CON CSI	102
1.4. DEPOSITO POR CENTRIFUGACION DE LAS BACTERIAS CON LA FIBRONECTINA ADHERIDA	103
1.5. ELIMINACION DE LA FIBRONECTINA DEL PLASMA	103
1.6. USO DE COAGULOS DE FIBRINA	103
2. ANALISIS DE LOS RESULTADOS	104
2.1. DETERMINACION DE LA FIBRONECTINA DE PLASMA Y SUERO CORRESPONDIENTE	104
2.2. EFECTO DE INCUBACION DE <i>S.aureus</i> CON PLASMA, SUERO Y FIBRONECTINA PURIFICADA	104
2.3. ESTUDIO DE LOS PARAMETROS	107
2.3.1. Inóculo bacteriano	107
2.3.2. Temperatura	108
2.3.3. Fase de crecimiento	109
2.3.4. Tiempo de incubación	109
2.4. EFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES FIBRONECTINA LIBRE- <i>S.aureus</i>	110
2.5. EFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA PRODUCCION DE COAGULASA Y "CF" POR <i>S.aureus</i>	113
2.6. EFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE EL NIVEL DE	

FIBRONECTINA EN EL PLASMA	114
2.7. FIBRONECTINA-COAGULOS DE FIBRINA	115
2.7.1. Fibronectina y adhesión de <i>S.aureus</i> a coágulos	115
2.7.2. Efecto de la repleción y saturación del coágulo	118
2.7.3. Efecto de antimicrobianos sobre la adhesión a coágulos	118
3. POSIBLE APLICACION CLINICA	121
VI. CONCLUSIONES	123
VII . BIBLIOGRAFIA	126

ABREVIATURAS

C	Coagulasa
Fn	Fibronectina
Fg	Fibrinógeno
EI	Endocarditis Infecciosa
CF	Clumping Factor
SD	Desviación Estándar
SRE	Sistema Retículo-Endotelial
CID	Coagulación Intravascular Diseminada
PBP	Penicillin Binding Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
CSI	Concentraciones Sub-Inhibitorias
NBTV	Non Bacterial Thrombotic Vegetation
F XIIIa	Factor XIII activado

*"Efecto de concentraciones subinhibitorias
de antimicrobianos sobre las interacciones
fibronectina-Staphylococcus aureus"*

I. INTRODUCCION

1. LA FIBRONECTINA.

1.1. CONCEPTO Y CONOCIMIENTO HISTORICO.

En 1948, al estudiar las propiedades de las proteínas séricas y plasmáticas con el método de Cohn (fraccionamiento con etanol frío), junto al fibrinógeno precipitaba otra albúmina que se designó como globulina insoluble al frío (Cold Insoluble Globulin: CIG) (1).

En 1967, se identificó un factor antigelatina del plasma; al principio se le concedió poca importancia, hasta que se observó que parecía mucho inmunológica y estructuralmente a una proteína que en 1973 se localizó en la superficie de células epiteliales (2,3).

Entre 1973 y 1978, las investigaciones identificaron una glicoproteína que se encontraba en las superficies de muchas células (2,4). Esta glicoproteína compartía homología estructural y actividades inmunológicas y biológicas con la proteína plasmática (5-7).

En 1976, Keski-Ojal identificó en la composición de esta proteína dos subunidades con peso molecular de 220,000 daltons cada una, cuya composición es idéntica en cuanto a amino-ácidos y carbohidratos sea cual sea su origen (8).

Tanto a la proteína plasmática como a la fijada a las células, se designó genéricamente el nombre de "**fibronectina**" debido a su calidad de fijarse a proteínas fibrilares como fibrina, fibrinógeno y colágeno (fibra = fibra, nectere = fijar) (9).

Antes de 1976, un gran número de términos ha sido utilizado para describir estas glicoproteínas entre ellas: proteína de gran tamaño sensitiva a la transformación externa (LETS), antígeno soluble del fibroblasto, proteína de la superficie celular, factor de adhesión celular, proteína opsónica y alfa-2-glicoproteína opsónica del plasma (6,7,9).

1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES.

1.2.1. Estructura.

La fibronectina es una glicoproteína de gran tamaño y de peso molecular 440,000 daltons. Contiene aproximadamente 2300 amino-ácidos, es 5% carbohidrato y tiene un coeficiente de sedimentación de 12 S a 14 S (10,11). Esta proteína se encuentra en el organismo bajo dos formas: soluble en los líquidos extracelulares especialmente en la sangre, e insoluble fijada a las superficies de las células y en las matrices extracelulares.

Los análisis de amino-ácidos, ARNm y de secuencias de ADN genómico indican que la proteína está formada por tres tipos de secuencias o unidades de homología repetidas, de

45, 60 y 90 amino-ácidos y son respectivamente el tipo I, el tipo II y el tipo III. Estos tres tipos de unidades de homología forman más del 90% de las secuencias de amino-ácidos de la fibronectina (9,10).

La secuencia del tipo I contiene 45 a 50 amino-ácidos que se mantienen juntos gracias a dos lazos bisulfuros. Ambas regiones amino y carboxi-terminal de la molécula contienen este tipo. La secuencia de homología del tipo II está formada por 60 amino-ácidos unidos por dos lazos bisulfuros. Este tipo de secuencia de homología es específico del dominio de fijación del colágeno (40 Kdal) (10,11). La región central de la molécula se compone de secuencias de homología del tipo III. Estas unidades presentan 90 amino-ácidos y no tienen lazos bisulfuros, pero algunas secuencias de este tipo contienen dos grupos sulfídricos libres, la función de estos grupos sulfídricos no se conoce todavía; pues, bajo algunas condiciones, la formación de multímeros de elevado peso molecular de fibronectina puede ocurrir por oxidación de estos grupos sulfídricos. Los resultados de trabajos de incorporación de la fibronectina marcada en la matriz extra-celular de fibroblastos sugiere que el mecanismo de formación de multímeros de fibronectina unidos por puentes bisulfuros lleva un intercambio de bisulfuros en la zona del amino-terminal de la molécula (9-12).

En general, los cambios de exones provocados por la maduración alternativa de RNA no producen proteínas radicalmente diferentes sino un conjunto de proteínas de funciones comparables, llamadas proteínas isomorfas, modificadas para adaptarse al tejido concreto de que se trate. Experimentos de recombinación de DNA identificaron dos regiones en la molécula que varían cuando sucede un enlace diferencial del ARNm. Este enlace puede dar lugar a la formación de subunidades de fibronectina con secuencias de amino-ácidos diferentes. Un tal subtipo, identificado en células tumorales humanas y en fibroblastos, contiene una secuencia de homología-tipo III adicional denominada extra dominio (ED). La presencia de este extra dominio puede ser exclusiva a la fibronectina celular (13-15).

Otros subtipos de fibronectina pueden derivar de modelos de enlaces alternativos del ARNm en la región variable de la molécula. Al menos 5 tipos distintos de variaciones han sido identificados. La significación funcional de este extra-dominio de los subtipos variantes no se conoce exactamente (14,15).

Las secuencias de homología se organizan en filas lineales formando dos brazos o subunidades casi idénticas. Las diferencias entre las dos subunidades de la fibronectina plasmática resultan también de sucesos de enlace post-translacionales (15). La fibronectina se muestra en forma abierta cuando está depositada en una superficie y analizada con microscopio electrónico, mientras que en soluciones fisiológicas la punta de cada subunidad

suele plegarse hacia el interior para incorporarse en la terminación COOH del dominio de fijación del colágeno (dominio 2) dando a la molécula una forma globular. Cuando se encuentra en la matriz extra-celular, la fibronectina da lugar a filamentos multiméricos fibrosos (10,16,17).

Cada subunidad del dímero de fibronectina se puede dividir en dominios funcionales, que se llaman según la sustancia que fijan (ver la tabla 1). Los grupos N-amino terminal de las subunidades pueden bloquearse en presencia de ácido piroglutámico, y a partir de esto pueden determinarse los restantes amino-ácidos (10,17).

DOMINIO	NOMBRE DEL DOMINIO	ADHESIÓN A:
Nº1	Dominio de adhesión a la fibrina	Fibrina, heparina, <i>S.aureus</i> , F XII.
Nº2	Dominio de adhesión al colágeno y a la gelatina	Gelatina, colágeno, C1q, <i>S.pyogenes</i> .
Nº3	Dominio de adhesión al DNA	DNA
Nº5	-----	No se conoce
Nº6	Dominio de adhesión celular	Células, treponemas.
Nº8	Dominio de adhesión a la fibrina	Fibrina
Nº9	Carboxiterminus	¿ adhesión a <i>S.aureus</i> ?

Tabla 1: Los dominios funcionales de la fibronectina.

La secuencia de amino-ácidos en la molécula de fibronectina es la siguiente: Acido aspártico, alanina, treonina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, alfa-cistina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenil-alanina, lisina, histidina, triptófano, N-amino-terminal. La secuencia de carbohidratos es la siguiente: Acido siálico, exosa, exosamina.

1.2.2. Propiedades.

La fibronectina, junto al fibrinógeno, el factor XIII (F XIII, transglutaminasa del plasma) y el factor de von Willebrand (vWF), se precipita a 0°C con sulfato de amonio saturado al 25%, o con etanol a 8% (18).

Para purificar la fibronectina plasmática, se precipita el fibrinógeno con glicina 2.1 M a 10-15°C, o bien coagulando el plasma con bajas concentraciones de trombina. Después, una cromatografía (DEAE-celulosa) del sobrenadante consigue separar el F XIII y una cromatografía en gel de agarosa a 4% separa la mayoría de los multímeros de vWF de la fibronectina. A continuación, para aislar la fibronectina, se realiza una cromatografía en agarosa de gelatina y se trata la columna con solución de urea 6M (19-22). En la tabla 2 se resumen algunas propiedades de la fibronectina:

Es una beta-globulina
Tiene un coeficiente de sedimentación de 12 a 14 S
Su tamaño es de $4,4 \times 10^5$ daltons aproximadamente
Formada por dos subunidades casi idénticas
1.6 cisteínas libres por subunidad
Concentración sérica :de 20 a 50% inferior a la plasmática
Solubilidad:100 veces más soluble la plasmática que la celular

Tabla 2: Algunas propiedades de la fibronectina.

1.3. FISILOGIA.

Se sabe que la fibronectina se encuentra en dos formas: una dimerica y soluble, denominada la fibronectina plasmática, que circula por la sangre y por otros fluidos orgánicos, y otra forma insoluble que se puede dividir en dos, una oligomérica unida transitoriamente a la superficie celular (FN de la superficie celular) y otra fibrilar, altamente insoluble, localizada en la matriz extra-celular (FN de la matriz).

Inmunológicamente, la fibronectina se comporta de la misma manera sea cual sea su origen incluso entre distintas especies de vertebrados. La forma soluble está difundida en el plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico, líquido seminal, saliva y en exudados inflamatorios. Muchos tipos celulares la sintetizan y segregan pero la mayoría de la fibronectina plasmática es producida por los hepatocitos. Esta misma forma se puede encontrar depositada en la superficie de la mucosa bucal y vaginal (23,24). La fibronectina tiene una vida-media de 24 a 72 horas. Su destino después de quitar la circulación no se sabe, aunque sí se sabe que alguna parte se incorpora en la matriz extra-celular. En sujetos sanos, la concentración de la fibronectina plasmática guarda relación con la edad y el sexo. El

margen normal es de 250 a 600 $\mu\text{g/ml}$. En las mujeres, los valores plasmáticos son inferiores a los de los varones salvo en la edad post-menopáusia; en estos la concentración plasmática máxima se alcanza entre la cuarta y la quinta década de la vida (25).

A parte de los hepatocitos, que fabrican la mayor parte de la fibronectina, el origen de esta proteína se puede contribuir a: fibroblastos, células de la astrogliia, células endoteliales, musculares, epiteliales y plaquetas.

Los pacientes con disfuncionamiento hepático serio, con coagulopatía intravascular diseminada (CID), con enfermedades infecciosas graves como sepsis y los enfermos con alto riesgo de infección (quemados etc.) tienen el nivel de fibronectina en la sangre bajo como resultado de disminución de producción y/o aumento de consumo (25,26). En otros casos como durante una osteomielitis o conectivopatías como artritis reumatoide, la fibronectina aumenta su concentración en el líquido sinovial (27).

La otra forma de la fibronectina, la insoluble, se distribuye de una manera vasta en todos los tejidos donde se encuentra covalentemente unida en formaciones fibrosas multiméricas. La forma soluble se puede incorporar en estas fibras de la matriz extra-celular o bien en la superficie celular (10,11). Durante la transformación vírica, la fibronectina celular y matricial se pierde. La adición de fibronectina exógena a las células malignas implica una rediferenciación morfológica (5).

La separación proteolítica de la fibronectina pericelular produce una desorganización al nivel de los microfilamentos, lo cual altera la estructura celular y su capacidad de relación. Este mecanismo se considera fundamental en la oncogénesis. Ambas formas de fibronectina, la matricial y la celular (insoluble) y la plasmática (soluble) poseen los mismos determinantes antigénicos. Sin embargo, poseen diferencias estructurales mínimas, como lo que explicaría la menor solubilidad de la forma fija.

1.4. FUNCIONES BIOLÓGICAS.

Debido a su capacidad adhesiva, la fibronectina soluble interviene en la unión intercelular, adhesión de células a superficies de plástico y en la estabilización del coágulo de fibrina, también es importante en la curación de las heridas (10,28). La fibronectina que se encuentra depositada en el colágeno y en la fibrina aumenta la unión a las plaquetas, la migración de los fagocitos y fibroblastos y la proliferación celular. La fibronectina favorece la unión entre las células, ayudando a mantener la estructura del citoesqueleto (28,29).

El proceso de curación conlleva la formación por parte de los fibroblastos de una película de fibronectina que serviría como base donde se depositan componentes de la matriz extra-celular (10,28,30); además la fibronectina ayuda a la neovascularización estimulando la migración de las células endoteliales. Del mismo modo, esta proteína sirve como guía para el movimiento de las células epidérmicas a través de los tejidos y ayuda a la reorganización de la membrana basal y asegura una queratinización normal.

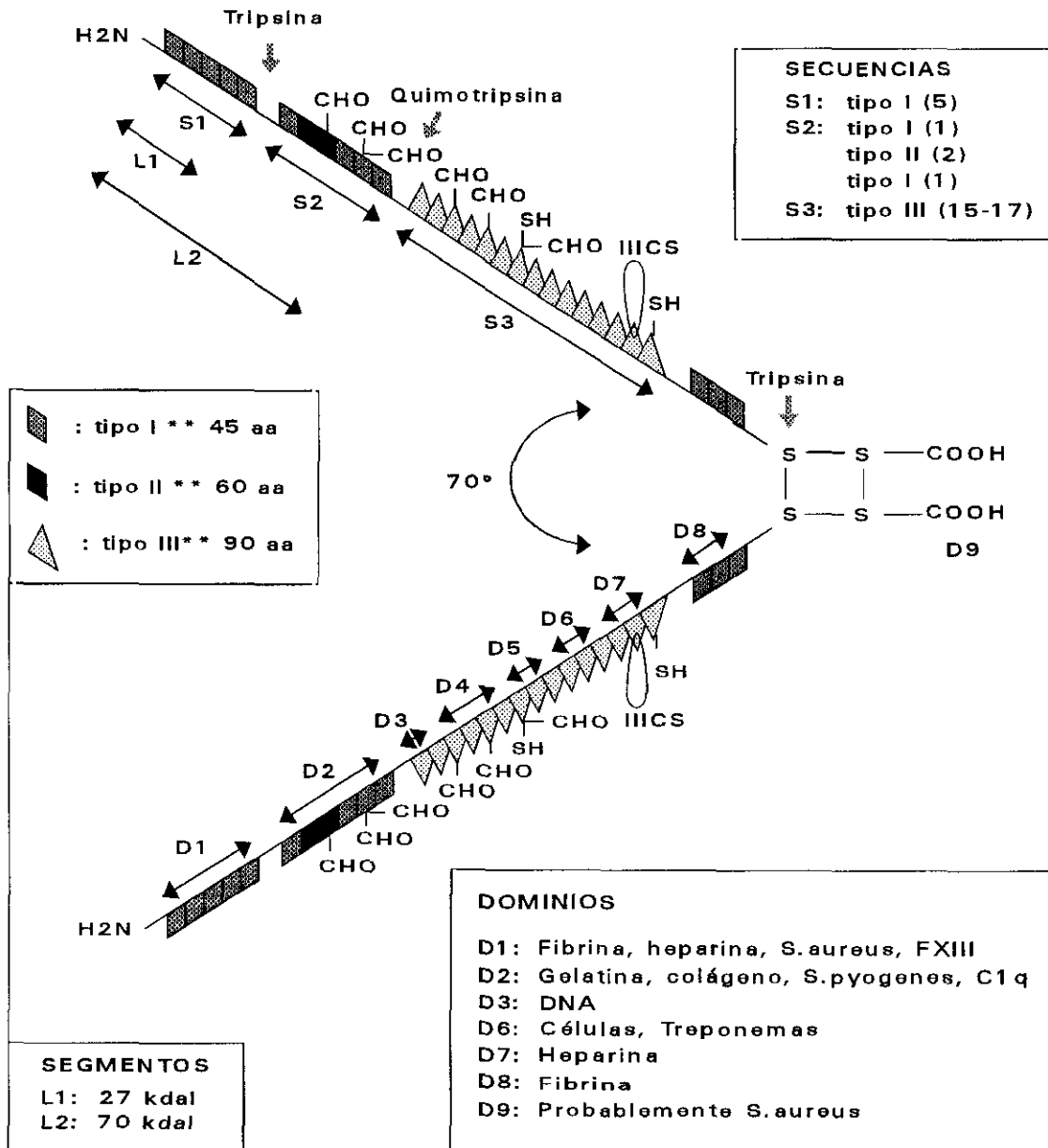
La fibronectina es importante en la embriogénesis y en la regeneración de los nervios. La introducción de la fibronectina en estos procesos se puede prever del hecho de que la proteína juegue un papel importante en la adhesión, migración y diferenciación celular (28-30). Siendo células jóvenes que necesitan diferenciarse, las células procedentes de la médula ósea como los linfocitos B y los monocitos tienen una interacción bastante importante con la fibronectina, ésta aumenta la adhesión de una linfoquina a los macrófagos, la expresión de los receptores de Fc en macrófagos, la adherencia y quimotaxis de los fagocitos y ayuda a mantener la capacidad oxidativa-bactericida de los macrófagos (31,32).

Ante agentes inductores de agregación plaquetaria, la fibronectina plaquetaria se encuentra en la superficie de las plaquetas y se comporta como puente de unión entre ambas. La fibronectina se encuentra también en áreas de fibrosis e inflamación. Algunas veces se incluye en los complejos inmunes encontrados en pacientes con enfermedades bacterianas reumáticas (10,11).

La fibronectina se localiza sobre todo en zonas de regeneración celular y tisular, de forma interendotelial en membranas basales, paredes vasculares, tejidos conjuntivos y ligada intracelularmente a la actina. La forma soluble es capaz de adherirse a sustancias susceptibles de ser fagocitadas como fragmentos de membranas, agregados de fibrina, inmunocomplejos, bacterias y otros microorganismos desempeñando de esta manera el papel de una opsonina inespecífica (28-31).

Por otro lado, la fibronectina puede servir como base a la adhesión bacteriana a los tejidos, y por tanto un paso importante en el proceso de la infección. No se ha observado anomalías congénitas calificativas ni cuantitativas, probablemente porque defectos genéticos de este tipo son letales teniendo en cuenta las importantes funciones de la fibronectina en la morfogénesis y la fisiología. Las interacciones entre fibronectina y bacterias, fagocitos y componentes del complemento presenta una explicación en la patogenia de muchas enfermedades y puede servir como prototipo de las interacciones existentes entre bacterias y proteínas estructurales del huésped (29-32).

La fibronectina



1.5. INTERACCIONES FIBRONECTINA-SUPERFICIE CELULAR.

1.5.1 Matriz Extra-celular.

Las macromoléculas que forman la matriz extra-celular proceden, fundamentalmente de una secreción celular de carácter local y se clasifican en dos clases principales de macromoléculas:

1- los polisacáridos del tipo de glucosaminoglucanos (GAG), las cuales se hallan unidas a proteínas, mediante enlaces covalentes, en forma de proteoglucanos.

2- las proteínas fibrosas, pertenecientes a dos tipos funcionales: las que son principalmente estructurales como el colágeno y la elastina y las que son fundamentalmente adhesivas como la fibronectina y la laminina.

1.5.2. Adhesión de la Fibronectina a la Superficie celular.

"In vitro", la fibronectina se sintetiza por casi todos los tipos de células y se encuentra en forma soluble en el medio de cultivo y en forma insoluble en la matriz extra-celular como multímeros unidos por puentes bisulfuros (10,23-25).

Como se demostró, la fibronectina plasmática difiere de la fibronectina celular; son similares pero no son idénticas. La fibronectina celular tiene la exclusividad de tener una secuencia de homología adicional del tipo III llamada "**extra dominio**" (ED). La significación funcional de este extra-dominio no está todavía muy clara, pero el hecho de que esta secuencia pertenezca solamente a la fibronectina celular le otorga un papel en la organización de los tejidos.

Una de las funciones más importantes de la fibronectina es la capacidad de intervenir en la adhesión celular. Cuando se fija en superficies de plástico o vidrio, la fibronectina asegura una adhesión y diseminación de una gran variedad de células. Esta capacidad de adherirse a las células se localiza en la parte central de la molécula, en concreto en la secuencia de cuatro amino-ácidos: Arg, Gly, Asp, y Ser,(RGDS). La diseminación y distribución de las células incluye más dominios de la molécula. En las superficies de células se pudo caracterizar el receptor de la fibronectina (cell attachment receptor-car), es un complejo glicoprotéico de 140 Kdal.

Los fibroblastos, las células de músculos lisos, las células epiteliales y endoteliales,

los monocitos, neutrófilos y las plaquetas son todos capaces de interactuar con la fibronectina cuya forma plasmática se puede incorporar en la matriz extra-celular de los tejidos. El origen de la fibronectina celular "in vivo" no se conoce exactamente aunque se ha demostrado que la forma plasmática constituye una parte de la tisular, en este sentido la fibronectina contribuye a la reparación tisular después del traumatismo (30,33).

1.5.3. Receptores de la Adhesión Celular (car).

Se han identificado los posibles receptores de la fibronectina en las superficies celulares, la mayoría de estas identificaciones se hicieron con anticuerpos que inhiben la adhesión celular mediada por la fibronectina e identificaron dos clases de proteínas que pueden funcionar como receptores de la fibronectina: un complejo de 140 Kdal y una glicoproteína de 47-48 Kdal, el receptor de 140 Kdal reconoce el dominio de adhesión celular (RGDS) en la fibronectina, el de 47-48 Kdal no se sabe donde adhiere pero se supone que en un sitio distinto al primero.

Los resultados de dos estudios han demostrado la interacción directa entre el complejo de 140 Kdal localizado en células humanas y el dominio responsable de la adhesión a las células en la fibronectina. Los dos estudios se hicieron con afinidad cromatográfica con elección específica del complejo protéico mediante el uso de péptidos sintéticos que contienen la secuencia activa RGDS (33,34).

1.5.4. Receptores de la Adhesión Matricial (mar).

Los fibroblastos adheridos a sustratos fijan la fibronectina soluble a su superficie celular y a continuación la integran y organizan en fibrillas extra-celulares insolubles.

La adhesión de la fibronectina a las células es reversible, específica y saturable. La(s) molécula(s) de la matriz extra-celular que asegura(n) la adhesión a la fibronectina siguen siendo poco conocidas; son resistentes al tratamiento con colagenasa, heparinitasa, hialuronidasa y condroitinasa, lo que implica que el receptor no es ni el colágeno ni un glicosaminoglicano. Este receptor se denominó "matrix assembly receptor (34).

Los receptores son de afinidad relativamente alta, alcanzan la saturación máxima con 10 μ g de fibronectina por ml. La capacidad de adherirse a este receptor reside en un fragmento de 70 Kdal en la fibronectina que contiene los dominios de adhesión a la heparina y a la gelatina (ver figura de fibronectina, segmento L2). La tripsinización de este fragmento da lugar a un fragmento de 27 Kdal amino-terminal y otro de 40 Kdal que tiene la capacidad de adherirse a la gelatina (17,33-36).

1.5.5. Moléculas que afectan las interacciones fibronectina-célula.

Debido a que la fibronectina contiene dominios específicos de adhesión a la gelatina y a la heparina, se hicieron estudios para ver si el colágeno y los proteoglicanos que contienen sulfato de heparán servían como receptores para el depósito y la incorporación de la fibronectina en la matriz. Los resultados inmuno y bioquímicos mostraron que la fibronectina y el proteoglicano se encuentran unidos a la matriz extra-celular de un cultivo de fibroblastos. También, se supone que hay una correlación entre la cantidad de fibronectina y el sulfato de heparán depositado en algunos sitios de la superficie celular. Probablemente, estas moléculas no funcionan como receptores primarios de la adhesión de la fibronectina a las células y tejidos; la preincubación de fibronectina soluble con heparina o colágeno, no inhibe, sino favorece la adhesión (17,32-34,36). El tratamiento de las células con heparitinasa no afecta ni a la unión inicial de la fibronectina a las células, ni a la capacidad de las células de depositar la fibronectina soluble en su matriz, pero este tratamiento inhibe la diseminación y la dispersión de la fibronectina; esto sugiere que después de la unión inicial entre las células y la fibronectina (mediante el fragmento de 140 Kdal), interacciones secundarias pueden tener lugar entre el heparán en las superficies celulares y la fibronectina. A continuación la organización de la fibronectina en fibrillas da lugar a interacciones que estabilizan la adhesión del proteoglicano y del colágeno a la fibronectina (17,33-36).

1.6. INTERACCIONES FIBRONECTINA-STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

1.6.1. Receptor de *S.aureus* en fibronectina.

Siendo una molécula larga con muchos dominios, es importante conocer el dominio de adhesión de *S.aureus* en la fibronectina (37-40,42-45).

Utilizando las proteasas, diferentes fragmentos de fibronectina han sido aislados. Una ligera tripsinización da lugar a un fragmento NH₂-terminal de 27 Kdal y a un fragmento COOH-terminal de 180 Kdal.

Estudios de adhesión competitiva mostraron que el fragmento de 27 Kdal era tan activo como la molécula completa de fibronectina en cuanto a la inhibición de la adhesión de fibronectina a *S.aureus*. Dos grupos describieron otro sitio de adhesión en el fragmento de 180 Kdal; estos estudios se hicieron con microorganismos muertos por calor o con formaldehído. Trabajando con microorganismos vivos, este fragmento de 180 Kdal ayuda a la adherencia de *S.aureus* a la forma insoluble (38,41).

La estructura dimérica de la fibronectina indica que cada brazo de la molécula lleva un dominio de adhesión a *S.aureus*; sin embargo esta proteína flexible puede unirse a dos estafilococos al mismo tiempo produciendo aglutinación (39-42). Algunas cepas de *S.aureus* se aglutinan con 3 mg/l (concentración 100 veces menor que la plasmática) (39).

1.6.2. Receptores de fibronectina en *S.aureus*.

Kuusela describió en 1978 que la fibronectina adhiere a *S.aureus*. Después se descubrió que se trata de una adhesión saturable y específica. Los análisis de Scatchard revelaron un rango de 100-20.000 receptores de fibronectina por microorganismo (38-41).

a- Localización

El tamaño de la molécula de fibronectina y el uso del fragmento de 27 Kdal indican una localización superficial del receptor. Esto lleva a la idea de que el receptor de la fibronectina en *S.aureus* se encuentra en las partes exteriores de la membrana celular. Este receptor se quita fácilmente mediante tripsinización o sonicación suave (38,39).

b- Caracterización

Entre los investigadores que han trabajado sobre este tema, algunos describieron el receptor como una proteína, mientras que otros grupos lo describieron como compuesto primariamente de carbohidratos. Otro grupo presentó datos sugiriendo que el receptor es la proteína A (39,41,42).

La resolución de los resultados conflictivos sobre la naturaleza de estos receptores necesita su previa purificación, caracterización y localización. la posibilidad de que existan dos receptores distintos de la fibronectina en *S.aureus* ha sido estudiada durante muchos años. En un trabajo reciente se demostró que dos genes codifican una proteína transmembranaria que interactúa con la fibronectina, Estos dos genes muestran analogía con el gen responsable de la formación de la proteína A. La mutación de estos genes hace que *S.aureus* pierda la capacidad de adhesión a la fibronectina fija. El número de receptores en estafilococo depende de la fase de crecimiento, el pH y el medio utilizado (42-45).

S.aureus en fase logarítmica de crecimiento expresa más receptores de la fibronectina que aquellas bacterias en fase estacionaria. La encapsulación de *S.aureus* tiene tendencia a aumentar durante la fase estacionaria, este desarrollo puede explicar en parte la disminución de interacción entre fibronectina y bacteria, pero se ha visto que algunas cepas, aunque

encapsuladas, expresan un gran número de receptores, mientras que otras no encapsuladas no lo expresan (42-44).

c- Expresión de receptores

El número de receptores de fibronectina en aislados clínicos de *S. aureus* guarda relación con la capacidad de esta bacteria de invadir el cuerpo humano e infectarlo (41,43,44). El tratamiento de aislados clínicos (infecciones de tejidos blandos) con la fracción soluble de fibronectina muestra que estos microorganismos tienen más receptores que otras cepas no patógenas (38-40).

1.7. SEPSIS Y FIBRONECTINA.

Durante una sepsis, los niveles de fibronectina plasmática se alteran y se encuentran excesivamente bajos, como es el caso de la septicemia neonatal donde se considera la fibronectina como marcador o predictor de la enfermedad merced a su consumo aparente. Los niveles de fibronectina en la sangre se pueden considerar como factores que reflejan una buena respuesta del enfermo frente a la infección (46-48).

El papel que se supone que la fibronectina juega durante dicha enfermedad incluye su función de opsonina no específica mediadora de la función del sistema retículo endotelial (SRE). También el papel de la fibronectina celular y tisular en el mantenimiento de la integridad celular endotelial parece ser importante en este sentido (48,49).

1.7.1. Terapia de la sepsis con fibronectina.

La posibilidad de la terapia de sepsis con fibronectina ha conducido a estudios e investigaciones a base de tratamiento con fibronectina; como resultado, se ha observado una recuperación de la concentración plasmática de la proteína después del tratamiento, la profilaxis de infecciones con fibronectina no ha sido elaborada (46).

A pesar de todo, la bajada de fibronectina plasmática se puede considerar como marcador que ayuda al diagnóstico de esta enfermedad, la vuelta a la normal de los niveles de fibronectina puede indicar una mejoría del estado clínico del enfermo (48,49).

1.8. ENDOCARDITIS INFECCIOSA Y FIBRONECTINA.

1.8.1. Definición.

La endocarditis infecciosa (EI) se define como una infección localizada en la superficie del endocardio. La mayoría de las veces ocurre en el endocardio valvular, pero en otros casos sucede sobre defectos septales o en el propio endocardio mural. La endocarditis es una enfermedad asociada clásicamente a los gram-positivos, por su mayor adherencia a las alteraciones causadas por las turbulencias del flujo sanguíneo en el endotelio o por su conocida predilección por los materiales protésicos. Las novedades más interesantes de los últimos años en cuanto a la EI se refieren a cambios en la incidencia, en los microorganismos responsables, en las cardiopatías predisponentes, en la incorporación de nuevas técnicas de diagnóstico, en la emisión de nuevos criterios clínicos y en las pautas de tratamiento (50-54). *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.* son frecuentemente responsables de la infección. Los bacilos gram-negativos, *Coxiella burnettii* y los hongos, especialmente *Candida spp.*, constituyen las causas de menor frecuencia, pero de gran virulencia sobre todo en ciertas situaciones clínicas y en determinados huéspedes (50,52,53,62).

A diferencia del concepto clásico de que las endocarditis asientan casi siempre sobre válvulas previamente dañadas por enfermedad reumática, hoy se conocen otros tipos de valvulopatías como las cardiopatías congénitas e incluso corazones previamente sanos que desarrollan la endocarditis. Además de las manipulaciones clásicamente consideradas factores predisponentes como cirugía dental, manipulaciones urológicas, etc., hoy en día, la cirugía cardíaca, la utilización de material intravenoso y la drogadicción representan causas predisponentes a la endocarditis (65-70).

En una reciente publicación de Watanakunakorn et al se revisa la experiencia de EI en un hospital durante los años 80. La endocarditis pasó de 0.32 episodios por 1000 ingresos/año en 1980 a 1.3 episodios en 1990 (74).

1.8.2. Fisiopatología

Normalmente el endotelio vascular sano es resistente a las infecciones bacterianas, en algunas circunstancias, como traumatismo de la superficie endotelial del corazón o de los vasos sanguíneos se originan lesiones compuestas principalmente de plaquetas y de fibrina (la masa de fibrina contiene incluidas otras proteínas de la sangre como la fibronectina que constituye 4.4 % de la masa del coágulo de fibrina), a este depósito de plaquetas y fibrina que se conoce como vegetación trombotica no bacteriana (non bacterial thrombotic vegetation-

NBTV) se adhieren los microorganismos que se pueden encontrar en la circulación, y así, se pueden multiplicar iniciando un foco infeccioso intravascular. A continuación los microorganismos se encajan rápidamente en capas adicionales de fibrina y plaquetas, fenómeno que permite a las bacterias tener un lugar fijo para establecer una infección constante sin perder la capacidad de escaparse algunas bacterias a través de esta formación porosa en la circulación general (50,53,62). Así, hay cuatro series de sucesos que parecen ser necesarios para el inicio de endocarditis infecciosa:

- 1- Daño del epitelio con depósito de plaquetas y fibrina formando un NBTV.
- 2- Descarga de microorganismos en la circulación general a partir de un sitio periférico.
- 3- Adherencia de los microorganismos al NBTV que cubre el endotelio dañado, y a continuación un depósito de fibrina y plaquetas adicionales cubriendo de esta manera el agente infeccioso.
- 4- Multiplicación de los microorganismos dentro de la vegetación plaquetas-fibrina.

1.9. COAGULACION Y FIBRONECTINA.

1.9.1. Interacciones fibronectina-fibrina/ Fibrinógeno.

La concentración de fibronectina en el suero es de 20 a 50 % inferior a la del plasma; esta diferencia es todavía más grande si la coagulación ocurre a una temperatura de 0 a 4°C (84,85,89).

La incorporación de la fibronectina en el coágulo a 37°C se debe a un "cross-linking" mediado por el factor XIIIa entre la fibronectina y la cadena alfa de la fibrina mientras que la incorporación de la fibronectina en el coágulo a temperaturas bajas se debe a dos tipos de uniones. A parte de la fibronectina, la única proteína plasmática que se incorpora en el coágulo de fibrina dependientemente del factor XIII es la proteína Alfa-2 plasmin inhibitor protein(alpha-2 PIP) (85-87). Aproximando la concentración del fibrinógeno en el plasma a 2.4 g/ml, 100% de esta cantidad se incorpora en el coágulo. Si se aproxima la concentración de la fibronectina en el plasma a 320 mg/ml de la cual 35% se incorpora en el coágulo, y la concentración de la alpha-2 PIP a 69 mg/ml de la cual 24% se incorpora en el coágulo (88,89), este coágulo será formado por:

- 94.9% de fibrina
- 4.4% de fibronectina
- 0.7% de alpha 2-PIP.

La fibronectina es importante e imprescindible por la crioprecipitación de los complejos fibrinógeno-fibrina, aunque estos complejos estén saturados con fibrina. La fibronectina actúa como un núcleo y la proporción de fibronectina-fibrinógeno-fibrina en el precipitado es aproximadamente de 0.05-0.8-0.2. Estos complejos se encuentran en el plasma de pacientes con Coagulación Intravascular Diseminada (CID) (82).

Aunque la fracción del plasma normal que se precipita con heparina contiene 65% de fibrinógeno y 35% de fibronectina, este precipitado se puede formar con plasma que carece de fibrinógeno.

La unión de la fibronectina a la fibrina aumenta intensamente la adhesión y la distribución de las células en la superficie del sustrato pretratado con fibrina. La fibronectina plasmática acelera la conversión del plasminógeno en plasmina mediante la acción de la urokinasa (79,89).

1.9.2. Interacciones Fibronectina-colágeno Y fibronectina-glucosaminoglucanos.

La fibronectina adhiere, y puede unirse mediante el factor XIIIa, a diferentes tipos y formas del colágeno. Aunque los trabajos son un poco contradictorios, se pueden generalizar algunos aspectos:

Entre 4 y 20°C, la fibronectina interactúa mejor con el colágeno desnaturalizado y con fragmentos de colágeno que con el colágeno nativo. A 37°C, la interacción de la fibronectina con el colágeno nativo tipo I ocurre sólo en el sitio de rotura del colágeno por la colagenasa. Como la colagenasa corta la cadena alfa-1 del colágeno tipo I en un sitio donde carece la prolina y la hidroxiprolina, puede haber un desenrollamiento de la hélice del colágeno en este sitio a 37°C. El colágeno intersticial (tipo I, II y III) interactúa mejor con la fibronectina que el colágeno de la membrana (tipo IV y V). A 4°C, la heparina induce la precipitación de la fibronectina en formas filamentosas (89).

1.9.3. Fibronectina y plaquetas.

Las plaquetas contienen 2-4 microgramos de fibronectina por cada 10^9 plaquetas, o sea 0.5% del contenido de la sangre en fibronectina. La fibronectina plaquetaria se encuentra asociada a los gránulos alfa y se libera cuando las plaquetas se estimulan en presencia de trombina o colágeno (88,89). La fibronectina plasmática bloquea la capacidad del colágeno de liberar la serotonina de las plaquetas (79,81,89).

2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

2.1. DESCRIPCION.

S. aureus es un coco gram positivo de 1 micra de diámetro, los cocos se suelen agrupar en racimos, pero algunos, especialmente cuando se examina en muestras patológicas, se presentan en células separadas o agrupadas en dos (92,93).

S. aureus no se esporula, es inmóvil y generalmente no capsulado. Cuando crece en agar sangre por 24 horas a 37°C da lugar a colonias circulares de 2 a 3 mm de diámetro con superficie lisa y brillante. Estas colonias parecen opacas y frecuentemente pigmentadas, algunas cepas no tienen pigmento. *S. aureus* es resistente a la sal y se puede aislar selectivamente de heces y alimentos utilizando medios con 7-10% de NaCl (91,92).

S. aureus se caracteriza por:

- 1- producción de una enzima extra-celular, la **coagulasa**, que convierte el fibrinógeno del plasma en fibrina ayudado por un activador plasmático.
- 2- Producción de nucleasas termoestables que rompen el ADN (DNAsas)
- 3- Producción de proteínas asociadas a la superficie celular entre ellas una llamada factor de unión o "**Clumping Factor**" o "bound coagulase" que actúa con el fibrinógeno (95). Otra proteína de la superficie es el receptor de la fibronectina.

2.2. ESTRUCTURA ANTIGENICA.

La estructura antigénica de *S. aureus* es compleja y poco conocida. En la pared celular se han mostrado cerca de 30 antígenos, y los más importantes son (90-93):

1- El polisacárido A, específico de especie, constituido por ácidos teicóicos, polímeros de fosfato de robitol, que están unidos al peptidoglicano por enlaces covalentes. son antigénicos e inducen la aparición de anticuerpos.

2- La proteína A, específica de especie, se encuentra en la pared celular y se libera en el medio. Presenta la propiedad de unirse a la extremidad Fc de las IgG normales y a la extremidad F(ab)2 de las IgG específicas, así como de activar el complemento.

3- Proteínas responsables de la tipoespecificidad.

2.3. ACCION PATOGENA.

Es debida fundamentalmente a la acción de antígenos de superficie, toxinas y enzimas.

2.3.1. Antígenos de superficie.

Los antígenos superficiales de la pared celular y de la cápsula tienen propiedades antifagocitarias. La proteína A tiene la capacidad de combinarse con el fragmento Fc de las IgG y es responsable de su acción antifagocitaria al impedir la fijación de las IgG en los receptores del fagocito; además el complejo proteína A-IgG activa el complemento y produce la liberación de factores quimiotácticos (C5a), que contribuyen al carácter piógeno de las lesiones estafilocócicas.

Por otra parte, el complejo estafilocócico+IgG, que deja libre el fragmento F(ab)₂, hace que éste pueda combinarse con su antígeno específico, lo que produce la aglutinación de los estafilococos (coaglutinación).

2.3.2. Toxinas.

Cuando *S. aureus* se desarrolla en medios adecuados, puede producir diversas toxinas, que se encuentran en relación con estados de lisogenia o asociadas a la presencia de plásmidos. Las toxinas de mayor importancia son (90-94):

a- Hemolisinas: Son exotoxinas protéicas termolábiles, presentan una acción lítica sobre los hematíes y una acción tóxica sobre otras células (leucocitos, macrófagos, fibroblastos). En realidad son toxinas citolíticas o citotóxicas, se conocen cuatro toxinas o hemolisinias: alfa, beta, gamma y delta.

b- Leucocidinas: Además de las leucocidinas asociadas con hemolisinas, existen leucocidinas no hemolíticas (factor de Panton y Valentin), compuestas por dos subunidades F y S, que se fijan en los fosfolípidos de la membrana de los polimorfonucleares y macrófagos y producen alteraciones de la permeabilidad ocasionando la muerte de los fagocitos. Por otra parte, los estafilococos patógenos se caracterizan por su capacidad de supervivencia y de multiplicación en los fagocitos, a la diferencia de los no patógenos.

c- Exfoliatinas: Algunas cepas de *S. aureus*, en su mayoría del fagogrupo II,

son capaces de producir una exotoxina protéica dermótopa, que a partir de una lesión local difunde por la sangre y llega a la piel, donde produce enrojecimientos y lesiones bulbosas seguidas de una exfoliación más o menos extensa.

d- Enterotoxinas: Son enterotoxinas protéicas que presentan la propiedad de ser resistentes al calor y los fermentos proteolíticos (jugo gástrico). Se fijan en los receptores nerviosos del tubo digestivo y producen náuseas, vómitos y diarrea, por acción de la toxina sobre el centro del vómito. Son antigénicas y se transforman en anatoxinas. Se conocen seis enterotoxinas (A,B,C1,C2,D y E), que se identifican por inmunodifusión.

2.3.3. Enzimas.

a- Coagulasas: La coagulasa libre es un fermento que, en presencia de protrombina y/o de un factor plasmático sanguíneo (CRF), forma un complejo con actividad proteolítica que transforma el fibrinógeno en fibrina y produce la coagulación del plasma sanguíneo; a su vez, se liberan fibrinopéptidos que presentan acción sobre la fibra muscular lisa. Se considera relacionada con la virulencia, pues la mayoría de las cepas de *S.aureus* la producen (98%). La coagulasa interviene en el proceso inflamatorio y en la producción del coágulo intravenoso. Existe además una proteína de la pared celular que presenta una acción semejante (coagulasa combinada o clumping factor), que se ha supuesto que sería la causa de la formación de una cubierta protectora de fibrina responsable de la agrupación de los estafilococos y probablemente de su acción inhibitoria de la fagocitosis.

b- Fibrinolisin (estafiloquinas): Transforman el plasminógeno en plasmina o fibrinolisisina, que descompone las mallas de fibrina. Contribuyen a la capacidad de invasión del estafilococo en los focos inflamatorios y es responsable de la descomposición del coágulo de fibrina y de la formación de microémbolos causantes de la metástasis supuradas.

c- Penicilinasas: Son beta-lactamasas sintetizadas por las cepas resistentes que inactivan la penicilina por apertura del anillo beta-lactámico. Su producción se debe a un plásmido que se transmite por transducción.

d- Otros enzimas: Existen otras enzimas, como hialuronidasas, desoxirribonucleasas termoestables, fosfatasas y lipasas, que ayudan al establecimiento de la infección, invasión y producción de lesiones, y que en cierta manera se encuentran relacionadas con la virulencia.

2.4. CUADROS CLINICOS.

S. aureus puede formar parte de la flora normal de las personas sanas y se halla en la mucosa nasal del 20 al 40 % y en la piel del 10 al 20 %, especialmente en las manos y periné. Se ha observado que, cuando los portadores sufren intervenciones quirúrgicas, son más frecuentes los casos de sepsis. Pero, además, interviene en la mayoría de las infecciones y puede actuar por acción directa en relación con su capacidad invasiva o por mecanismo indirecto, por sus toxinas. En el primer caso produce lesiones supuradas y necróticas, cuyo grado de invasión depende de la combinación de toxinas y enzimas que elabora, en relación con el estado del huésped. En el segundo caso, es la causa de procesos inflamatorios en el tubo digestivo (enterotoxinas) o en la piel (toxina exfoliativa) (93,94).

2.4.1 Acción directa.

a- Infecciones localizadas en la piel y las mucosas. La más benigna es la foliculitis. Puede producir panadizos, infecciones de las heridas y quemaduras, abscesos subcutáneos y submucosos. En los niños produce el impétigo contagioso cuando afecta las capas superficiales de la piel de la cara, y el pénfigo del recién nacido. Produce la mayoría de infecciones superficiales supuradas, sobre todo de la piel, que constituyen la puerta de entrada del estafilococo en el organismo (92-94).

b- Infecciones metastáticas de localización visceral. Los estafilococos, ya libres o en el interior de leucocitos polinucleares, pueden difundir por vía linfática o hemática y colonizar tejidos y órganos diversos, donde producen lesiones piógenas y abscesos: meningitis, artritis, pleuritis, osteomielitis en niños y adultos jóvenes, abscesos pararrenales en personas de edad avanzada, endocarditis frecuentes en drogadictos. Son especialmente graves la neumonía o bronconeumonía estafilocócicas, que se presentan muchas veces consecutivas a una gripe (92-94).

c- Procesos generalizados. Van precedidos por la formación del trombo o coágulo intravenoso, a partir del cual el microorganismo se multiplica e invade la sangre (septicemia). Se pueden presentar formas hiperagudas rápidamente mortales (tromboflebitis del seno cavernoso consecutiva a furúnculos del labio superior) y formas agudas menos graves, subagudas y aún crónicas (92-94).

2.4.2. Acción fundamentalmente exotóxica.

a- Cuadros de intoxicación alimentaria: El consumo de alimentos contaminados por estafilococos que han elaborado enterotoxina, en especial productos de pastelería que contienen crema, puede producir gastroenteritis (92-94).

b- Cuadros de enterocolitis aguda: En el curso del tratamiento con antibióticos de amplio espectro que ocasionan la destrucción de la flora normal del tubo digestivo (92-94).

c- Toxina exfoliativa-Síndrome de liell.

d- Síndrome del shock tóxico: Caracterizado por fiebre, eritrodermia generalizada, edema, hipotensión con alteraciones hepáticas y fallo renal que presenta una letalidad del 5-10% (92-94).

3. EFECTOS DE CONCENTRACIONES BAJAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS BACTERIAS.

3.1. DEFINICIONES.

a- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Es la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo, por tanto un concepto bacteriostático, es decir, inhibición o detención del desarrollo bacteriano (96,98).

b- Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Es la menor concentración del antibacteriano capaz de producir la muerte del microorganismo, es, por consiguiente, un término de bacteriolisis que implica no sólo la suspensión del crecimiento, sino la destrucción de la bacteria (96-98).

c- Concentración Mínima Antibiótica (CMA)

Es la menor concentración del antimicrobiano capaz de producir "in vitro" alteraciones morfológicas y/o estructurales en una bacteria. Son concentraciones inferiores a la CMI, es decir, subinhibitorias.

Por consiguiente, el rango de la acción antimicrobiana va desde la producción de pequeñas alteraciones morfológicas (CMA) a la inhibición del crecimiento y multiplicación (CMI) y finalmente a la muerte bacteriana (CMB) (96-98). En cuanto a las consecuencias clínicas de las concentraciones bajas de antimicrobianos, se ha visto que infecciones como sepsis tratadas con gentamicina mostraron el mismo porcentaje de curación con niveles séricos del antimicrobiano inferiores a 1/8 de la CMI que otros enfermos con niveles séricos del mismo antimicrobiano superiores o iguales a la CMI. Los antimicrobianos, según su concentración y el sitio de infección, pueden afectar tanto los microorganismos (susceptibilidad o no a la fagocitosis) como las propiedades del propio huésped (modificando la eficacia de sus mecanismos de defensa) y se observan muchos de estos efectos con niveles subinhibitorios (96). Como consecuencia de ello, en el tratamiento antibacteriano de un proceso infeccioso, no se puede limitar solamente a considerar la Concentración Mínima Inhibitoria sino que, además, se debe considerar el efecto del mismo a concentraciones subinhibitorias sobre la relación Huésped-Bacteria (96,99).

3.2. EFECTOS SOBRE LA ESTRUCTURA BACTERIANA.

3.2.1. Efectos sobre cocos gram-positivos de antimicrobianos activos sobre la pared bacteriana.

El mecanismo de acción de los beta-lactámicos se basa en la unión del antibacteriano a las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) (100).

A concentraciones subinhibitorias, el antibacteriano se une a la PBP a la cual tiene más afinidad, mientras que a concentraciones iguales o superiores a la CMI, este antibacteriano se une a todas aquellas PBPs a las cuales tiene mayor y menor afinidad (96). La exposición de estafilococos a concentraciones subinhibitorias de penicilina induce la formación de septos más finos con pared celular normal (102-106).

A concentraciones subinhibitorias, los efectos morfológicos de los betalactámicos sobre estafilococos son dependientes de la técnica de cultivo y de la composición de este medio de cultivo.

El cultivo de *Staphylococcus* durante cuatro horas en caldo con 1/3 de la CMI de un betalactámico resulta en incremento del diámetro bacteriano. Cuando se observan membranas comunes, son generalmente más finas que las encontradas en medio sin antibacteriano. En general la morfología más comúnmente encontrada es la de formas anormalmente grandes con hasta 32 células que no se han separado denominadas "clusters" (96,101-107).

3.2.2. Efectos sobre cocos gram-positivos de antimicrobianos no activos sobre la pared bacteriana.

Concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos no activos frente a la pared bacteriana produce cambios estructurales diferentes de los betalactámicos. Después de incubar durante siete horas estafilococos con 1/4 CMI de lincomicina, la mayoría de las bacterias presentan un tamaño 1.5 a 2 veces más grande. Algunas tienen membranas comunes denominadas "crosswells" 2 a 3 veces más finas que lo normal (106-108). La incubación de *Staphylococcus aureus* con cloranfenicol, tetraciclina o rifampicina resulta en una membrana celular 3 a 4 veces más fina (102-105).

3.3. EFECTOS SOBRE LA VIRULENCIA BACTERIANA.

La virulencia es un fenómeno muy complejo que resulta de las interacciones entre las bacterias y el huésped. Se puede definir como la competencia que presenta un agente infeccioso para producir efectos patológicos como es el caso de la capacidad de invadir los tejidos del huésped o como la mínima masa bacteriana capaz de hacer daño al huésped; mientras más pequeña esta masa, más grande la virulencia (96,109,110).

Muchos factores pueden contribuir a la virulencia bacteriana como es el caso de la *morfología, rapidez de crecimiento y multiplicación, productos bioquímicos del metabolismo* (toxinas, enzimas, inactivadores de antibióticos, etc), algunos componentes de la superficie y productos de la muerte bacteriana. Un gran número de productos y agentes químicos son capaces de influir la expresión fenotípica del perfil genético de una población bacteriana en el objetivo de alterar su grado de virulencia. Antimicrobianos a concentraciones iguales a la CMB o a la CMI afectan la virulencia bacteriana de hecho de que estas concentraciones matan las bacterias o inhiben su crecimiento, concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos son capaces de producir cambios en las propiedades bacterianas, la mayoría de éstos afectan de manera u otra la virulencia, los efectos de dichas concentraciones de antimicrobianos suelen afectar varios componentes de la virulencia como la adherencia, resistencia a los factores de la inmunodefensa, proliferación local, perjuicio de los tejidos, invasión y diseminación bacteriana.

3.4. EFECTOS SOBRE LA ADHERENCIA BACTERIANA.

El proceso infeccioso se considera una cadena de múltiples pasos iniciados en la mayoría de los casos por la colonización de las superficies de las mucosas (111,112). El primer paso de la invasión tisular empieza con la adherencia bacteriana a las células epiteliales de la mucosa del huésped (111-115).

Las concentraciones subinhibitorias de varios antimicrobianos modifican la superficie bacteriana de tal manera que afectan su capacidad de adherirse a las superficies celulares, estas concentraciones subinhibitorias producen su actividad antiadhesiva de tres maneras (96,101-108):

- 1- El antimicrobiano puede inducir la rotura de adhesinas preformadas de la célula bacteriana como es el caso del efecto de la penicilina sobre el ácido lipoteicoico en la superficie de *Streptococcus pyogenes*.

2- Puede impedir la formación y/o expresión de adhesinas de superficie en organismos en crecimiento.

3- Puede inducir la formación de adhesinas no-funcionales.

Los efectos de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la adherencia bacteriana dependen de muchos factores entre ellos el antimicrobiano y su mecanismo de acción, las fuerzas electrostáticas y la hidrofobicidad bacteriana.

4. ANTIMICROBIANOS.

4.1. AMPICILINA.

Con objeto de superar los obstáculos que la penicilina G presentaba como inestabilidad en medio ácido, falta de actividad sobre gram-negativos y vulnerabilidad a las betalactamasas, los investigadores trataron de modificar la estructura molecular de la penicilina G a partir del núcleo básico del ácido 6-aminopenicilánico. Comenzó así el desarrollo de una larga serie de penicilinas semisintéticas, cuyos ejemplos más representativos son la ampicilina y la amoxicilina, probablemente unos de los antimicrobianos más utilizados en los últimos treinta años. El desarrollo de la ampicilina y otros antibióticos relacionados con los mismos, permitió extender el espectro bacteriano de las penicilinas a los gram-negativos y la posibilidad de utilizar la vía parenteral como la oral (121).

4.1.1. Definición.

La ampicilina ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$) es un derivado semisintético de la penicilina (alpha-aminobencilpenicilina) con amplio espectro de acción antibacteriana. Conjuntamente con sus derivados, especialmente los ésteres, forma el grupo de las aminopenicilinas. El núcleo penámico, común al 6-amino-penicilánico y a las diferentes penicilinas derivadas (como la ampicilina), se caracteriza por un penta-anillo saturado.

4.1.2. Mecanismo de acción.

La ampicilina, al igual que todos los betalactámicos ejerce su acción antibacteriana bloqueando la síntesis del peptidoglicano o mureína, elemento constitutivo de la pared de las bacterias gram-positivas y gram-negativas, inhibiendo la transpeptidasa, enzima esencial en esta síntesis. Es bactericida, actúa durante la fase activa de crecimiento.

4.1.3. Espectro antimicrobiano.

La ampicilina es destruida por las betalactamasas tanto de los gram-positivos como de los gram-negativos; como consecuencia de esto, la ampicilina es activa frente a una gran gama de microorganismos gram-positivos y gram-negativos excluyendo las cepas productoras de betalactamasas.

4.2. SULTAMICILINA.

La disponibilidad de las penicilinas semisintéticas de amplio espectro no resolvía el problema de las resistencias bacterianas por producción de betalactamasas. En la década de los sesenta y en la de los ochenta, conforme fueron creciendo los niveles de resistencia a las penicilinas, se desarrolló una línea de investigación dirigida al descubrimiento de nuevas moléculas que actuaran inhibiendo las betalactamasas y que, al ser utilizadas junto a los betalactámicos, permitieran tratar infecciones producidas por cepas productoras de betalactamasas. El resultado final de la investigación ha sido el descubrimiento del ácido clavulánico y del sulbactam, dos inhibidores irreversibles de las betalactamasas (122).

4.2.1. Definición.

La sultamicilina (ampicilina+sulbactam) es un doble éster y en él sus componentes bactericida (ampicilina) e inhibidor de betalactamasas (sulbactam) se encuentran unidos por un grupo metileno.

El sulbactam es un inhibidor de betalactamasas con poca actividad antibacteriana frente a cocos gram-positivos, *Pseudomonas*, y enterobacterias pero activo sobre *Neisseriae* y *Bacteroides*. La proporción de la asociación sulbactam/ampicilina es de 1/2.

4.2.2. Mecanismo de acción.

Por sí mismo, el sulbactam tiene una acción antibacteriana intrínseca escasa o nula. Es un "inhibidor suicida" que actúa uniéndose a los puntos activos de las betalactamasas para formar una enzima acélica intermedia antes de que la betalactamasa pueda fijarse a la ampicilina e inactivarla. Los fragmentos forman enlaces covalentes con la betalactamasa y la inactivan. Una vez inactivada esta molécula, la ampicilina puede unirse a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP). La síntesis de peptidoglicanos y la formación de la pared quedan inhibidas y la membrana bacteriana se rompe.

4.2.3. Espectro antimicrobiano.

La sultamicilina es activa frente a microorganismos gram-positivos y gram-negativos, aerobios y anaerobios, incluyendo cepas productoras de betalactamasas.

4.3. CEFOTAXIMA.

Las cefalosporinas han experimentado un espectacular desarrollo en los últimos años. En la actualidad son muchas las cefalosporinas orales y parenterales disponibles en la práctica clínica diaria. El amplio espectro antibacteriano, la potente actividad bactericida, la estabilidad frente a beta-lactamasas y la baja toxicidad, son algunas de las características que proporcionan a este grupo de antimicrobianos un atractivo especial para su utilización.

Las cefalosporinas se han clasificado de forma más o menos arbitraria en grupos o "generaciones", dependiendo de factores diversos tales como su farmacología, estructura química, actividad antibacteriana, etc.(123).

4.3.1. Definición.

La cefotaxima ($C_{16}H_{16}N_5NaO_7S_2$) es un antimicrobiano semisintético de estructura betalactámica con actividad primariamente bactericida y de amplio espectro de actividad. Es una cefalosporina de tercera generación de uso exclusivamente parenteral. Este antibiótico se ha originado de la unión de la cadena lateral del aminotiazol de cefotiam, con la cadena lateral oxime de cefuroxima.

4.3.2. Mecanismo de acción.

La farmacodinamia de las cefalosporinas es similar a la de las penicilinas: inhiben la síntesis de la pared bacteriana impidiendo la síntesis del péptidoglucano.

4.3.3. Espectro antimicrobiano.

Presenta un espectro más amplio que el de las cefalosporinas antiguas aunque éstas tienen la ventaja en su actividad frente a estafilococos resistentes y sensibles a meticilina. Sus combinaciones con aminoglicósidos suelen ser sinérgicas.

4.4. TETRACICLINA.

El descubrimiento de la primera tetraciclina, la clortetraciclina por Duggar en 1945, en un caldo de cultivo de una cepa de *Streptomyces aureofaciens*, fue el resultado de la búsqueda de microorganismos productores de antibióticos aislados de muestras de suelo . Posteriormente, a partir de un mutante de dicho microorganismo se obtuvo la

desmetilclorotetraciclina.

En 1950, Finlay y cols. aislaron la oxitetraciclina de un cultivo de *Streptomyces rimosus*, y en 1953, Minieri y cols. obtuvieron la tetraciclina base a partir de una cepa de *Streptomyces alboniger* o *texasi*.

La clorotetraciclina y la oxitetraciclina se obtienen exclusivamente por fermentación es decir, son antibióticos naturales. La tetraciclina y la desmetilclorotetraciclina se pueden conseguir por fermentación o por semisíntesis. Los restantes tetraciclinas son derivados semisintéticos que se desarrollaron para aumentar la hidrosolubilidad, incrementar la absorción digestiva o prolongar la hemivida de los preparados naturales (119).

4.4.1. Definición.

La tetraciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) es un antimicrobiano del grupo de las tetraciclinas que responden a la estructura de un tetraciclo de naftacencarboxamida, de actividad primariamente bacteriostática y de amplio espectro. La liposolubilidad de la tetraciclina que tiene gran relación con la difusión tisular es intermedia, inferior a la de la doxiciclina y superior a la de la oxitetraciclina. La tetraciclina se obtiene por fermentación mediante reducción catalítica y deshalogenación de la clorotetraciclina o por dehidroxilación de la oxitetraciclina.

4.4.2. Mecanismo de acción.

Las tetraciclinas actúan sobre los microorganismos sensibles inhibiendo la biosíntesis protéica (ribosomas de 70 S y también de 80 S).

A nivel molecular, la tetraciclina inhibe la transcripción del mensaje genético al impedir la unión al aminoacil-ARN de transporte con el sitio A (aceptor) de la subunidad 30 S del ribosoma; no ejerce ningún efecto sobre el sitio P (donador) de dicha subunidad. Por tanto impide la iniciación de la cadena polipeptídica actuando de manera a impedir la interacción entre el codón del ARN-mensajero y el anticodón del aminoacil-ARN-transportador correspondiente posiblemente por desacoplar la hidrólisis de guanosintrifosfato de la reacción del enlace peptídico.

La tetraciclina, al igual que su grupo, exige para ejercer su acción primariamente bacteriostática, que el microorganismo se encuentre en fase de crecimiento activo. A concentraciones altas, la tetraciclina tiene efecto bactericida aunque deja una elevada tasa de supervivientes.

4.4.3. Espectro antimicrobiano.

La tetraciclina posee un espectro antibacteriano muy amplio. Es muy activa frente a cocos y bacilos gram-positivos y negativos, micoplasmas, rickettsias, *Coxiella*, borrelias, leptospiras, treponemas, actinomyces, nocardias y clamidias.

4.5. AZITROMICINA.

A partir del descubrimiento de la eritromicina por Mc Guire y cols. en Llu Llu (Filipinas), en 1952, los macrólidos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos sensibles. Estos antimicrobianos, desde su descubrimiento, eran los fármacos destinados a tratar las infecciones por gram-positivos, generalmente como alternativa de los betalactámicos, y para las neumonías atípicas por *Mycoplasma pneumoniae*.

Así, los macrólidos eran los fármacos de segunda elección en infecciones por vías respiratorias superiores y otorrinolaringológicas y otros cuadros infecciosos. Durante la década de los sesenta, la ausencia de nuevos agentes etiológicos tratables por estos antimicrobianos y además la inexistencia de problemas de resistencia a la molécula conocida (eritromicina) había hecho innecesario desarrollar la investigación en este grupo de antimicrobianos.

No obstante, en la segunda mitad de la década de los setenta, los avances científicos en el conocimiento de nuevas etiologías de síndromes infecciosos, crearon las condiciones propicias para que este grupo comenzase a desarrollarse (neumonías comunitarias, enfermedades de transmisión sexual y gastroenteritis).

Para responder a esta necesidad de macrólidos, se ha incrementado la investigación de nuevas moléculas y se clasificaron los macrólidos en grupos según posean en su estructura macromolecular 14, 15 o 16 átomos (113).

4.5.1. Definición.

La azitromicina es el primer miembro de una nueva clase de antimicrobianos denominados azálidos, derivados de la eritromicina, entonces macrólidos. Químicamente, la

azitromicina tiene un sustituido nitrógeno en el metilo de la posición novena del anillo lactona formando así un anillo de 15 átomos en vez de los 14 clásicos, y como consecuencia tiene una mayor estabilidad en medio ácido en comparación con la eritromicina.

4.5.2. Mecanismo de acción.

Los macrólidos actúan al nivel de las subunidades 50S de los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis de las proteínas al bloquear las enzimas que actúan en la translocación de la cadena protéica (Weisblum y Davis, 1968). Los macrólidos no inhiben la formación de la cadena peptídica, sino que bloquean la translocación subsecuente, escalón en el que el peptidil-ARN-t es transportado desde el lado donador al aceptor (Franklin y Snow, 1971). Estos compuestos, considerados como primariamente bacteriostáticos, pueden comportarse como bactericidas dependiendo del microorganismo, de las concentraciones del antimicrobiano y del tiempo de exposición.

4.5.3. Espectro antimicrobiano.

Desde un punto de vista microbiológico, la azitromicina se diferencia del resto de los macrólidos en que siendo tan activa como la eritromicina o la roxitromicina frente a gérmenes gram-positivos, es, "in vitro" mucho más activa que los demás macrólidos frente a algunos gram-negativos y enterobacterias. Al mismo tiempo que mantiene una buena actividad frente a patógenos intracelulares. La azitromicina muestra resistencia cruzada con los microorganismos gram-positivos resistentes a la eritromicina.

4.6. KANAMICINA.

Los aminoglicósidos son antimicrobianos naturales o semisintéticos de estructura heterocíclica, primariamente bactericidas de amplio espectro antibacteriano y actúan inhibiendo la síntesis protéica. El primer producto aislado de este grupo fue la estreptomina en 1944 a partir de una cepa de *Streptomyces griseus*. En 1957, la kanamicina se aisló en Japón por Umezawa y cols, de una cepa de *Streptomyces kanamyceticus* (124).

4.6.1. Definición.

La kanamicina ($C_{18}H_{37}N_4O_{11}H_2SO_4$) es un aminoglicósido muy estable, cuyo sulfato es hidrosoluble. Es bactericida, especialmente sobre bacterias en fase de crecimiento y

pertenece al grupo de la desoxiestreptamina, aminoglicósido con aminociclitol. La desoxiestreptomina se une con azúcares aminados por sus carbonos 4 y 6 mediante enlaces glucosídicos, quedando libre el grupo OH en posición 5.

4.6.2. Mecanismo de acción.

Al igual de los aminoglicósidos (excepto la estreptomina), la kanamicina es primariamente bactericida. Este antimicrobiano ataca el ribosoma de las células bacterianas sensibles en su subunidad 30S (Ozaki y cols 1969); para que sea efectivo, aquel debe estar en plena operación de lectura del mensaje genético, si algún otro antimicrobiano ha detenido previamente la función ribosómica, los aminoglicósidos no actúan. El sitio preciso de ataque es una de las 15 proteínas que forman parte de dicha subunidad, concretamente la proteína número 10. Sin embargo, este mecanismo no explica la acción bactericida del antimicrobiano, ya que los ácidos nucleicos permanecen activos. Otro efecto es la inducción de falsas lecturas que trae consigo la producción de proteínas no funcionales, con confusión de los tripletes leídos sobre el mensajero.

4.6.3. Espectro antimicrobiano.

Los aminoglicósidos son normalmente activos frente a bacterias gram-negativas. La kanamicina es de amplio espectro con cierta limitación frente a cocos gram-positivos excepto estafilococos. Entre las cepas sensibles "in vitro" se incluyen cepas de enterobacterias, micobacterias y otras.

4.7. CIPROFLOXACINO Y NORFLOXACINO.

La síntesis del ácido nalidíxico se debe a un descubrimiento durante el proceso de la purificación de la cloroquinina (Leshner et al 1962). El ácido nalidíxico es más eficaz contra las bacterias gram-negativas que las gram-positivas y ha demostrado su eficacia en el tratamiento de infecciones urinarias (117,118).

Desde la introducción en clínica de este fármaco, se han desarrollado para la terapéutica varias otras sustancias químicamente afines a la 4-quinolona (117,118).

4.7.1. Definición.

a- Ciprofloxacino: Ciprofloxacino es un antimicrobiano semisintético, derivado quinoleínico fluorinado del ácido carboxílico, bactericida de muy amplio espectro, se administra oral e intravenosamente. Su fórmula es: 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-[1-piperacini]-3-quinolincarbónico.

b- Norfloxacino: Sintetizado en 1980 en Japón, es un derivado de quinolona-ácido carboxílico, se caracteriza por la adición de una fluorina en la posición 6 y un grupo piperaziny en posición 7. Es un antimicrobiano semisintético y tiene actividad bactericida. Su fórmula es: 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-[1-piperaziny]-3-quinolincarbónico.

4.7.2. Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de ciprofloxacino y de norfloxacino es el mismo que el de las otras quinolonas. Los dominios del cromosoma se superenrollan unas 400 veces, esto sucede independientemente en cada dominio, es decir, de forma separada, por lo cual se abre pasajeramente la doble hélice del cromosoma, dominio a dominio. Cuando se termina el superenrollamiento, los extremos de los dominio superenrollados se unen de nuevo. La enzima responsable de cortar la doble hélice y volver a cerrarla es la ADN-girasa. Las quinolonas impiden que la girasa vuelva a cerrar la doble hélice enlazando precisamente el extremo 5' del ADN con la girasa mediante una unión o puente covalente anormal.

4.7.3. Espectro antimicrobiano.

Norfloxacino es activo sobre la practica totalidad de las bacterias productoras de infecciones urinarias, enterobacterias, *Pseudomonas* y cocos gram-positivos incluyendo *Enterococcus*. Dentro de los patógenos genitales, es muy activo frente a *Neisseria gonorrhoeae* incluidas cepas productoras de betalactamasas. Ciprofloxacino presenta una marcada mayor actividad que norfloxacino y los restantes del grupo de los inhibidores de la girasa.

4.8. TEICOPLANINA.

Hoy en día, los gram-positivos se caracterizan por un grado elevado de resistencia a los antimicrobianos más habituales, incluidos los de reciente introducción en la práctica

clínica. La investigación en el campo de los antimicrobianos ha orientado los esfuerzos a aquella área de la patología infecciosa en la que más se precisan nuevas soluciones. La teicoplanina es un antimicrobiano que, igual que la vancomicina, se ha creado para responder al desafío terapéutico que suponen las infecciones por gram-positivos (125).

4.8.1. Definición.

La teicoplanina es un antimicrobiano glicopeptídico producido por *Actynoplanes teichomyceticus*. Es activo frente a gram-positivos y tiene similitudes con la vancomicina y la ristocetina.

4.8.2. Mecanismo de acción.

Actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana por un mecanismo diferente al de las penicilinas y cefalosporinas. Impide la polimerización del complejo lípido-fosfodisacárido-pentapéptido en la segunda fase de formación de la pared bacteriana. Bloquea la síntesis del peptidoglicano, acumulándose los compuestos intermediarios unidos a la membrana. La teicoplanina actúa secundariamente alterando la permeabilidad celular e inhibiendo selectivamente la síntesis del ácido ribonucleico. Tiene una rápida acción bactericida, pero sólo sobre bacterias en fase de crecimiento activo.

4.8.3. Espectro antimicrobiano.

Su espectro de acción comprende sólo las bacterias gram-positivas. Aunque se han aislado cepas con CMI altas, todavía no se considera frecuente la resistencia a teicoplanina.

4.9. CLINDAMICINA.

En 1966, Magerlin y cols. modificando sintéticamente la estructura química de la lincomicina (aislada de una cepa de *Streptomyces lincolmensis*), obtuvieron la clindamicina.

4.9.1. Definición.

La clindamicina es un antimicrobiano semisintético (clorodesoxy-lincomicina), tiene el mismo espectro de acción que la lincomicina, pero es diez veces más potente que ésta (120).

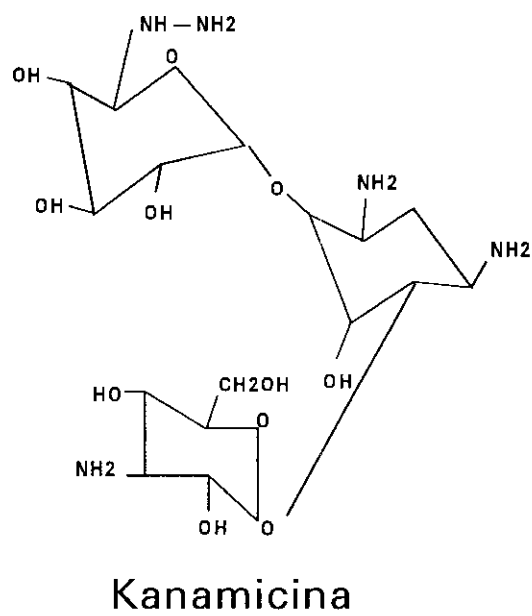
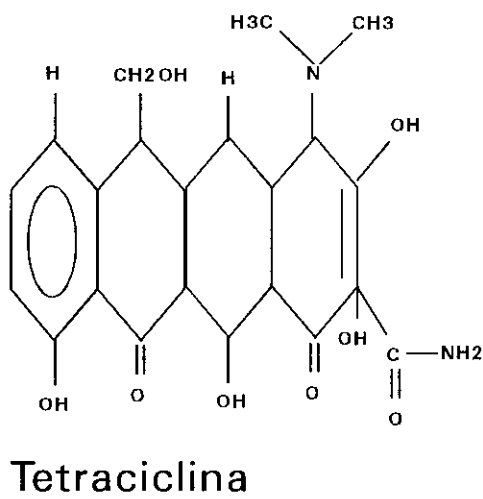
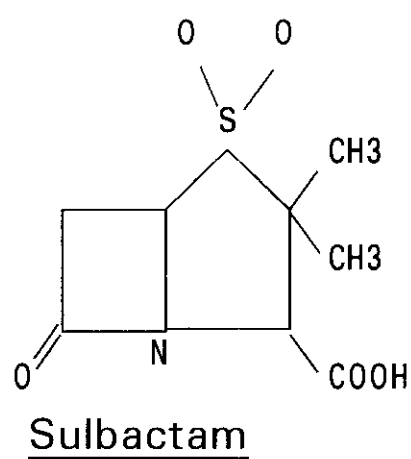
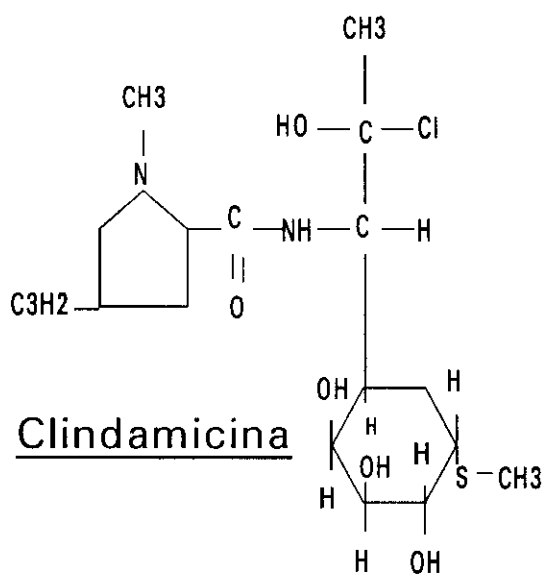
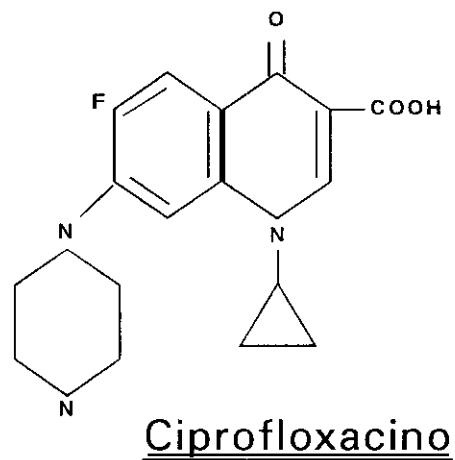
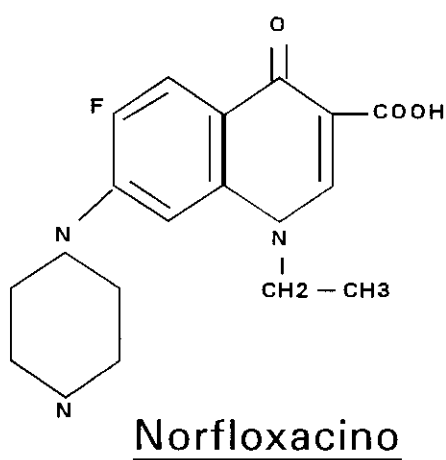
4.9.2. Mecanismo de acción.

Tiene el mismo mecanismo de acción que los macrólidos, inhibiendo la síntesis proteica al impedir la elongación de la cadena peptídica. Es bactericida a altas concentraciones y bacteriostáticas a concentraciones terapéuticas.

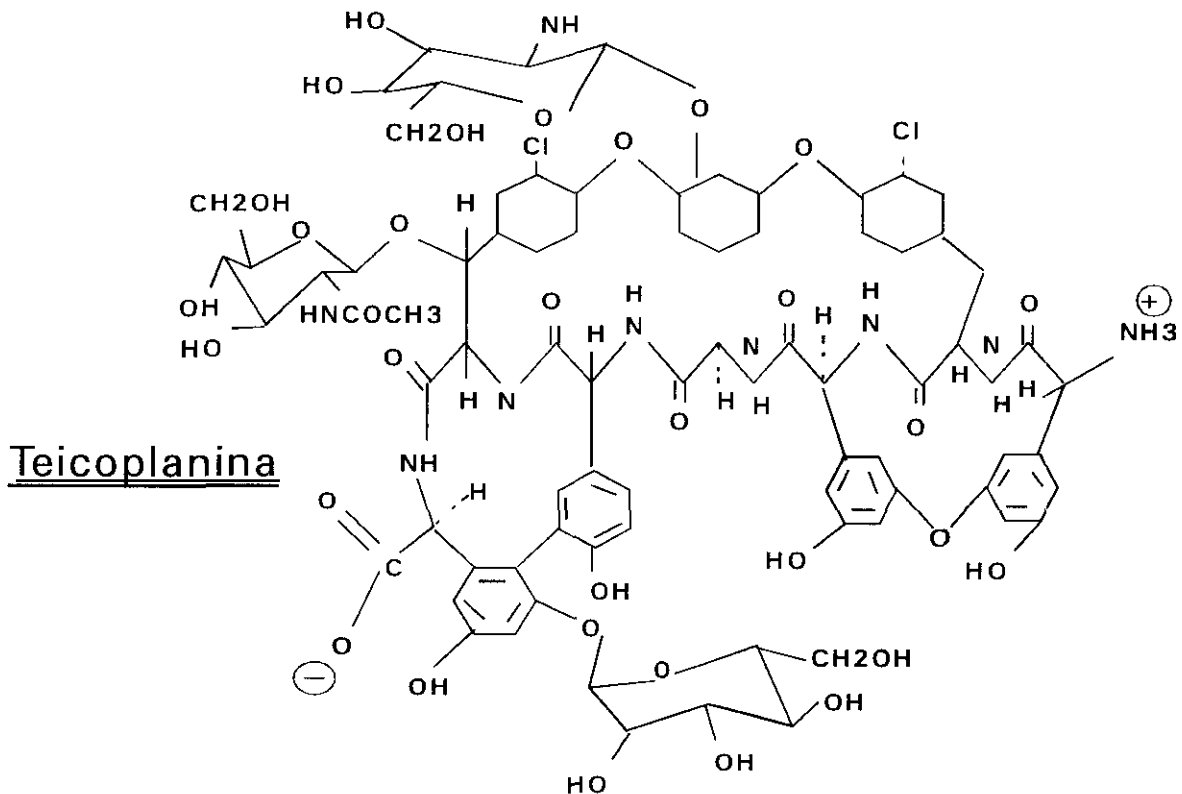
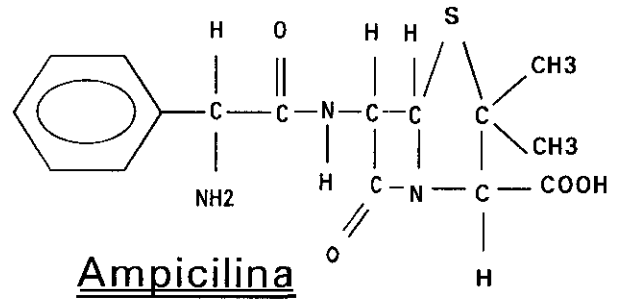
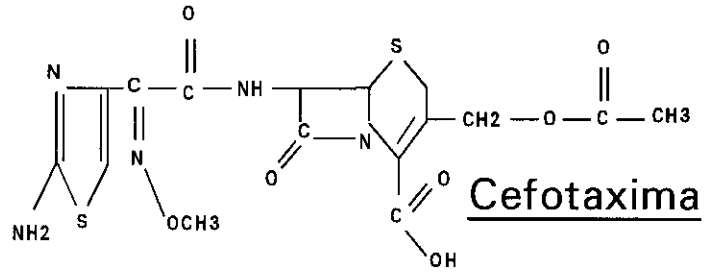
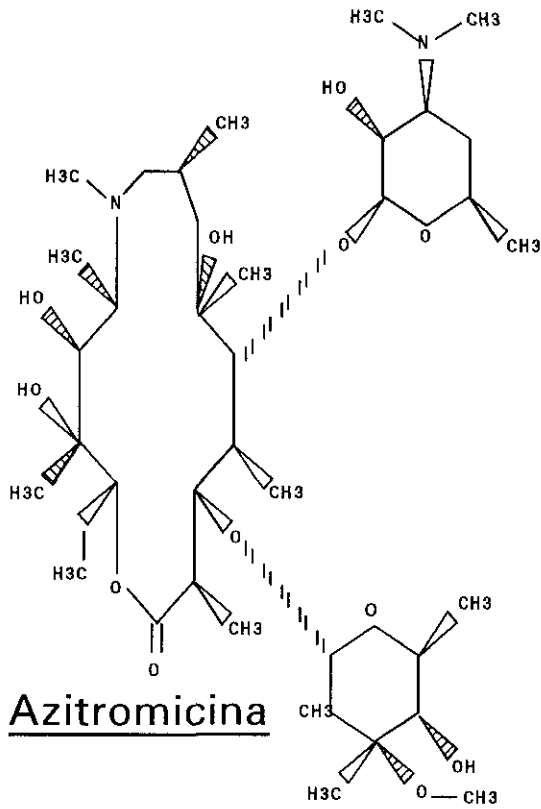
4.9.3. Espectro antimicrobiano.

Comprende estafilococos y estreptococos (excepto enterococo) y es muy activa frente a anaerobios.

4.10. ESTRUCTURAS QUIMICAS (1)



ESTRUCTURAS QUIMICAS (2)



*"Efecto de concentraciones subinhibitorias
de antimicrobianos sobre las interacciones
fibronectina-Staphylococcus aureus"*

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

S. aureus es un patógeno frecuentemente aislado en infecciones post-traumáticas, infecciones de tejidos blandos, de la piel e infecciones severas como sepsis, endocarditis infecciosa y osteomielitis. El uso de nuevas técnicas médicas y la utilización de dispositivos intravasculares como válvulas cardíacas, catéteres y otros, también las manipulaciones quirúrgicas y la drogadicción son todos factores que han hecho de este microorganismo uno de los patógenos más importantes a lo largo de la historia de enfermedades infecciosas.

En la mayoría de los casos, la adherencia es una etapa primordial y determinante del desarrollo de la infección bacteriana, proceso en el que intervienen muchos factores, de ellos, y entre los más importantes, las proteínas del huésped como la fibronectina y el fibrinógeno.

La necesidad de entender las interacciones existentes entre los microorganismos y las proteínas del huésped como la importancia de los efectos que producen los antimicrobianos sobre estas interacciones nos lleva a proponer los siguientes objetivos para este trabajo:

1- Estudiar "in vitro" las interacciones de la fibronectina con *S. aureus* en especial la influencia de la presencia de este microorganismo en el plasma sobre la concentración de la fibronectina; así mismo, estudiar estas interacciones en suero y en solución de fibronectina purificada.

2- Observar la influencia de los parámetros como la temperatura, el inóculo bacteriano, el tiempo de incubación del plasma con las bacterias, y la fase del crecimiento bacteriano sobre las interacciones fibronectina-*S. aureus*.

3- Analizar el papel de la fibronectina en la adherencia de *S. aureus* a coágulos de fibrina y el efecto que produce la eliminación, repleción y saturación del coágulo con fibronectina sobre esta adherencia.

4- Cuantificar los efectos que producen concentraciones subinhibitorias de distintos tipos de antimicrobianos frecuentemente utilizados en infecciones leves y graves y en profilaxis sobre:

a- La adhesión de fibronectina plasmática a *S. aureus* (producción o exposición del receptor de la fibronectina en la bacteria) y sobre la concentración de la fibronectina en el plasma.

b- La coagulación del fibrinógeno en presencia de *S.aureus* (producción de coagulasa y clumping factor).

c- La adherencia de *S.aureus* a coágulos de fibrina en presencia o no de fibronectina.

*"Efecto de concentraciones subinhibitorias
de antimicrobianos sobre las interacciones
fibronectina-Staphylococcus aureus"*

III. MATERIALES Y METODOS

1. CALIBRACION DEL NEFELOMETRO

La calibración del nefelómetro N-100 de Behring se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La temperatura del trabajo fue de 30°C. Esta evaluación se realizó siguiendo las recomendaciones elaboradas por la Comisión de Validación de Técnicas de la Sociedad Francesa de Biología Clínica.

1.1. IMPRECISION

La imprecisión intraserie se ha estudiado utilizando estándares con concentraciones bien determinadas de fibronectina a dos niveles de concentración (alto y bajo), analizándose 20 veces consecutivas.

Para la imprecisión interserie se analizaron los mismos estándares (controles) durante 8 días y se calcularon las medias, las desviaciones estándar y el coeficiente de variación.

1.2. LIMITES DE DETECCION

La comprobación de los límites del intervalo analítico que corresponde a la señal más pequeña (en cantidad o concentración) que se puede distinguir (con cierta probabilidad) de un blanco de reacción son los límites de detección por debajo de los cuales no se puede fiar de un resultado. Se realizaron:

Blanco reactivo: corresponde a la señal imputable al reactivo (anti-fn). La muestra se reemplazó por el mismo volumen de agua destilada.

Blanco muestra: el reactivo se reemplazó por el mismo volumen de diluyente (PBS).

Cálculo de los límites de detección (LD): se hicieron mediciones repetidas (n=10) del blanco reactivo y del blanco muestra. Se calcularon las medias (Md) y las desviaciones estándar (Sd).

$$LD = Md + K.Sd$$

Como la técnica se hace en el cuadro de una detección de moléculas normalmente

ausentes, se eligieron los grados de riesgo alfa y beta pequeños. $n=10$, $\alpha=5\%$, $\beta=1\%$ y $k=6,58$.

1.3. LINEALIDAD

Se verificó si la relación entre los valores encontrados (y) y los valores teóricos (x) es de la forma $y=a+bx$.

Se prepararon 18 diluciones a partir de un estándar y se midieron cada una 3 veces consecutivas (series de 3 muestras idénticas) y se repitió durante 3 días. A continuación se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los valores encontrados y se relacionaron con los valores teóricos mediante la fórmula $y=a+bx$.

Se llevaron estos resultados sobre los ejes de coordenadas y se trazó la bisectriz y la recta de mínimos cuadrados; en aquellos puntos superior e inferior, en los que el porcentaje de confianza ($+2s$) cortó la recta, representaron los límites de linealidad. Se ha considerado por tanto como tramo lineal aquél en que la diferencia entre el valor teórico y experimental es menor del 5% del valor teórico calculado a partir de la fórmula:

$$[(E-T)/T] \times 100 < 5.$$

2. MICROORGANISMOS

Tres cepas de *S.aureus* fueron ensayadas en este trabajo: ATCC 25923, ATCC 29213 y un aislado clínico de hemocultivo (Hospital Universitario de San Carlos-Madrid). Las cepas se conservaron a -20°C en leche desnatada; para su uso se hicieron siembras y subcultivos de mantenimiento cada dos a tres días en placas de agar Müeller-Hinton (MHA) y se incubaron en estufa (Heracus) a 37°C durante 18 a 24 horas.

3. ANTIMICROBIANOS

Un total de 10 antimicrobianos fue utilizado frente a las tres cepas de *S.aureus*:

Azitromicina (Pfizer), norfloxacino (Merck Sharp & Dohme), ciprofloxacino (Bayer),

ampicilina (Beecham), tetraciclina (Pfizer), sultamicilina (Pfizer), kanamicina (Bristol-Myers), clindamicina (Upjohn), cefotaxima (Roussel) y teicoplanina (Maron Merrel Dow). Los antimicrobianos fueron facilitados por los laboratorios en forma de polvo valorado. Se prepararon soluciones atendiendo a las indicaciones de la casa comercial y se distribuyeron en alícuotas de 1 ml; éstas se guardaron para su conservación a -20° y se descongelaron el mismo día del ensayo, desechándose el antimicrobiano sobrante.

4. FIBRONECTINA HUMANA

Se utilizó la fibronectina humana purificada mediante cromatografía (Sigma). El liofilizado se reconstituyó con agua destilada estéril y se prepararon alícuotas de 1 ml de 500 mg/l de concentración y se congelaron a -20°C . Las alícuotas se descongelaban sólo una vez para evitar las alteraciones de la proteína.

5. ANTISUEROS

Los antisueros "anti human fibronectin" y "anti human fibrinogen" fueron suministrados por Behring. Son anticuerpos específicos de origen animal elaborados mediante inmunización de conejos con las correspondientes proteínas plasmáticas humanas.

El fibrinógeno y la fibronectina contenidos en el plasma, en una reacción inmuno química con estos anticuerpos, forman inmuno complejos y las concentraciones existentes se determinaron cuantitativamente mediante medición de la dispersión luminosa (Nefelómetro N-100, Behring).

Los antisueros, dado su alta especificidad, se pueden emplear en los métodos inmuno químicos de precipitación. Se guardaron a 4°C .

6. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS

Las Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los antimicrobianos frente a las cepas ensayadas se determinaron mediante el método de macrodilución en caldo. Los estafilococos se añadieron a series-dobles de diluciones del antimicrobiano preparado en Caldo Müeller-Hinton (MHB-OXOID) en presencia de un control de crecimiento. La CMI se definió como la concentración del antimicrobiano que no permite el crecimiento

macroscópico (turbidez) en comparación con el tubo control después de 18-24 horas de incubación a 37°C.

7. PREPARACION DE LAS BACTERIAS PARA LOS ENSAYOS

A partir de una placa de Agar Müeller-Hinton (MHA-OXOID), se cogió una colonia y se añadió a 50 ml de Caldo Müeller-Hinton y se cultivó a 37°C con 150 agitaciones/min. Las bacterias en cultivo se cogieron en fase logarítmica o estacionaria (dependiendo del experimento) y se depositaron mediante centrifugación (Centrífuga-Selecta Mod. Meditronic) a 3500 rpm durante 15 min. A continuación se lavó el "pellet" tres veces con Buffer Fosfato Salino (PBS-BioMerieux) de pH=7,2-7,3 para eliminar los restos del medio y se prepararon suspensiones bacterianas de 10^8 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias/ml) que corresponden, según las determinaciones, a una absorbancia de 0,3 a 580 nm (espectrofotómetro Hitachi Mod.U-1100).

8. ENSAYO ESTANDAR DE ADHESION DE LA FIBRONECTINA SOLUBLE A *S.aureus*

Después de preparar las suspensiones bacterianas de 10^8 UFC/ml, se hicieron diluciones para obtener 10^7 y 10^6 UFC/ml según la necesidad del experimento. Estas concentraciones se confirmaron cada vez mediante recuento en placas.

De estas preparaciones bacterianas, 1 ml se incubó con 1 ml de plasma humano citratado pobre en plaquetas (PPP) durante 60 min a 37°C agitando la incubación a intervalos de 10 min para facilitar el contacto fibronectina-bacterias. A continuación, después de la incubación, las bacterias a las cuales se ha adherido la fibronectina soluble se depositaron mediante centrifugación a 3500 rpm durante 30 min y después de lavar el "pellet", la concentración de la fibronectina en el sobrenadante se midió con el nefelómetro. En cuanto al fibrinógeno, la concentración en el sobrenadante correspondió a la parte no coagulada y se midió con el mismo método. Un control formado por 1 ml del mismo plasma diluido a la mitad con PBS siguió las mismas etapas del experimento.

El porcentaje de adhesión se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ adhesión} = ([FN]_C - [FN]_A) \times 100 / [FN]_C \quad (1)$$

[FN]_C: Concentración de fibronectina en el control.

[FN]_A: Concentración de fibronectina en el sobrenadante del tubo con bacterias.

Cuando se realizaron los ensayos de adhesión en suero o con solución de fibronectina purificada, se sustituyó el plasma por éstos.

9. INFLUENCIA DE LOS PARAMETROS EN LAS INTERACCIONES FIBRONECTINA-*S.aureus*

9.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se prepararon 4 series de reacciones siguiendo el mismo ensayo estándar de adhesión y las series se incubaron a distintas temperaturas:

- + 4°C
- + 26°C
- + 37°C
- + 42°C

Después de depositar y lavar las bacterias, se midió la fibronectina en el sobrenadante y se calcularon los distintos porcentajes de adhesión.

9.2. EFECTO DEL INOCULO BACTERIANO

Para este fin, se prepararon suspensiones de *S.aureus* de distintas concentraciones y cada una de estas preparaciones siguió el ensayo estándar de adhesión y después se midió la fibronectina en el sobrenadante y se calcularon los porcentajes de adhesión.

9.3. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION

Se estudió la influencia del tiempo de incubación de las bacterias con el plasma sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*. Se realizaron los ensayos de adhesión en series de 10^8 y 10^7 UFC/ml variando el tiempo de incubación de 15 a 120 min Se determinaron las concentraciones de fibronectina y se calcularon los porcentajes de adhesión.

9.4. EFECTO DE LA FASE DE CRECIMIENTO DE *S.aureus*

A partir del cultivo en incubación (37°C, 150 agitaciones/min), a partir de las tres horas y cada hora, se cogieron 2 ml del cultivo y se depositaron las bacterias mediante centrifugación, se lavaron y se prepararon suspensiones de 10^8 y 10^7 UFC/ml para el estudio de la adhesión. Se repitió el ensayo cada hora hasta las 9 horas, y después se repitió a las 27, 80 y 125 horas. Se midió la fibronectina en el sobrenadante y se calcularon los porcentajes de adhesión.

10. DETECCION DE LA COAGULASA Y DEL "CLUMPING FACTOR" DE *S.aureus*

Se realizaron dos pruebas distintas para detectar la producción de coagulasa libre y del receptor peptídico del fibrinógeno presente en la superficie de *S.aureus* (clumping factor o coagulasa fija) (91):

- 1- El "tube test" para la coagulasa libre.
- 2- El "slide test" para el Clumping Factor.

El "tube test" consiste en añadir 0,1 ml de *S.aureus* de un cultivo "overnight" en caldo MHB a un tubo que contiene 0,5 ml de plasma reconstituido (Rehydrate Bacto Coagulase Plasma). Esta mezcla se incuba a 37°C durante 4 horas observando el tubo para la formación de un coágulo (inclinándolo 90°).

El "slide test" consiste en hacer una suspensión uniforme de bacterias en PBS estéril y agitarlas para obtener una solución homogénea. Una gota de esta suspensión se mezcla con otra del reactivo anti-*S.aureus* ("Slidex Staph-kit" -bio Merieux Vitek), se dispersa cuidadosamente durante 10 segundos y se observa la aglutinación.

11. COAGULOS DE FIBRINA

11.1. PREPARACION

Los coágulos de fibrina se prepararon a partir de plasma citratado pobre en plaquetas de voluntarios sanos. Para este fin, se prepararon distintos tipos de plasma a partir del mismo "pool":

Una parte se trató con "anti-fibronectina" y se dejó 15 min a 37°C y se centrifugó a 2000 rpm para depositar los inmunocomplejos formados, a otra parte se añadió fibronectina purificada a partir de una solución de 500 mcg/ml (la cantidad añadida depende del experimento), una parte se trató con "anti-fibronectina" y después se añadieron distintas concentraciones de fibronectina purificada (de 50 a 250 mcg por ml de plasma) y la última parte se utilizó como plasma normal.

A 0.3ml de los distintos tipos de plasma se añadió la misma cantidad de tromboplastina tisular (Pathromtin-Behring) en presencia de cloruro cálcico y se dejó 30 min a 37°C para formarse el coágulo. Después se lavó tres veces con 5 ml de PBS (pH=7,2-7,3) durante 10 a 15 min cada lavado.

11.2. ENSAYO DE ADHESION DE *S.aureus* A COAGULOS

El ensayo de adhesión se realizó directamente en los tubos donde se formaron los coágulos (para evitar deformaciones del coágulo). A partir de una suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml, se preparó otra de 10^7 UFC/ml cuya concentración se confirmó cada vez mediante recuento en placa.

Los tres tipos de coágulos se incubaron con 4 ml de suspensión bacteriana durante 60 min a 37°C y con 150 agitaciones/min. Pasado este tiempo, se lavaron los coágulos tres veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas y se hizo un recuento en placa de estas bacterias no adheridas (en el sobrenadante+lavado). Se calcularon los números de bacterias adheridas a cada coágulo que corresponden a la diferencia entre el control y el número encontrado y a continuación se calcularon los porcentajes de adhesión mediante las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ adhesión} = (N1 - N2) \times 100 / N1 \quad (2)$$

$$\% \text{ adhesión debida a Fn} = \% \text{ adh.}(\text{coágulo con Fn}) - \% \text{ adh.}(\text{coágulo sin Fn}) \quad (2')$$

N1: Número de bacterias en el inóculo de partida.

N2: Número de bacterias no adheridas al coágulo.

12. EFECTO DE CSI DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES FIBRONECTINA-*S.aureus*

12.1. CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS CON CSI

Después de determinar las CMI's del antimicrobiano frente a las cepas ensayada, se prepararon medios de MHB respectivamente con 1/2 CMI, 1/4 CMI, 1/8 CMI, 1/16 CMI, 1/32 CMI y sin antimicrobiano. A continuación se añadió una suspensión bacteriana de manera a obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/ml y se incubaron a 37°C y 150 agitaciones /min.

De otro lado, el crecimiento de *S.aureus* con concentraciones sub-inhedorias de antimicrobianos produce cambios morfológicos de las bacterias (96,101-110), algunos antimicrobianos dan lugar a formas filamentosas y otros a agregados bacterianos no separados (96,107-112). Esto puede producir errores a la hora de hacer el recuento de bacterias en placa puesto que el número de colonias no corresponde al número real de bacterias vivas sembradas. Para evitar estos errores en el estudio del efecto de antimicrobianos sobre la adhesión de *S.aureus* a coágulos de fibrina, se comprobó con todos los antimicrobianos utilizados que el inóculo bacteriano utilizado (absorbancia=0.3 a 580nm) corresponde a un número de bacterias tratadas idéntico al número de bacterias control crecidas en medio sin antimicrobiano.

12.1.1. Determinación de las densidades ópticas

Para determinar la influencia de las concentraciones subinhibitorias sobre la curva y la fase logarítmica de crecimiento de *S.aureus*, a partir de la hora 0 y cada hora se midió la densidad óptica de los cultivos con las diferentes concentraciones del antimicrobiano y del control sin antibiótico a 580 nm y se trazaron las curvas de crecimiento.

12.1.2. Preparación de las bacterias para los Experimentos

Según las determinaciones de las curvas de crecimiento en medios con o sin antibiótico, se cojieron las bacterias en fase logarítmica de crecimiento dado que las bacterias en esta fase presentan una mayor fijación de fibronectina. A continuación, después de lavar las bacterias 3 veces con PBS estéril para eliminar los restos del antimicrobiano se prepararon suspensiones bacterianas de 10^8 y 10^7 UFC/ml en PBS a partir de los medios con y sin antibiótico para los ensayos de adhesión.

12.2. ENSAYO DE ADHESION

12.2.1. Adhesión a la fibronectina libre

A los tubos con 1 ml de suspensión bacteriana se añadió el mismo volumen de Plasma Pobre en Plaquetas, a continuación se siguió el protocolo estándar de adhesión y se midió la fibronectina en el sobrenadante y se calcularon los porcentajes siguientes:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - (\% \text{ adhesión en A} \times 100 / \% \text{ adhesión en C}) \quad (3)$$

$$\% \text{ FN libre} = [FN]_A \times 100 / [FN]_C \quad (4)$$

A: Incubación con bacterias tratadas con el antimicrobiano.

C: Incubación con bacterias no tratadas (Control).

12.2.2. Adhesión a coágulos de fibrina

En este caso se utilizaron bacterias tratadas con media CMI del antimicrobiano dado que esta concentración fue la que más influía la adhesión. Se prepararon dos coágulos, uno a partir de plasma normal, y otro a partir del mismo plasma del que se quitó la fibronectina y se incubaron con 4 ml de suspensión bacteriana (10^7 CFU/ml) tratadas o no con antimicrobiano.

Después de 60 min de incubación a 37°C, 150 agitaciones /min, las bacterias no adheridas al coágulo se separaron de éste último y se lavó el coágulo 2 veces con dos ml de PBS para eliminar las adherencias inespecíficas y el total de bacterias no adheridas se determinó mediante recuento en placa de las bacterias del sobrenadante y de los lavados. A continuación, se calculó el número de bacterias adheridas y los porcentajes de adhesión y de inhibición según las formulas anteriores (2 y 3).

13. METODOS ESTADISTICOS

Se calcularon las medias aritméticas y las desviaciones estándar de los resultados obtenidos en cada caso de los porcentajes de adhesión y de inhibición de adhesión de la fibronectina soluble a *S.aureus* y se realizó un estudio descriptivo de la adhesión estafilocócica a coágulos de fibrina calculando la media aritmética y la desviación estándar de los resultados. La comparación de las medias se realizó mediante el Test T de Student; la significación estadística se calculó mediante una subrutina en BASIC (las variables eran independientes).

"Efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre las interacciones fibronectina-Staphylococcus aureus"

IV. RESULTADOS

1. RESULTADOS DE LA CALIBRACION DEL NEFELOMETRO.

1.1. IMPRECISION INTRA E INTERSERIE.

Se calcularon las medias aritméticas , las desviaciones estándar y los coeficientes de variación de todas las determinaciones. En el caso de la imprecisión intraserie se utilizó plasma con nivel alto (A) y otro con nivel bajo (B) de fibronectina. En el caso de la imprecisión interserie, se utilizó plasma con concentración normal de fibronectina (N). Los resultados se muestran en la tabla 1.

Imprecisión	Interserie			Intra serie		
	N	A	B	A	B	N
Tipo de plasma						
Media aritmética	331.19 mg/l	531.31 mg/l	128.11 mg/l			
Desviación Estándar	8.35	5.09	5.95			
Coefficiente de Variación	2.50	0.95	4.64			

Tabla 1: Imprecisión intra e interserie.

1.2. LIMITES DE DETECCION

Se calcularon las medias y desviaciones estándar de 10 determinaciones y los límites de detección (LD) . Los resultados se muestran en la tabla 2.

Blanco de:	Media aritmética	Desviación estándar	LD (mg/l)
Muestra	27.25	1.73	73.57
Reactivo	24.71	0.92	30.75

Tabla 2: Límites de detección

1.3. LINEALIDAD

$$Y = 0,172 + 0,907 X \quad r=0,99$$

2. DETERMINACION DE LA FIBRONECTINA EN PLASMA Y SUERO

Las medias de los resultados se muestran en la tabla 3. Número de voluntarios=30, SD: media de las desviaciones estándar de los porcentajes de incorporación.

FN plasm. (mg/l)	FN sérica (mg/l)	% incorporación	SD
377,85	305,13	19,24	5,41

Tabla 3: Comparación de las concentraciones de fibronectina en plasma y suero.

3. DETERMINACION DE LA FIBRONECTINA TRAS INCUBACION DE *S.aureus* CON PLASMA, SUERO Y FIBRONECTINA PURIFICADA.

3.1. INCUBACION CON PLASMA.

Tras la incubación de *S.aureus* con plasma, los niveles de fibronectina se encuentran bajos. Esta bajada depende del inóculo bacteriano utilizado (ver efecto inóculo también). Como se ve en la tabla 4, *S.aureus* ATCC 25923 y el aislado clínico originan mayor disminución de la concentración plasmática de fibronectina, con *S.aureus* ATCC 29213 se observa un porcentaje de adhesión ligeramente más bajo.

Porcentajes de adhesión de Fn o de coagulación del Fg en presencia de <i>S.aureus</i> .				
<i>S.aureus</i>	Proteína	Inóculo bacteriano (UFC/ml)		
		5×10^8	10^7	5×10^6
ATCC 25923	Fn	44,1 (3,7)	44,0 (2,4)	38,3 (1,6)
	Fg	29,1 (1,7)	69,9 (2,3)	21,3 (6,6)
ATCC 29213	Fn	40,4 (2,6)	38,16 (2,2)	33,2 (6,9)
	Fg	27,7 (9,7)	79,6 (9,5)	17,6 (11,2)
Aislado clínico	Fn	44,2 (3,8)	44,8 (4,6)	41,7 (5,9)
	Fg	29,6 (4,4)	83,7 (1,7)	21,1 (5,4)

Tabla 4: Efecto de la incubación del plasma con *S.aureus* sobre las concentraciones plasmáticas de fibronectina y fibrinógeno.

Los valores son las medias (SD) de diez experimentos.

Las diferencias entre las tres cepas ensayadas no son significativas ($p > 0.6$). Los porcentajes de adhesión no varían significativamente entre 5×10^8 y 10^7 ufc ($p = 0.71$). En cuanto al fibrinógeno, la mayor disminución (debida a la coagulación producida por *S.aureus*) se observa con un inóculo de 10^7 UFC. Inóculos de 5×10^8 y 5×10^6 UFC dan lugar a menos coagulación. En este caso la curva es parabólica mostrando un máximo con un inóculo de 10^7 UFC.

3.2. INCUBACION CON SUERO Y CON FN PURIFICADA.

En ambos casos, los porcentajes de adhesión de fibronectina a *S.aureus* son inferiores a los encontrados tras incubación con plasma. Tras la incubación de las bacterias con suero, el porcentaje de adhesión observado con inóculo bacteriano de 10^8 UFC es de 14,77 con una desviación estándar de 6,91. Tras incubación del mismo inóculo con solución de fibronectina purificada (500 mg/l), se observa un porcentaje de adhesión de 15,33 con una desviación estándar de 7,1. Las diferencias observadas entre inóculos de 10^7 y 10^8 UFC son mayores que aquellas observadas en el caso de la incubación con plasma con los mismos inóculos.

Porcentajes de adhesión de FN a <i>S.aureus</i> ATCC 25923 tras incubación con:		
Inóculo	Suero	Fn purificada (solución)
10^9 cfu/ml	12,3 (5,8)	11,8 (3,7)
10^8 cfu/ml	14,7 (6,9)	15,3 (7,1)
10^7 cfu/ml	8,26 (3,3)	6,5 (7,3)

Tabla 5: Efecto de la incubación de *S.aureus* con suero o con fibronectina purificada sobre la concentración de fibronectina.

Los resultados son las medias (SD) de cinco experimentos.

4. ESTUDIO DE LOS PARAMETROS

4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA.

La temperatura del experimento afectó significativamente las interacciones fibronectina-*S.aureus*. La tabla 6 muestra los resultados de los experimentos realizados a distintas temperaturas y con distintos inóculos bacterianos. Con los dos inóculos utilizados (10^7 y 10^8 UFC) y con las tres cepas ensayadas, la mayor adhesión se observó a 37°C . Cuando se realizaron los experimentos a 26°C y a 42°C , el porcentaje de adhesión se encontró más bajo aunque a 42°C la adhesión es ligeramente más grande que a 26°C . A 4°C la adhesión es nula o despreciable.

Porcentajes de adhesión de la fibronectina a <i>S.aureus</i> .				
Inóculo	Temperatura	ATCC		Aislado clínico
		25923	29213	Hemocultivo
10^7	4°C	0,66 (0,9)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
	26°C	28,6 (2,9)	25,2 (4,4)	29,3 (7,1)
	37°C	39,1 (1,8)	38,1 (5,1)	41,4 (4,4)
	42°C	29,1 (2,7)	27,4 (2,2)	32,2 (1,6)
10^8	4°C	5,8 (3,5)	4,1 (0,3)	7,5 (4,7)
	26°C	32,2 (2,5)	28,2 (8,1)	35,2 (2,9)
	37°C	41,4 (0,9)	40,2 (3,9)	4,4 (2,6)
	42°C	34,4 (3,2)	31,5 (3,5)	38,5 (6,6)

Tabla 6: Efecto de la temperatura sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*.

Los resultados son las medias (SD) de cinco experimentos.

En las figuras 1 y 2 se observan los efectos de la temperatura sobre la adhesión de Fn a *S.aureus*. Los valores representan las medias de las tres cepas. Las diferencias entre los valores observados con las distintas cepas no son significativas ($p > 0.8$)

Efecto de la temperatura sobre las interacciones Fn-S.aureus.

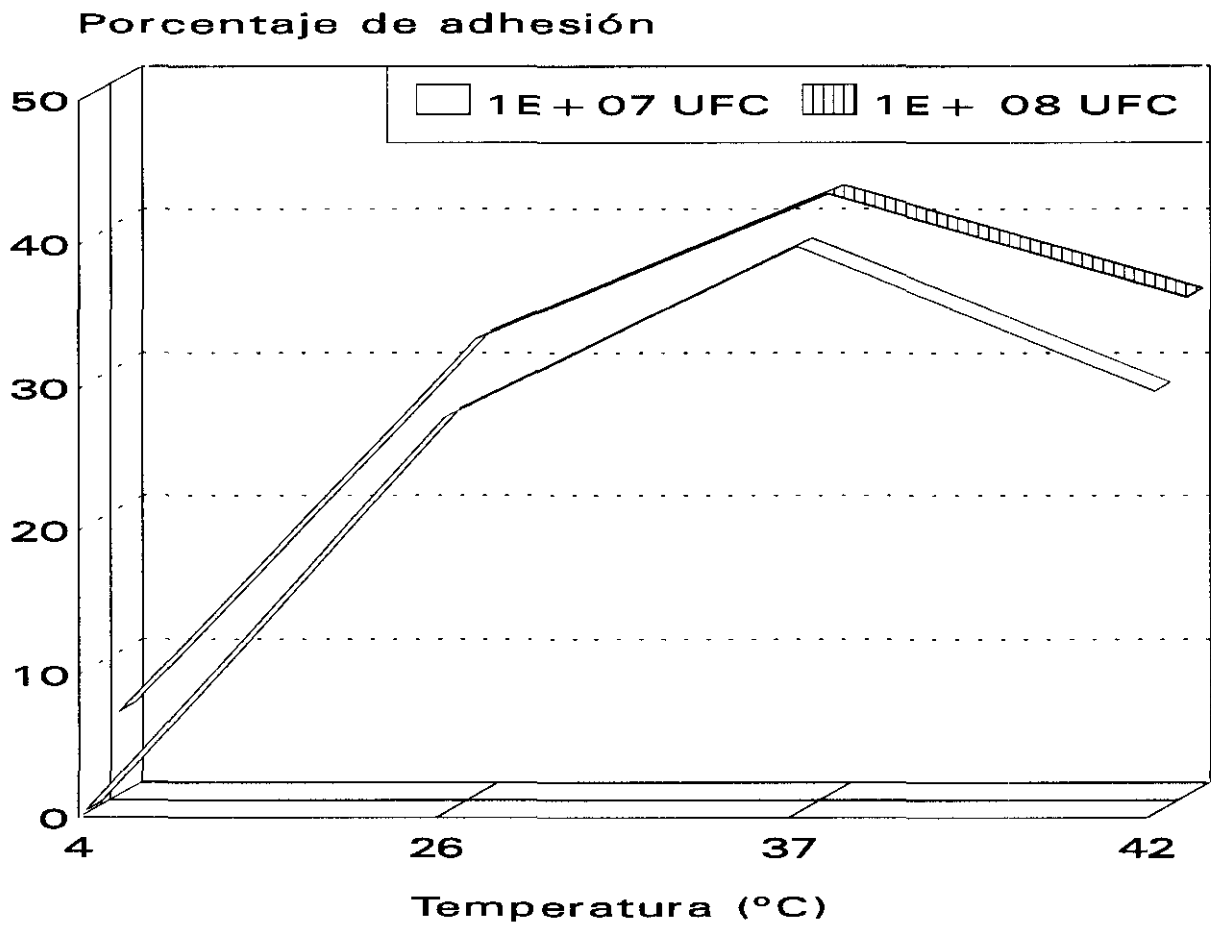


Figura 1

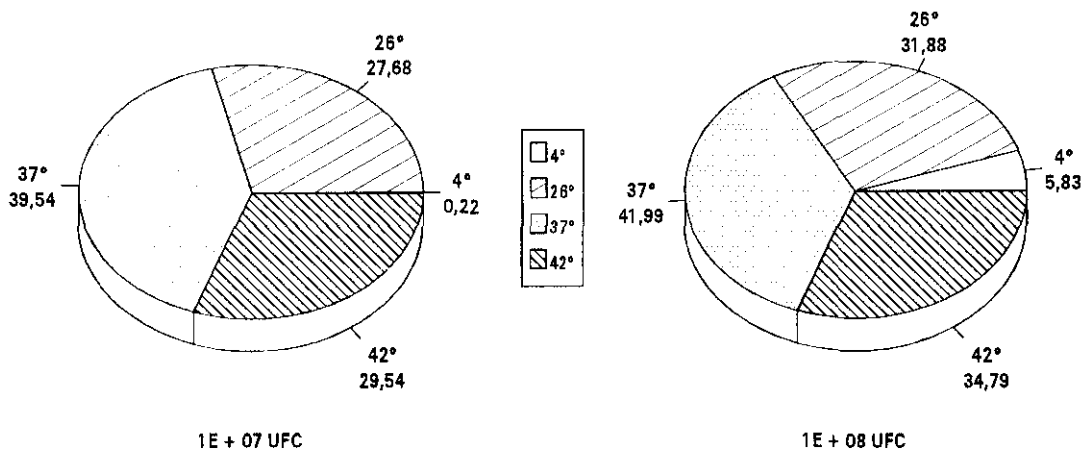


Figura 2

4.2. EFECTO DEL INOCULO BACTERIANO.

En la tabla 7 están representados los porcentajes de adhesión de la fibronectina plasmática en presencia de distintos inóculos de *S. aureus*. Las tres cepas muestran resultados comparables aunque con distintos valores, las diferencias no se consideran significativas ($p > 0.7$).

Con inóculo de 10^8 UFC se observa un porcentaje alto de adhesión que en el caso de *S. aureus* ATCC 25923 es más grande que el observado con 10^9 UFC (44.02% comparado con 43.12%), en los otros dos casos del aislado clínico y de la cepa ATCC 29213, 10^8 UFC asegura un porcentaje de adhesión igual o ligeramente inferior al observado con 10^9 UFC.

Esta adhesión va bajando con el inóculo bacteriano; entre 10^7 UFC y 5×10^5 UFC se observa una disminución rápida de adhesión que no se detecta con inóculos inferiores o iguales a 5×10^5 UFC. La curva de adhesión según el inóculo bacteriano (medias des tres cepas, Figura 3) alcanza su máximo con un inóculo de 10^8 UFC, valor a partir del cual se mantiene prácticamente constante. El inóculo de 10^7 UFC se consideró inóculo estándar para los ensayos de adhesión.

Porcentaje de adhesión de Fn a <i>S. aureus</i> .			
Inóculo UFC/ml	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
10^9	43.12 (1.6)	41.29 (5.3)	44.21 (3.8)
10^8	44.02 (2.4)	38.64 (2.7)	44.82 (4.6)
5×10^7	41.66 (2.9)	37.50 (1.5)	43.66 (3.8)
10^7	38.26 (1.6)	35.91 (1.2)	41.73 (5.9)
5×10^6	21.16 (0.06)	ND	32.8 (5.3)
5×10^5	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Tabla 7: Efecto del inóculo bacteriano sobre la adhesión de la fibronectina a *S. aureus*.

Los resultados son las medias (SD) de cinco experimentos.

Efecto del inòculo bacteriano sobre las interacciones Fn-S.aureus.

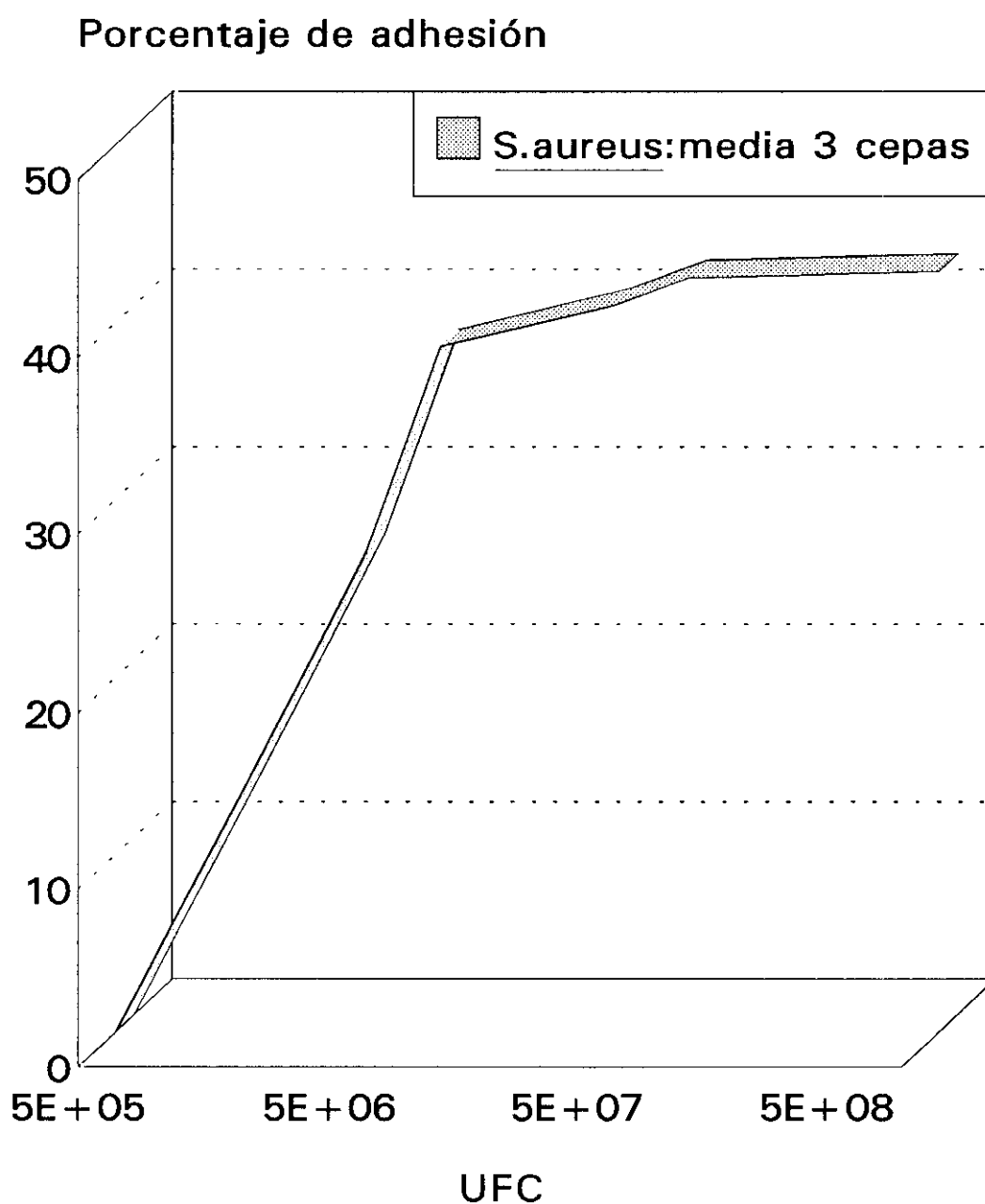


Figura 3

4.3. EFECTO DE LA FASE DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

La fase de crecimiento de las bacterias afectó significativamente las interacciones de la fibronectina con *S.aureus* (tabla 8 y figura 4), las bacterias en fase logarítmica de crecimiento aumentan su capacidad de fijar fibronectina soluble especialmente entre la tercera y la cuarta hora donde se observa mayor adhesión con las tres cepas ensayadas (44.34%, 42.22% y 46.82% con *S.aureus* ATCC 25923, ATCC 29213 y el aislado clínico respectivamente). A continuación y hasta las 8 hora, los porcentajes de adhesión bajaron progresivamente para alcanzar un nivel de 38,27% como media de las tres cepas a las 8 horas. Las diferencias entre las tres cepas no se consideran significativas ($p > 0.7$). La fase estacionaria se caracteriza por una adhesión prácticamente invariable y constante entre las horas 9 y 24. Entre las horas 28 y 125, la adhesión bajó de 36.36 a 33.33% como media de las tres cepas. Las densidades ópticas reflejan el grado de crecimiento de las bacterias.

Porcentajes de adhesión (SD) de la fibronectina a <i>S.aureus</i>					
Fase	Horas	D.O.	ATCC		Aislado clínico
			25923	29213	Hemocultivo
Logarit.	3	0.257	42,5 (2.1)	39,2 (1.1)	45,2 (0,5)
	4	0.891	44,3 (1.2)	42,2 (2,2)	45,8 (0,6)
	5	1.490	41,6 (0,9)	41,2 (1,2)	43,9 (3,2)
	6	2.000	40,3 (1,3)	38,8 (5,6)	41,5 (0,4)
	7	2.311	39,2 (2,2)	37,2 (0,6)	39,4 (0,6)
	8	2.502	38,3 (0,6)	37,5 (3,1)	38,4 (0,5)
Estacion.	9	2.630	36,8 (3,2)	35,8 (1,7)	37,1 (1,6)
	12	2.651	36,6 (3,5)	35,9 (6,4)	37,3 (2,3)
	24	2.683	36,4 (1,5)	35,1 (3,5)	36,8 (0,9)
Declin.	28	2.694	36,3 (0,1)	34,9 (0,8)	37,2 (0,8)
	80	2.731	34,6 (0,9)	33,1 (1,6)	36,3 (1,3)
	125	ND	33,3 (1,7)	33,2 (2,2)	35,3 (4,1)

Tabla 8: Efecto de la fase de crecimiento sobre las interacciones fibronectina-*S.aureus*. Los resultados son las medias de 5 experimentos, estos experimentos se realizaron con un inóculo de 10^7 UFC/ml. D.O.: Densidad óptica a 580nm. ND: No determinado.

Efecto de la fase de crecimiento sobre las interacciones Fn-S.aureus.

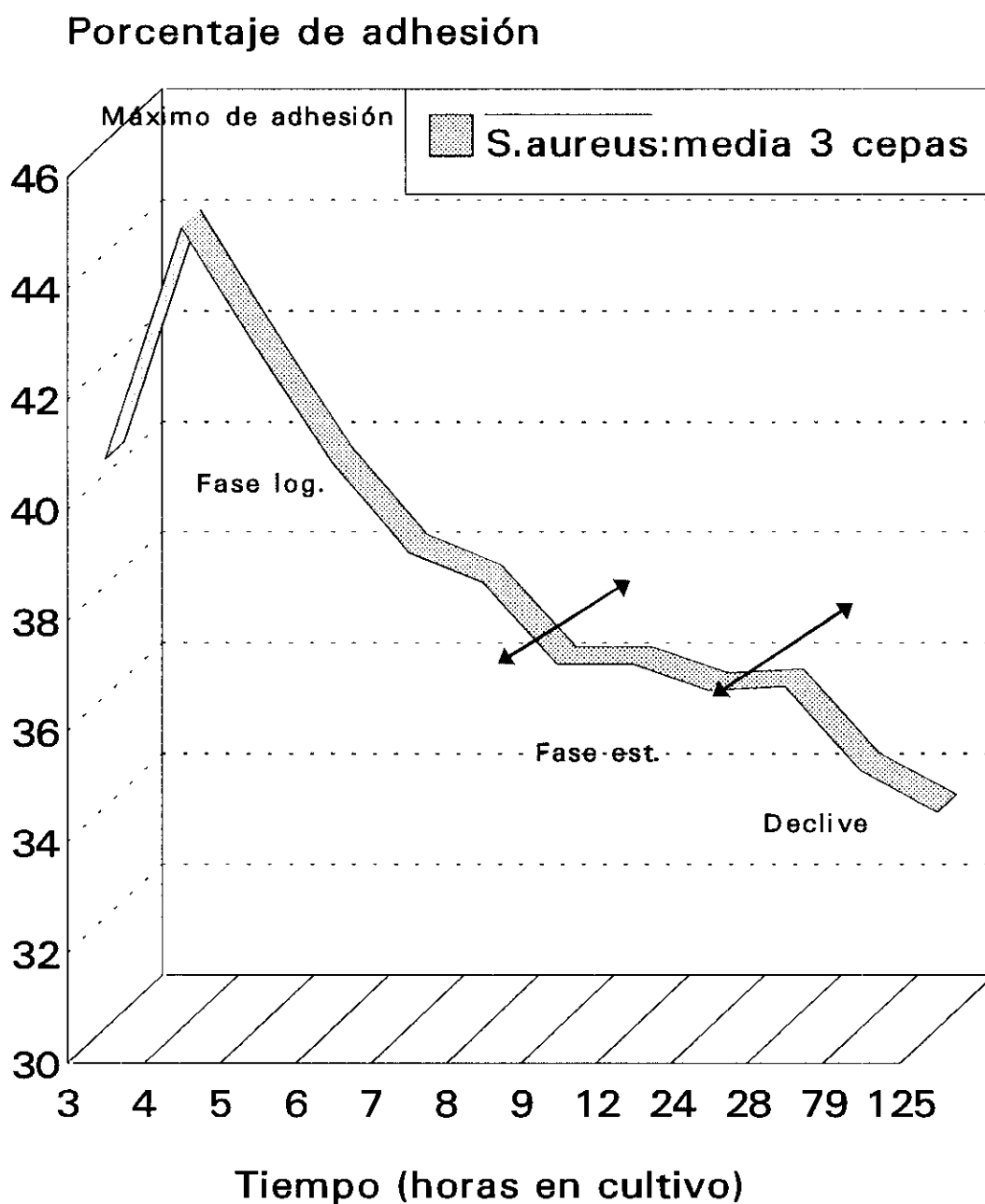


Figura 4

4.4. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION.

En general las tres cepas de *S.aureus* mostraron una adhesión a la fibronectina dependiente del tiempo de incubación de las bacterias con la fibronectina en el plasma. El aspecto de la curva según el tiempo de incubación es parecido con ambos inóculos de 10^8 y 10^7 UFC aunque con distintos porcentajes de adhesión.

Porcentajes de adhesión (SD) de la fibronectina a <i>S.aureus</i> .				
Inóculo	Tiempo /min.	ATCC		Aislado clínico
		25923	29213	Hemocultivo
10^8 CFU/ml	5	3,7 (5,3)	0,0 (0,0)	7,1 (3,2)
	15	14,3 (0 8)	7,2 (0,1)	17,2 (1,1)
	30	31,1 (3,5)	29,5 (6,1)	32,7 (0,8)
	45	34,9 (4,6)	33,8 (5,8)	34,7 (2,6)
	60	41,6 (1,3)	37,1 (4,3)	45,5 (3,7)
	120	45,2 (0,3)	39,3 (2,3)	46,5 (2,9)
	180	45,2 (1,0)	39,9 (1,7)	45,9 (3,3)
10^7 CFU/ml	5	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,7 (9,2)
	15	8,7 (6,6)	2,2 (10,1)	8,8 (2,2)
	30	29,4 (3,7)	30,3 (6,1)	32,4 (1,5)
	45	36,9 (2,1)	33,1 (2,3)	40,4 (4,7)
	60	39,7 (1,1)	30,6 (3,5)	41,2 (1,2)
	120	40,1 (3,3)	38,7 (2,7)	42,9 (3,3)
	180	41,3 (2,3)	39,2 (5,6)	43,1 (6,7)

Tabla 9: Efecto del tiempo de incubación con el plasma sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*. Los resultados son las medias (SD) de cinco experimentos.

Con cinco minutos de incubación no se observa adhesión ninguna con las dos cepas ATCC de *S.aureus* utilizando un inóculo de 10^7 UFC, mientras que el aislado clínico muestra un nivel muy bajo de adhesión (1.7%). Con este mismo tiempo, 10^8 UFC de *S.aureus* ATCC 25923 y del aislado clínico manifiestan porcentajes de adhesión de 3.74 y 7.13% respectivamente, mientras que con la cepa ATCC 29213 no se observa una adhesión significativa.

Según va aumentando el tiempo de incubación, el porcentaje de adhesión aumenta y llega con 60 minutos a asegurar casi la totalidad de la adhesión observada con 180 minutos. La curva de adhesión en función del tiempo de incubación presenta un comienzo exponencial entre cinco y sesenta minutos, a partir de estos valores la curva parece ser prácticamente invariable (ver figura 5).

En este caso también las diferencias observadas entre las tres cepas bacterianas no son significativas ($p > 0.8$).

En la **figura 4** se muestra el máximo de adhesión observado durante la fase logarítmica de crecimiento, también se observa el aspecto horizontal de la curva durante la fase estacionaria y el aspecto decreciendo de la misma durante la fase de declinación y se observa en la **figura 5** el efecto del tiempo de incubación. Ambas figuras representan las medias de 5 experimentos.

La figura 6 representa el crecimiento y la adhesión a la fibronectina de *S.aureus*.

La zona A se caracteriza por un aumento de adhesión y de turbidez.

La zona B representa el inicio del descenso de adhesión que se acompaña de un crecimiento activo.

La zona C es parecida a la zona B pero con porcentajes de adhesión más bajos y D.O. más altas.

En la zona D se observa una adhesión y una turbidez prácticamente invariables que corresponden a la fase estacionaria.

La zona E representa un descenso de la adhesión. Los valores de la densidad óptica en esta zona no son representativos del número de bacterias vivas.

Efecto del tiempo de incubación sobre las interacciones Fn-S.aureus.

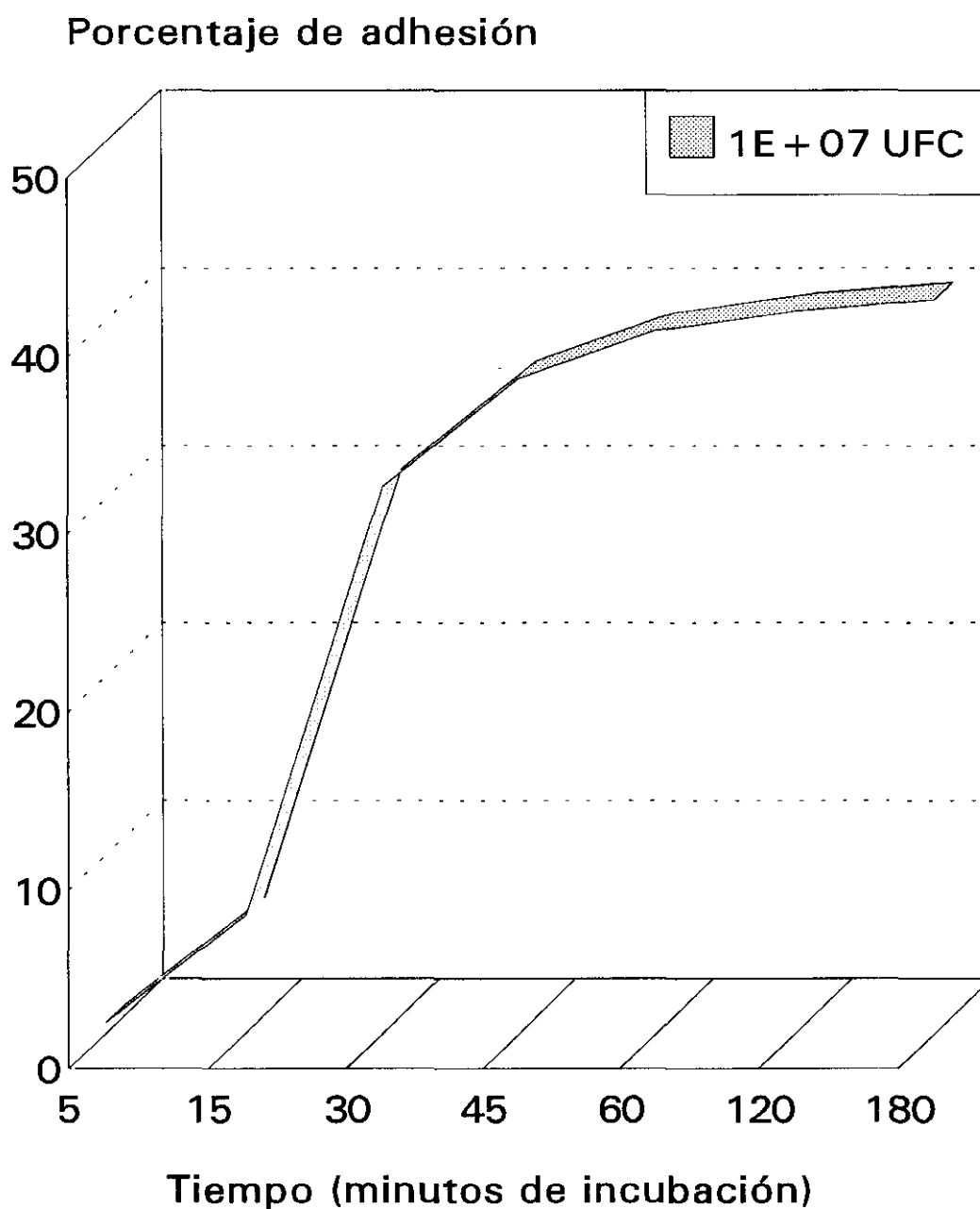


Figura 5

Crecimiento y adhesión a la Fn de S.aureus.

□ porcentaje de adhesión ▨ crecimiento bacteriano

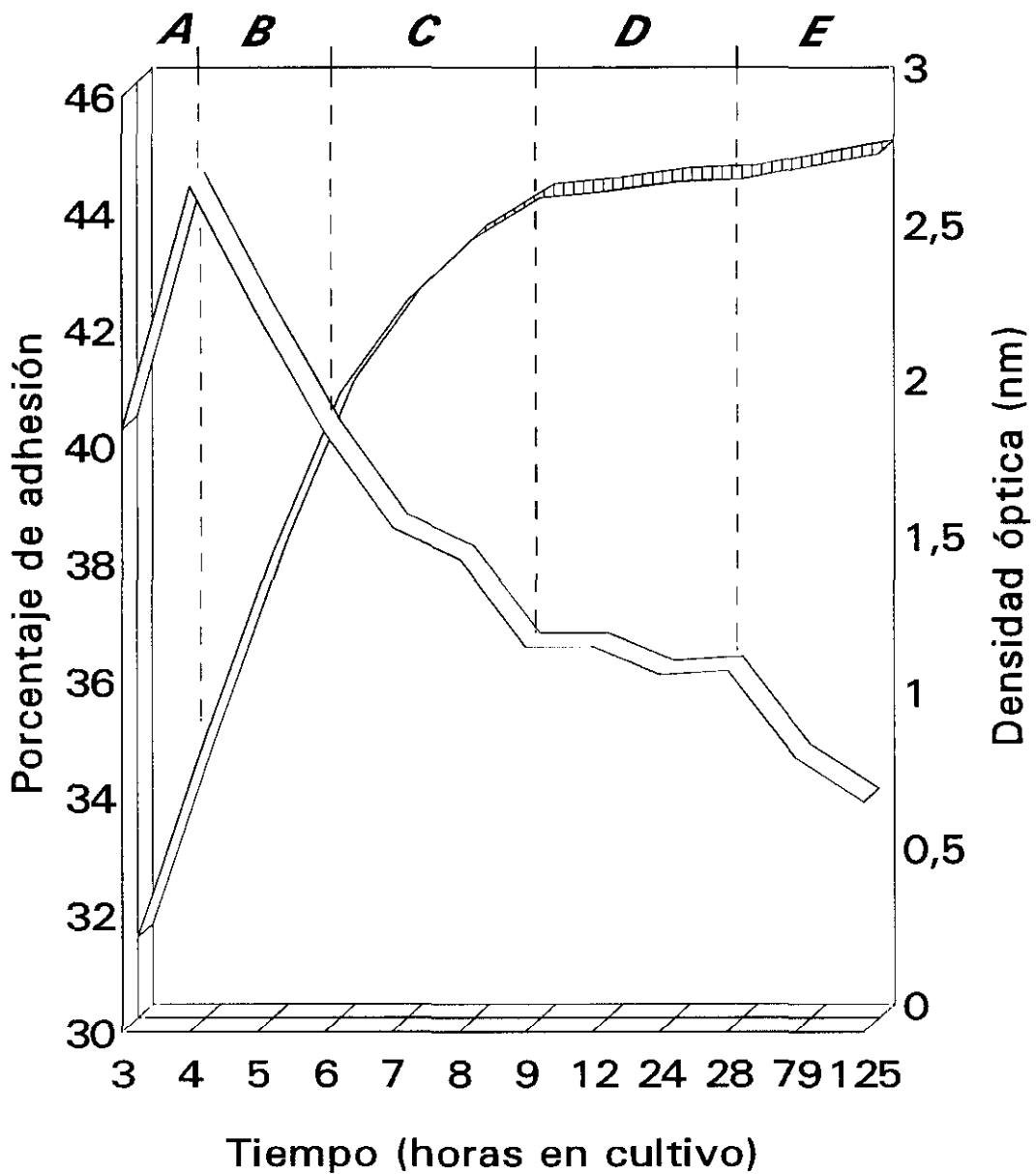


Figura 6

5. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS.

<i>S.aureus</i> - CMI mg/l			
Antimicrobianos	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
Azitromicina	2	2	1
Norfloxacino	1	1	1
Ampicilina	1	1	16
Tetraciclina	0.5	0.5	0.25
Sultamicilina	1	1	2
Kanamicina	2	2	2
Cefotaxima	2	2	2
Clindamicina	0.12	0.12	0.25
Teicoplanina	0.25	0.25	0.25
Ciprofloxacino	0.12	0.12	0.25

Tabla 10: Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los distintos antimicrobianos frente a las tres cepas de *S.aureus*.

6. EFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES FIBRONECTINA-*S.aureus*.

Las tablas (11-30) y las figuras (7-26) representan la influencia de los distintos antimicrobianos sobre :

- 1- La adhesión "in vitro" de la fibronectina plasmática a *S.aureus*.
- 2- La coagulación del fibrinógeno en presencia de *S.aureus*.
- 3- La concentración de fibronectina libre en el plasma.

Según los efectos que producen sobre estas interacciones, los antimicrobianos se dividen en tres categorías:

6.1. ANTIMICROBIANOS QUE DISMINUYEN LA ADHESION DE LA FIBRONECTINA PLASMÁTICA A *S.aureus*.

Esta clase engloba los siguientes antimicrobianos:

Azitromicina, norfloxacino, ciprofloxacino, tetraciclina y clindamicina.

Con estos antimicrobianos se observó una inhibición de adhesión dependiente de la concentración del antimicrobiano. En todos los casos, las medias de las CMI's produjeron el mayor porcentaje de inhibición y en la mayoría de los casos 1/32 de la CMI era ineficaz.

Con todos los antimicrobianos, la diferencias observadas entre las tres cepas ensayadas no son significativas ($p > 0.7$), lo que permitió trazar una curva representativa que corresponde a la media de la tres cepas representando los efectos del antimicrobiano sobre los porcentajes de adhesión y los porcentajes de fibronectina plasmática libre.

A 1/2 CMI, se observó más inhibición con ciprofloxacino, tetraciclina y clindamicina (las medias son respectivamente 100, 99.41 y 99.63%) y menos con azitromicina y norfloxacino (95.46 y 85.76 respectivamente). En todos los casos, aunque con porcentajes diferentes, la inhibición de la adhesión debida a los cinco antimicrobianos se considera alta y significativa (inhibición superior al 85 %). Los valores son las medias de 5 a 10 determinaciones.

Ciprofloxacino y clindamicina tienen la exclusividad de producir altos porcentajes de inhibición a 1/4 e incluso a 1/8 CMI. La inhibición de adherencia se acompaña de una

liberación proporcional de fibronectina plasmática que reestablece niveles normales de la proteína en el plasma.

De otro lado, los cinco antimicrobianos producen una inhibición de coagulación del fibrinógeno en presencia de *S.aureus*. A $1/2$ CMI, estos antimicrobianos inhiben totalmente o casi totalmente (inhibición superior al 95%) la coagulación del fibrinógeno, esta inhibición se acompaña de un test negativo de Coagulasa y de Clumping Factor.

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	86,69 (1,1)	100 (0,0)	100 (0,0)
1/4	39,89 (0,9)	42,67 (2,1)	39,96 (1,1)
1/8	24,36 (0,8)	25,33 (0,6)	8,71 (0,3)
1/16	16,11 (0,5)	13,33 (0,2)	4,35 (0,8)
1/32	0 (0,0)	0 (0,0)	2,17 (1,2)

Tabla 11: Efecto de la azitromicina sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	100 (0,0)	98,00 (0,8)	100 (0,0)
1/4	21,21 (0,6)	25,32 (0,6)	20,34 (0,5)
1/8	10,51 (0,2)	13,22 (0,9)	13,89 (0,2)
1/16	5,0 (0,1)	2,01 (0,7)	0,1 (0,2)
1/32	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Tabla 12: Efecto de la azitromicina sobre la coagulación del fibrinógeno por *S.aureus*.

Efecto de CSI de azitromicina sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

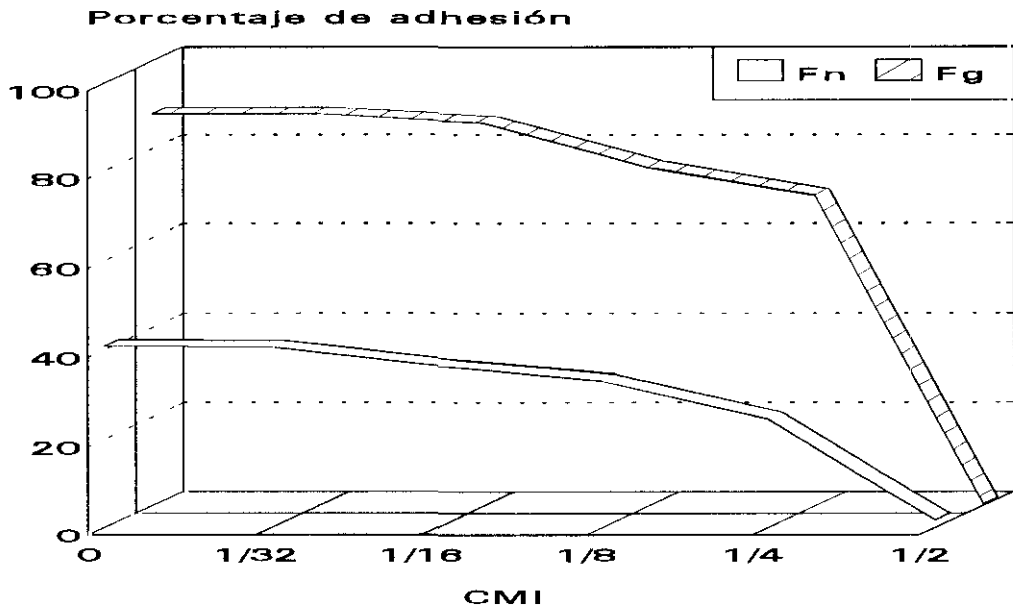


Figura 7

Efecto de CSI de azitromicina sobre la concentración de Fn plasmática.

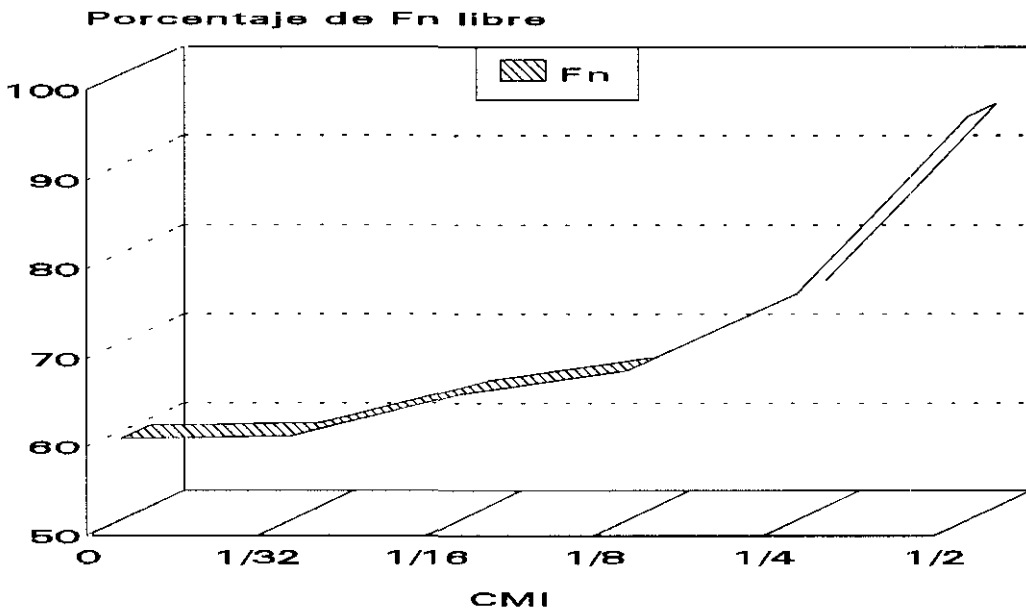


Figura 8

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S. aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	94,55 (0,1)	91,3 (0,3)	71,43 (0,1)
1/4	32,42 (0,2)	26,09 (0,5)	41,07 (0,1)
1/8	7,01 (0,4)	1,45 (0,3)	19,64 (0,8)
1/16	4,95 (0,6)	1,45 (0,7)	5,36 (0,6)
1/32	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Tabla 13: Efecto de la norfloxacino sobre la adhesión de la fibronectina a *S. aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S. aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	95.86 (0.2)	96.71 (0.3)	97.76 (0.2)
1/4	18.22 (0.4)	15.11 (0.7)	19.49 (0.3)
1/8	10.01 (0.1)	5.90 (0.2)	7.28 (0.5)
1/16	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
1/32	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Tabla 14: Efecto de la norfloxacino sobre la coagulación del fibrinógeno por *S. aureus*.

Efecto de CSI de norfloxacino sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

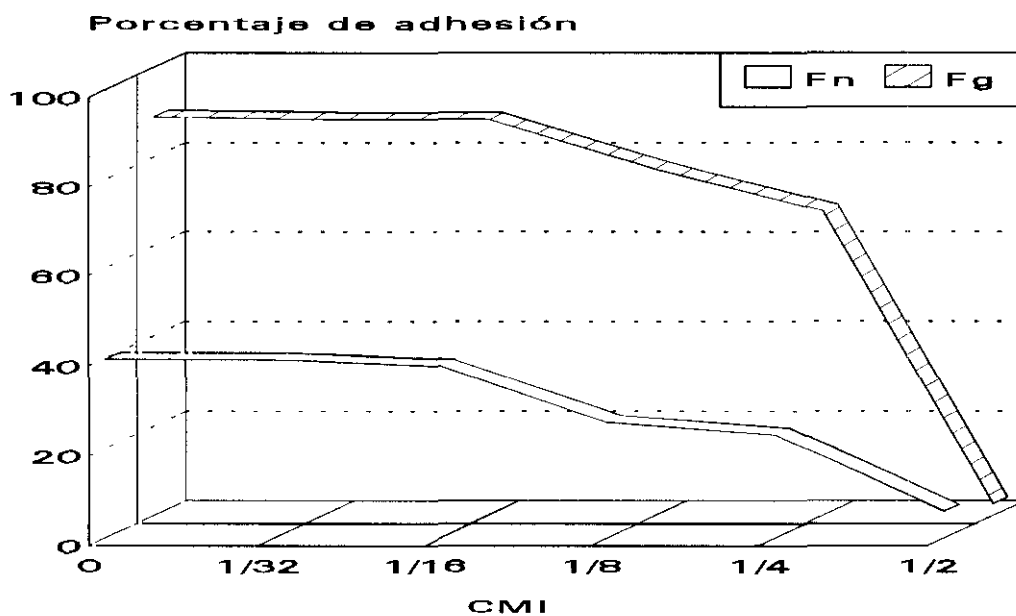


Figura 9

Efecto de CSI de norfloxacino sobre la concentración de FN plasmática.

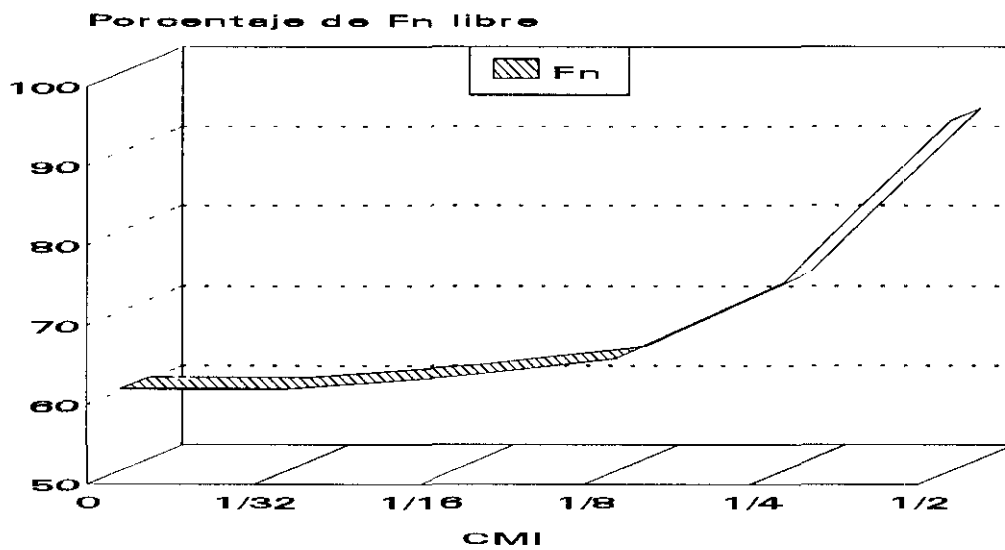


Figura 10

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	100 (0.0)	100 (0.0)	100 (0.0)
1/4	89.12 (0.4)	94.12 (0.3)	75.66 (0.9)
1/8	69.65 (0.1)	59.36 (0.5)	41.69 (0.5)
1/16	33.21 (0.6)	34.96 (0.7)	29.14 (0.1)
1/32	21.03 (0.8)	19.11 (0.6)	11.12 (0.9)

Tabla 15: Efecto de la ciprofloxacino sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	100 (0.0)	100 (0.0)	100 (0.0)
1/4	74.36 (0.3)	85.12 (0.2)	78.6 (0.1)
1/8	52.54 (0.6)	46.23 (0.7)	47.49 (0.5)
1/16	12.20 (0.6)	10.33 (0.9)	08.96 (0.6)
1/32	0 (0.0)	6.32 (0.2)	0.9 (0.4)

Tabla 16: Efecto de la ciprofloxacino sobre la coagulación del fibrinógeno por *S.aureus*.

Efecto de CSI de ciprofloxacino sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

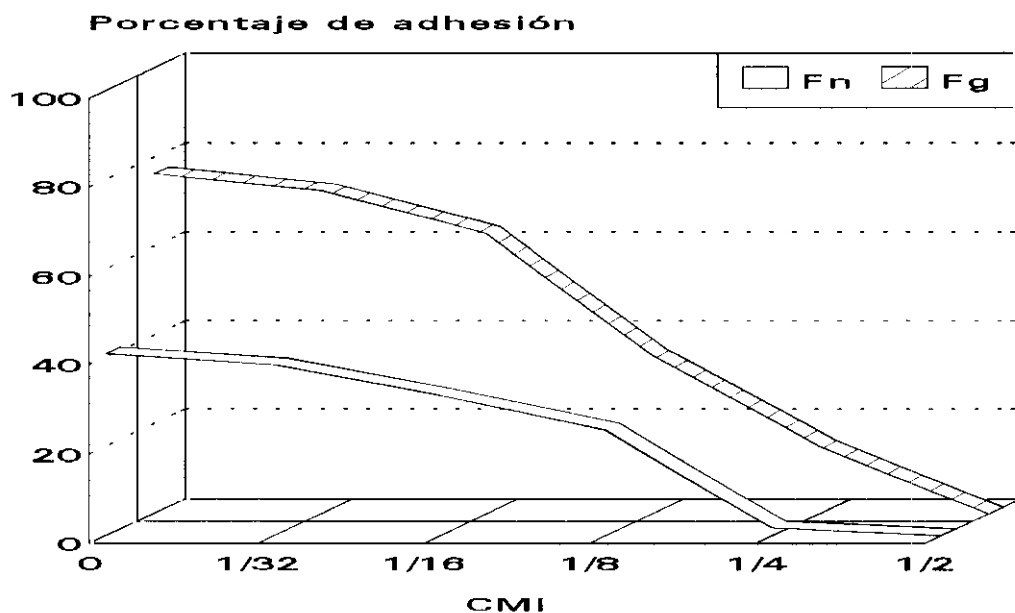


Figura 1 1

Efecto de CSI de ciprofloxacino sobre la concentración de Fn plasmática.

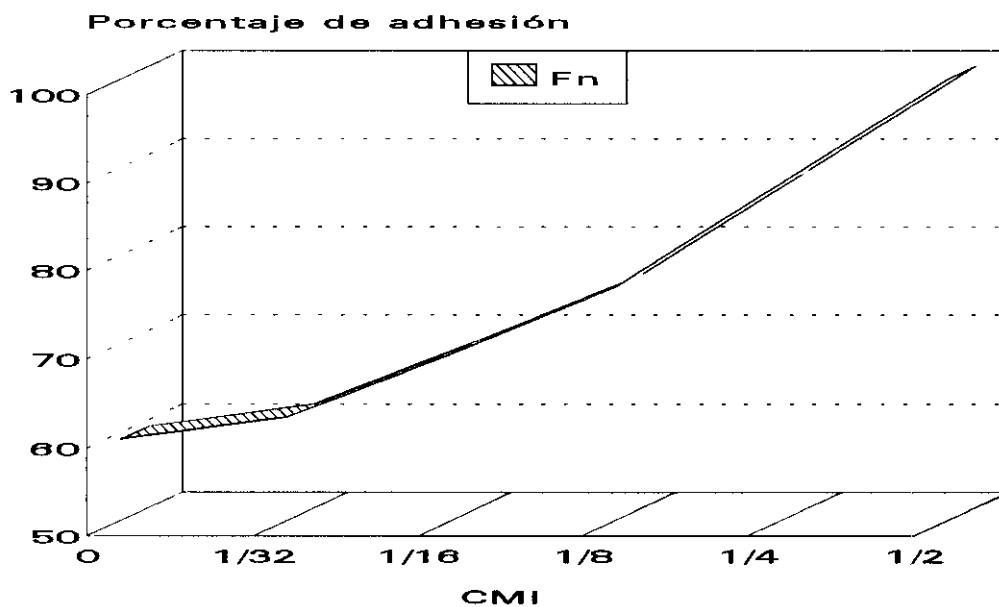


Figura 1 2

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	100 (0.0)	100 (0.0)	98.25 (0.2)
1/4	30.89 (0.2)	17.41 (0.1)	85.96 (0.1)
1/8	6.75 (0.3)	7.69 (0.5)	40.35 (0.6)
1/16	3.78 (0.2)	7.69 (1.1)	31.58 (0.3)
1/32	1.5 (0.2)	3.08 (0.1)	3.51 (0.8)

Tabla 17: Efecto de la tetraciclina sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	100 (0.0)	100 (0.0)	99.19 (0.2)
1/4	85.23 (0.3)	71.5 (0.2)	82.21 (0.6)
1/8	56.22 (0.5)	61.41 (0.1)	58.22 (0.3)
1/16	13.81 (0.6)	7.91 (0.7)	10.33 (0.3)
1/32	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Tabla 18: Efecto de la tetraciclina sobre la coagulación del fibrinógeno por *S.aureus*.

Efecto de CSI de tetraciclina sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

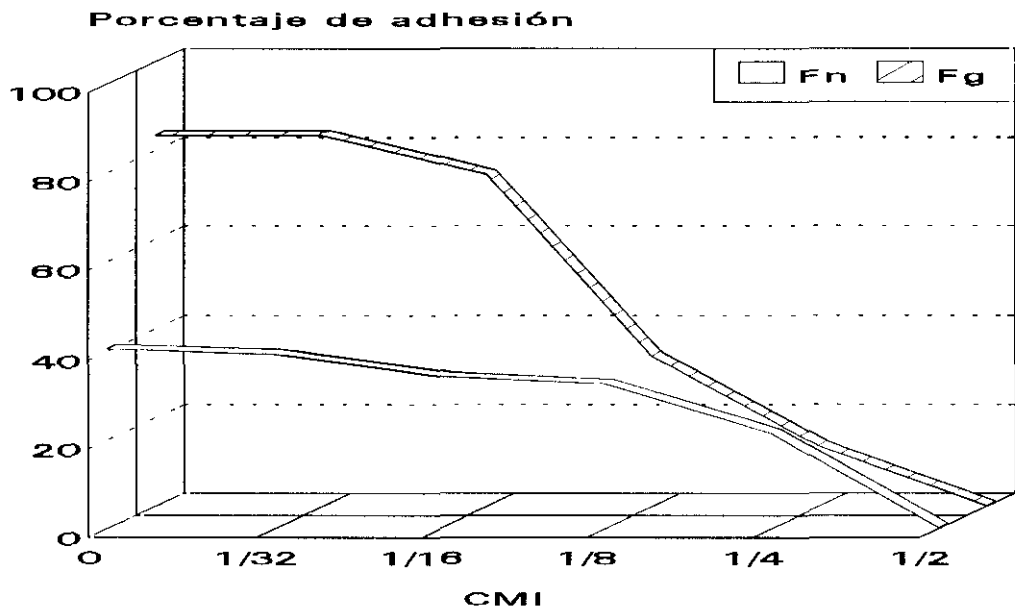


Figura 13

Efecto de CSI de tetraciclina sobre la concentración de FN plasmática.

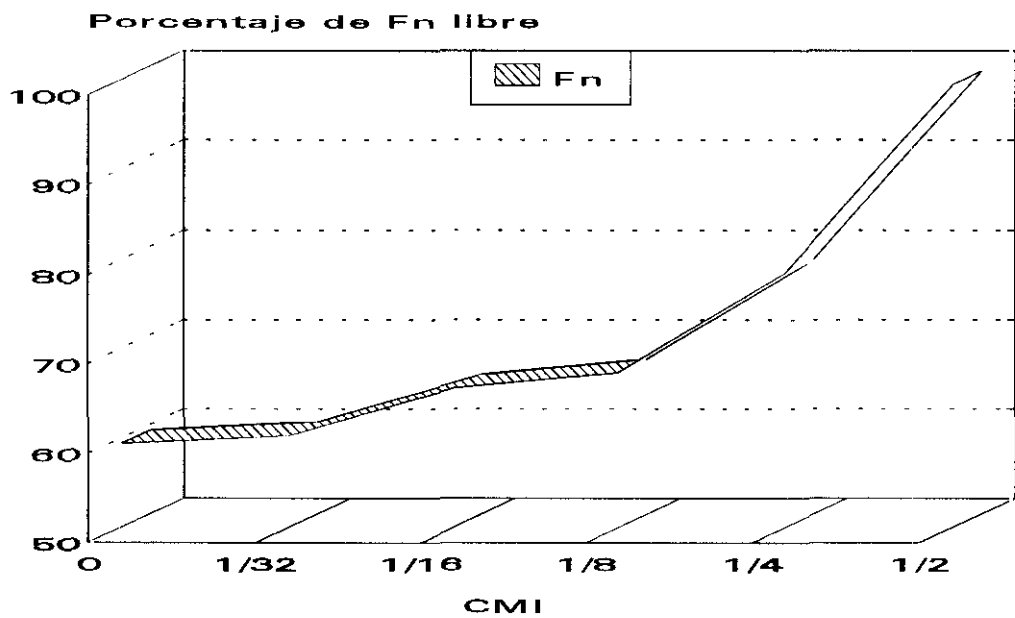


Figura 14

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	100 (0.0)	100 (0.0)	98.9 (0.1)
1/4	96.01 (0.6)	93.32 (0.2)	89.12 (0.2)
1/8	62.67 (0.7)	74.5 (0.5)	65.42(0.7)
1/16	16.10 (0.4)	25.10 (0.5)	17.17 (0.3)
1/32	9.33 (1.1)	12.8 (0.9)	4.37 (0.7)

Tabla 19: Efecto de la clindamicina sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	100 (0.0)	100 (0.0)	100 (0.0)
1/4	97.06 (0.6)	96.21 (0.4)	95.3 (0.1)
1/8	41.37 (0.8)	41.59 (1.2)	38.3 (0.3)
1/16	22.06 (0.3)	19.9 (0.2)	25.11 (0.1)
1/32	12.75 (0.4)	12.7 (0.5)	11.9 (0.7)

Tabla 20: Efecto de la clindamicina sobre la coagulación del fibrinógeno por *S.aureus*.

Efecto de CSI de clindamicina sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

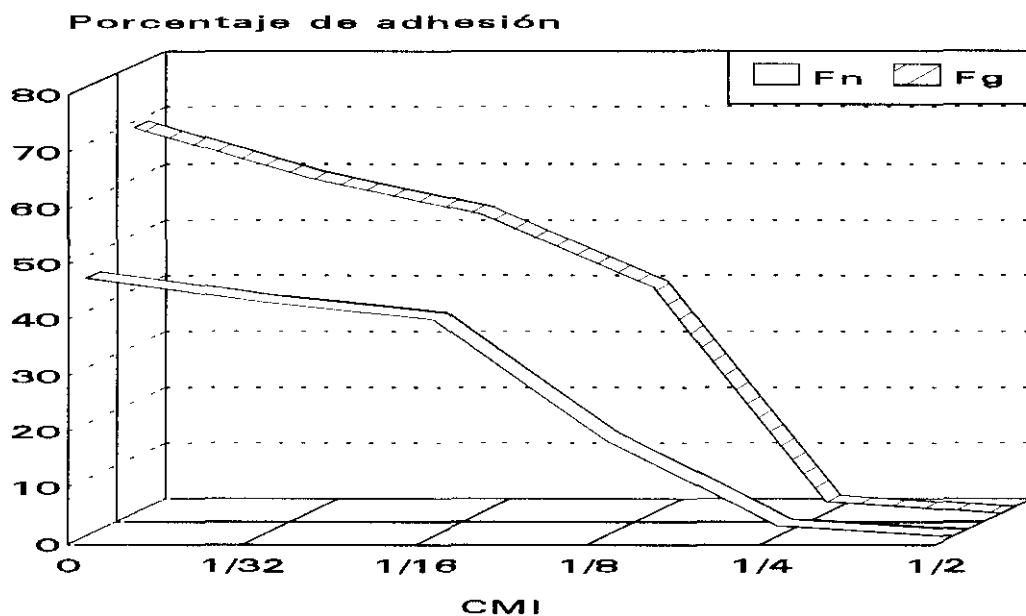


Figura 15

Efecto de CSI de clindamicina sobre la concentración de FN plasmática.

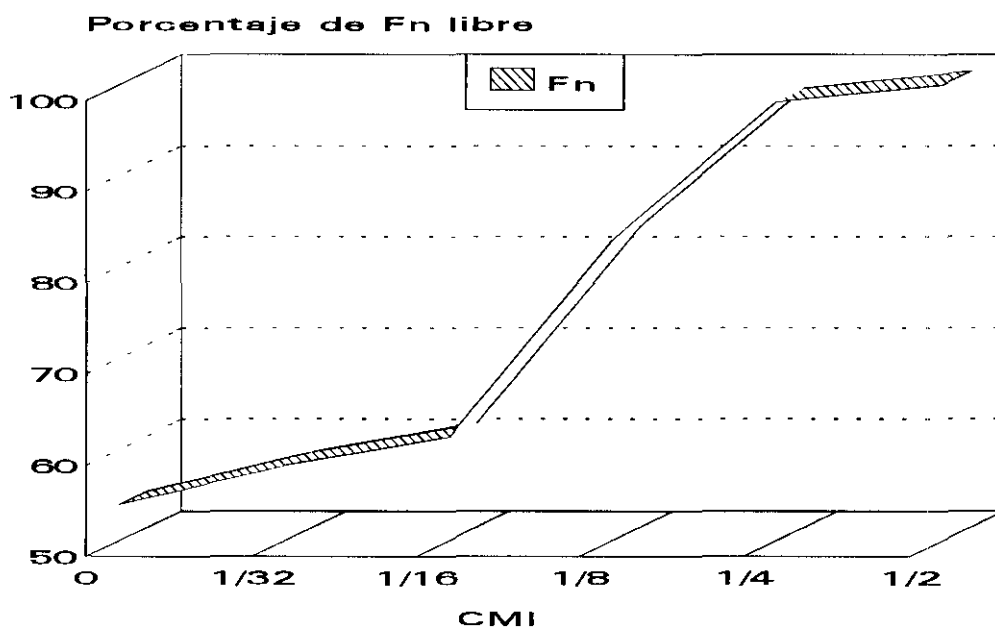


Figura 16

6.2. ANTIMICROBIANOS QUE AUMENTAN LA ADHESION DE LA FIBRONECTINA A *S.aureus*.

Este grupo incluye tres antimicrobianos:
Ampicilina, sultamicilina y cefotaxima.

En los tres casos y con las tres cepas de *S.aureus*, se observó un aumento de la adhesión reflejado por valores negativos de la inhibición.

Las 1/2 CMI eran las concentraciones subinhibitorias más eficaces, las otras concentraciones aumentaron la adhesión a menos grado. La cefotaxima era la más eficaz (-45.87% de inhibición como media de las tres cepas comparada con -25.48 y -16.79 por ampicilina y sultamicilina respectivamente).

El mayor aumento de adhesión se observó con 1/2 CMI de cefotaxima con la cepa ATCC 25923 (-60.89%), el menor aumento se observó en el caso de sultamicilina y con el aislado clínico (-11.25%).

El aumento de adhesión se acompaña de una disminución proporcional de la concentración de la fibronectina plasmática.

De otro lado, los tres antimicrobianos aumentaron la capacidad de las bacterias de coagular el fibrinógeno. Como se puede ver en las tablas, el mayor aumento de la capacidad de coagulación se asocia a la cefotaxima y la cepa ATCC 25923 (-21.25). Los tests de la Coagulasa y del Clumping Factor son rápidamente positivos.

Las diferencias entre las tres cepas no son significativas ($p > 0.7$), los resultados son las medias de 5 a 10 experimentos.

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	-22.32 (0.2)	-21.79 (0.6)	-31.48 (0.3)
1/4	-19.64 (0.2)	-19.23 (0.5)	-3.70 (0.1)
1/8	-9.49 (0.6)	-8.97 (0.6)	0 (0.0)
1/16	-5.32 (0.9)	-6.41 (1.0)	0 (0.0)
1/32	-2.58 (0.8)	-5.13 (0.7)	0 (0.0)

Tabla 21: Efecto de la ampicilina sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	-7.13 (0.9)	-9.20 (0.5)	-8.15 (0.6)
1/4	0.2 (1.5)	-2.61 (0.6)	-1.42 (0.9)
1/8	-1.2 (0.6)	0.8 (0.9)	-0.35 (0.8)
1/16	-0.61 (0.7)	0.8 (1.5)	-0.59 (1.1)
1/32	0 (0.0)	0 (0.0)	-0.12 (0.6)

Tabla 22: Efecto de la ampicilina sobre la coagulación del fibrinógeno por *S.aureus*.

Efecto de CSI de ampicilina sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

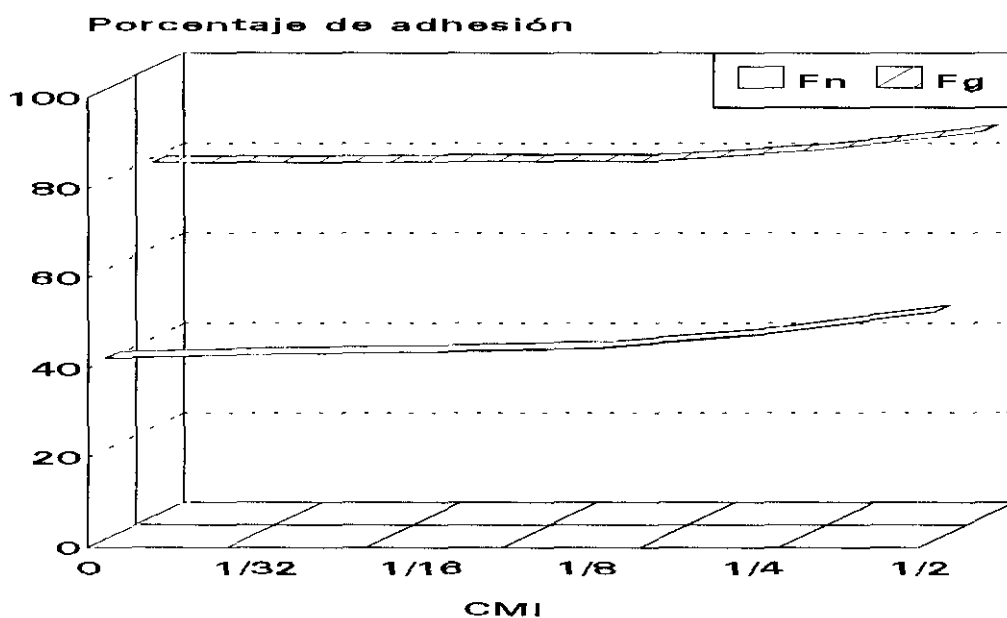


Figura 17

Efecto de CSI de ampicilina sobre la concentración de FN plasmática.

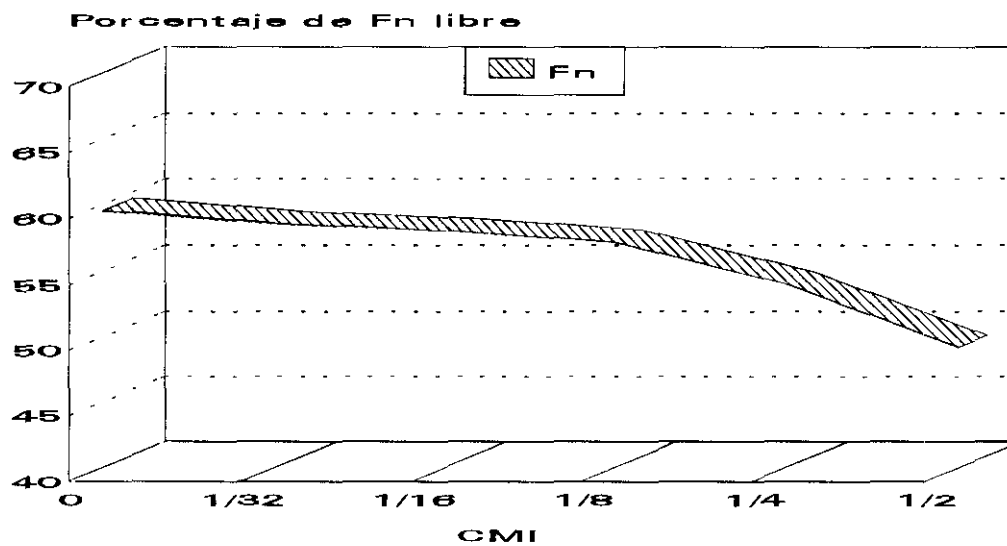


Figura 18

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	-20.29 (0.6)	-18.82 (0.4)	-11.25 (0.8)
1/4	-13.04 (0.9)	-11.76 (0.4)	-7.50 (0.8)
1/8	-7.25 (0.1)	-3.53 (1.0)	-6.25 (0.4)
1/16	-2.9 (0.9)	-1.18 (1.2)	5.01 (0.8)
1/32	0 (0.0)	0 (0.0)	-1.25 (2.6)

Tabla 23: Efecto de la sultamicilina sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	-8.5 (0.4)	-10.2 (0.2)	-9.86 (1.2)
1/4	-4.29 (0.6)	-2.31 (0.1)	-3.73 (0.2)
1/8	2.01 (1.1)	-1.5 (0.6)	1.33 (0.9)
1/16	-2.08 (0.5)	0 (0.0)	1.42 (0.3)
1/32	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Tabla 24: Efecto de la sultamicilina sobre la coagulación del fibrinógeno por *S.aureus*.

Efecto de CSI de cefotaxima sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

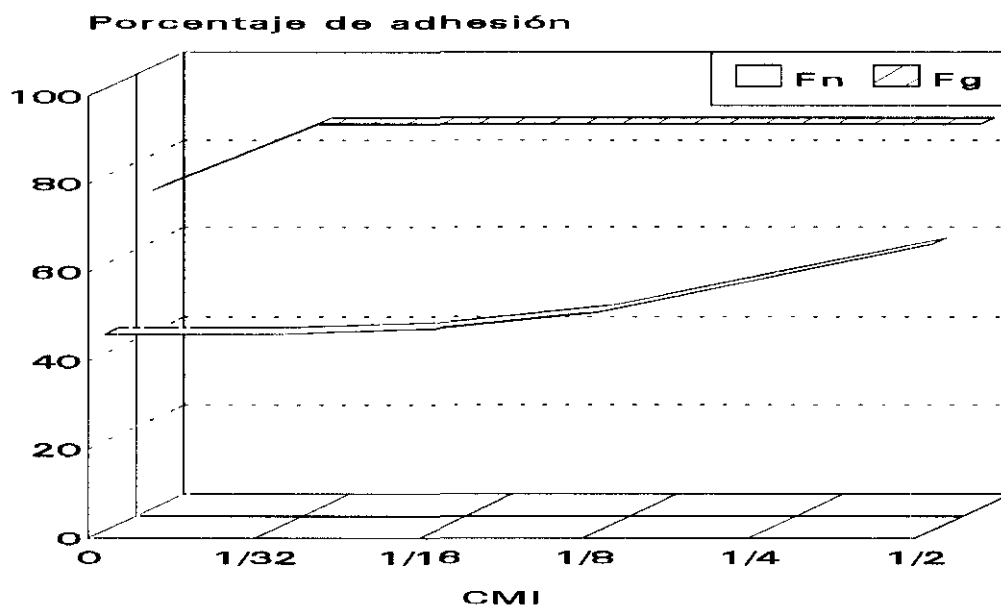


Figura 21

Efecto de CSI de cefotaxima sobre la concentración de FN plasmática.

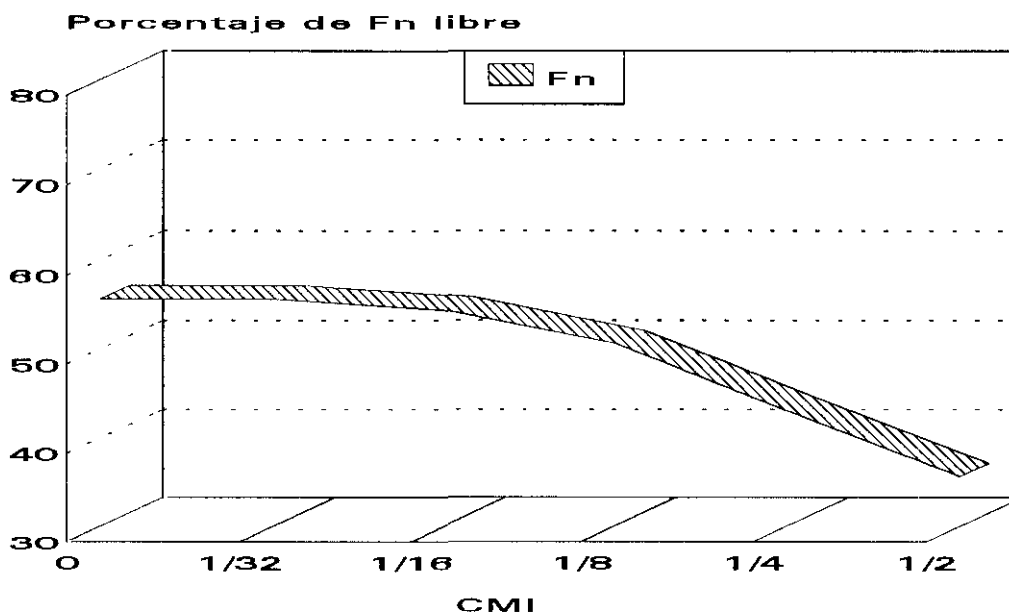


Figura 22

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S. aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	-45.07 (0.1)	-60.89 (0.6)	-31.65 (0.6)
1/4	-28.17 (0.5)	-41.23 (0.7)	-28.5 (0.1)
1/8	-11.27 (0.9)	-15.62 (0.7)	-27.9 (0.4)
1/16	-2.82 (0.5)	-4.35 (0.3)	-6.11 (0.6)
1/32	0 (0.0)	-1.32 (0.9)	0.7 (1.5)

Tabla 25: Efecto de la cefotaxima sobre la adhesión de la fibronectina a *S. aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S. aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	-21.25 (0.5)	-18.23 (0.9)	-15.2 (0.7)
1/4	-18.33 (0.4)	-10.11 (0.4)	-11.12 (0.3)
1/8	-09.11 (0.2)	-7.8 (0.1)	-5.89 (0.8)
1/16	-6.16 (0.5)	-7.8 (0.1)	-3.36 (0.4)
1/32	-1.56 (0.5)	0 (0.0)	0.9 (1.2)

Tabla 26: Efecto de la cefotaxima sobre la coagulación del fibrinógeno por *S. aureus*.

Efecto de CSI de cefotaxima sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

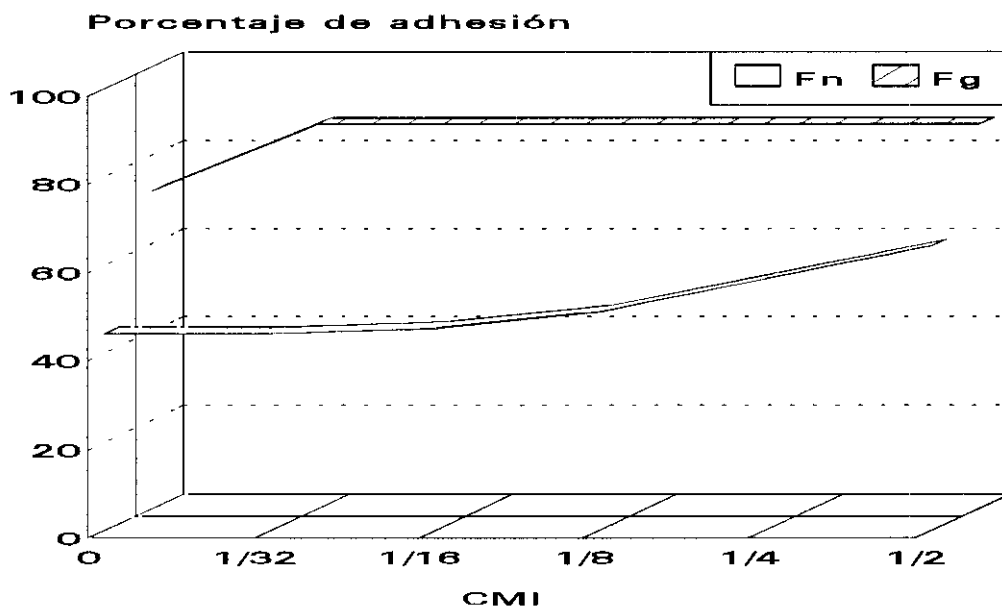


Figura 21

Efecto de CSI de cefotaxima sobre la concentración de FN plasmática.

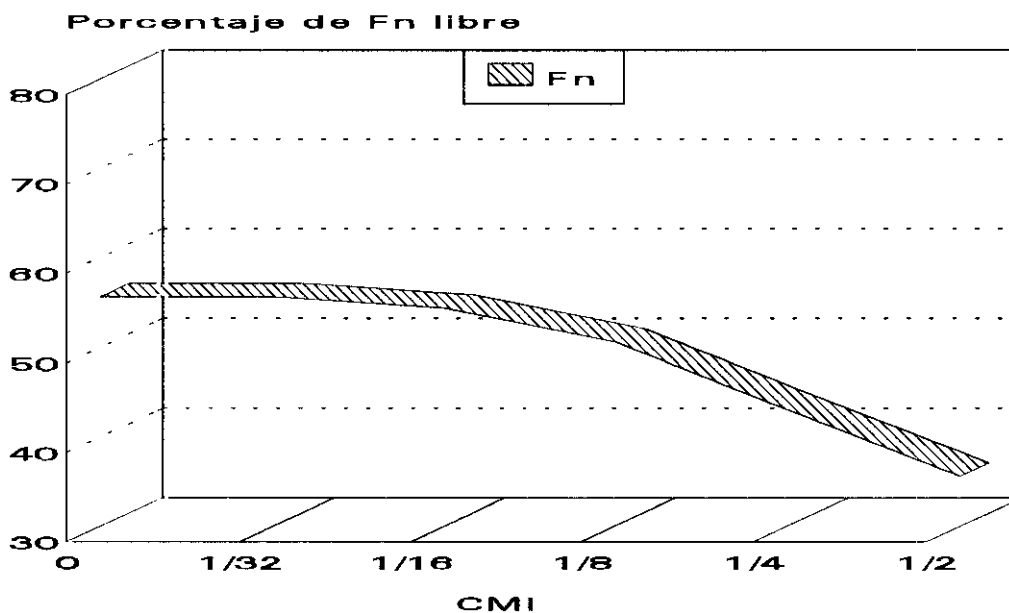


Figura 22

6.3. ANTIMICROBIANOS QUE NO AFECTAN A LA ADHESION DE FIBRONECTINA A *S.aureus*.

Se consideraron antimicrobianos que no afectan a la adhesión aquellos cuyo porcentaje de inhibición se encuentra entre -3 y 3%, lo que corresponde a una inhibición o aumento de adhesión despreciables. En este grupo se incluyen kanamicina y teicoplanina.

Los porcentajes de adhesión y de inhibición de adhesión se encuentran prácticamente invariables. Esto se acompaña de una concentración plasmática estable de fibronectina, así las concentraciones subinhibitorias de estos antimicrobianos no parecen afectar las interacciones de la fibronectina con *S.aureus*.

De otro lado, en cuanto al efecto sobre la coagulación del fibrinógeno, distinguimos dos resultados diferentes:

1- Kanamicina inhibe la coagulación por las tres cepas de *S.aureus*, esta inhibición se observa hasta con concentraciones muy bajas del antimicrobiano (1/16 CMI). El resultado se acompaña de un test negativo de la Coagulasa y del Clumping Factor.

2- En cambio, la 1/2 CMI de teicoplanina aumenta ligeramente la coagulación observada con la cepa ATCC 29213 y con el aislado clínico, mientras que la cepa ATCC 25923 parece inafectada. Este resultado se acompaña de una positividad de los tests de Coagulasa y Clumping Factor.

Las diferencias entre las tres cepas no son significativas ($p > 0.7$).

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S. aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	-2.67 (0.5)	-2.53 (0.4)	0.2 (0.6)
1/4	-1.33 (0.3)	-1.27 (0.8)	2.25 (1.3)
1/8	0.1 (0.2)	-1.27 (0.8)	0.6 (0.2)
1/16	0.4 (0.3)	0 (0.0)	1.12 (0.6)
1/32	1.33 (0.9)	0 (0.0)	1.62 (0.8)

Tabla 27: Efecto de la kanamicina sobre la adhesión de la fibronectina a *S. aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S. aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	93.5 (0.2)	100 (0.0)	92.74 (0.6)
1/4	79.29 (0.1)	81.8 (0.6)	88.39 (0.8)
1/8	69.81 (0.2)	45.5 (0.5)	60.08 (0.4)
1/16	25.36 (0.5)	23.8 (0.2)	25.33 (0.3)
1/32	3.41 (0.9)	0 (0.0)	6.24 (0.7)

Tabla 28: Efecto de la kanamicina sobre la coagulación del fibrinógeno por *S. aureus*.

Efecto de CSI de kanamicina sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

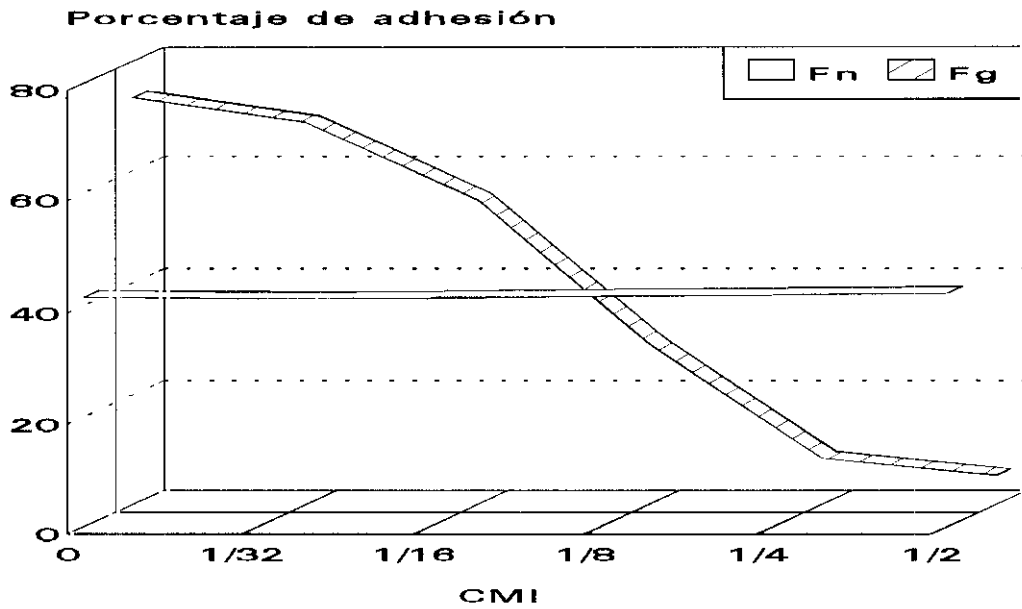


Figura 23

Efecto de CSI de kanamicina sobre la concentración de FN plasmática.

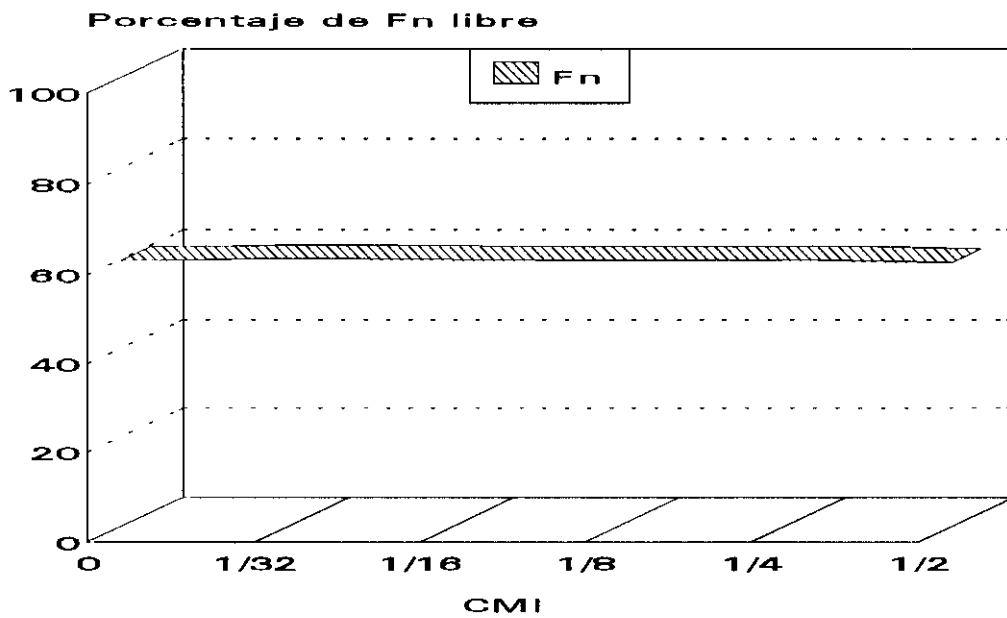


Figura 24

Porcentajes de inhibición de la adhesión (SD) de fibronectina a <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	0.22 (0.5)	1.7 (0.6)	1.8 (0.9)
1/4	0.33 (0.1)	0.8 (0.9)	0.17 (0.1)
1/8	-1.33 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
1/16	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
1/32	1.33 (4.2)	0.82 (1.6)	0 (0.0)

Tabla 29: Efecto de la teicoplanina sobre la adhesión de la fibronectina a *S.aureus*.

Porcentajes de inhibición de la coagulación (SD) del fibrinógeno por <i>S.aureus</i> .			
CSI	ATCC		Aislado clínico
	25923	29213	Hemocultivo
1/2	-0.09 (0.3)	-8.60 (0.6)	-7.80 (0.7)
1/4	-0.09 (0.3)	-5.80 (0.4)	-2.56 (0.3)
1/8	-0.09 (0.3)	-3.80 (0.1)	-1.89 (0.8)
1/16	-0.03 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
1/32	-0.03 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)

Tabla 30: Efecto de la teicoplanina sobre la coagulación del fibrinógeno por *S.aureus*.

Efecto de CSI de teicoplanina sobre las interacciones S.aureus-Fn y Fg.

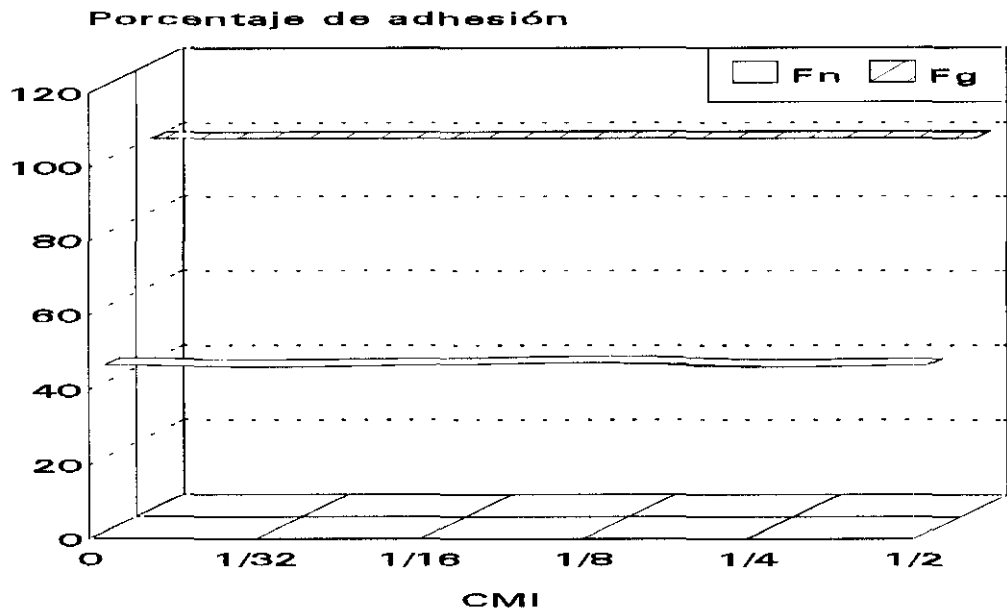


Figura 25

Efecto de CSI de teicoplanina sobre la concentración de FN plasmática.

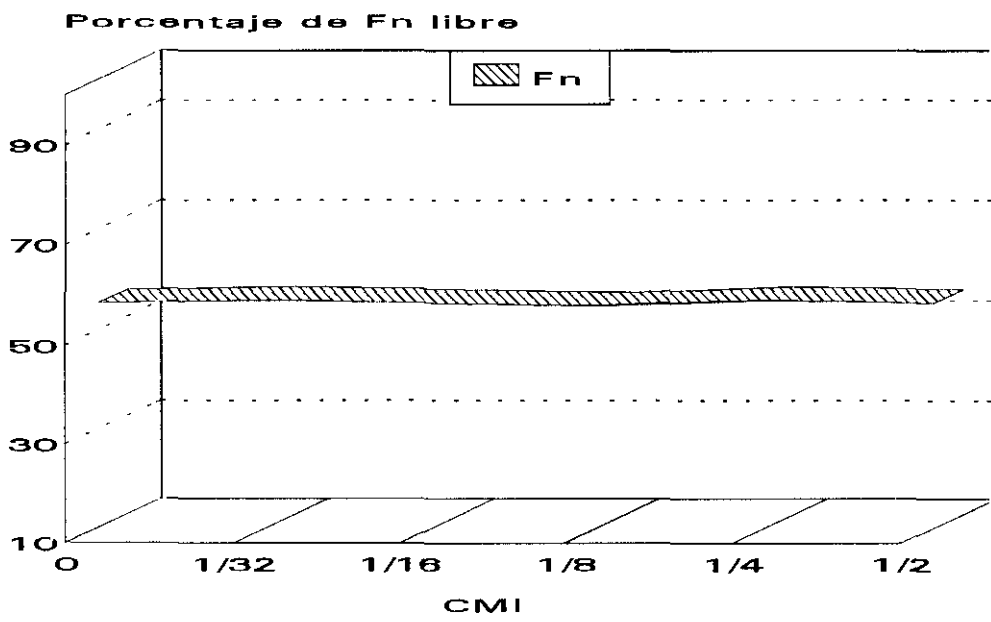


Figura 26

7. FIBRONECTINA-COAGULOS DE FIBRINA.

7.1 EFECTO DE LA FIBRONECTINA EN LA ADHESION DE *S.aureus* A COAGULOS DE FIBRINA.

En la tabla 31 se muestra el número de bacterias de las tres cepas de *S.aureus* adheridas a coágulos de fibrina formados a partir de plasma con y sin fibronectina y utilizando un inóculo bacteriano de 10^7 UFC, como se muestran los porcentajes de adhesión en cada caso y los porcentajes de adhesión debida a la fibronectina. Las tres cepas de *S.aureus* manifestaron porcentajes idénticos de adhesión a coágulos en presencia de fibronectina (65.6, 66.4 y 66.1% respectivamente por las cepas ATCC 25923, 29213 y el aislado clínico). Estos porcentajes bajan respectivamente a 50.4, 48.9 y 58.4% con coágulos sin fibronectina. La figura 27 representa el efecto de la fibronectina sobre esta adherencia.

<i>S.aureus</i>	Inóculo: UFCx10 ⁵	UFCx10 ⁵ adheridas		Porcentajes de adhesión		
		con Fn	sin Fn	sin Fn	con Fn	debida a Fn
ATCC 25923	2,5 (1,2)	1,6 (0,5)	1,3 (3,3)	50,4 (0,5)	65,6 (3,3)	15,2 (4,6)
ATCC 29213	4,5 (0,9)	2,9 (2,6)	2,2 (0,4)	48,9 (2,6)	66,4 (0,4)	17,5 (1,1)
Aislado clínico	3,4 (2,5)	2,2 (1,9)	1,8 (1,1)	52,4 (1,9)	66,1 (1,1)	13,7 (2,1)

Tabla 31: Efecto de la fibronectina en la adhesión de *S.aureus* a coágulos de fibrina.

Los resultados son las medias (SD) de cinco experimentos.

7.2. EFECTO DE LA REPLECION Y SATURACION CON Fn.

Como se puede observar en la figura 28, al añadir cantidades crecientes de fibronectina purificada al coágulo del que se había eliminado la fibronectina, la adhesión de *S.aureus* aumenta en función de la concentración de fibronectina añadida. Con 230 mcg de fibronectina, el porcentaje de adhesión vuelve a la normal (igual que aquello observado con coágulo con concentración normal de fibronectina. La saturación del coágulo normal con concentraciones de fibronectina (figura 29) no tiene afecto sobre la adhesión de *S.aureus* y la curva tiene un aspecto horizontal.

Efecto de la Fn en la adhesión de S.aureus a coágulos de fibrina.

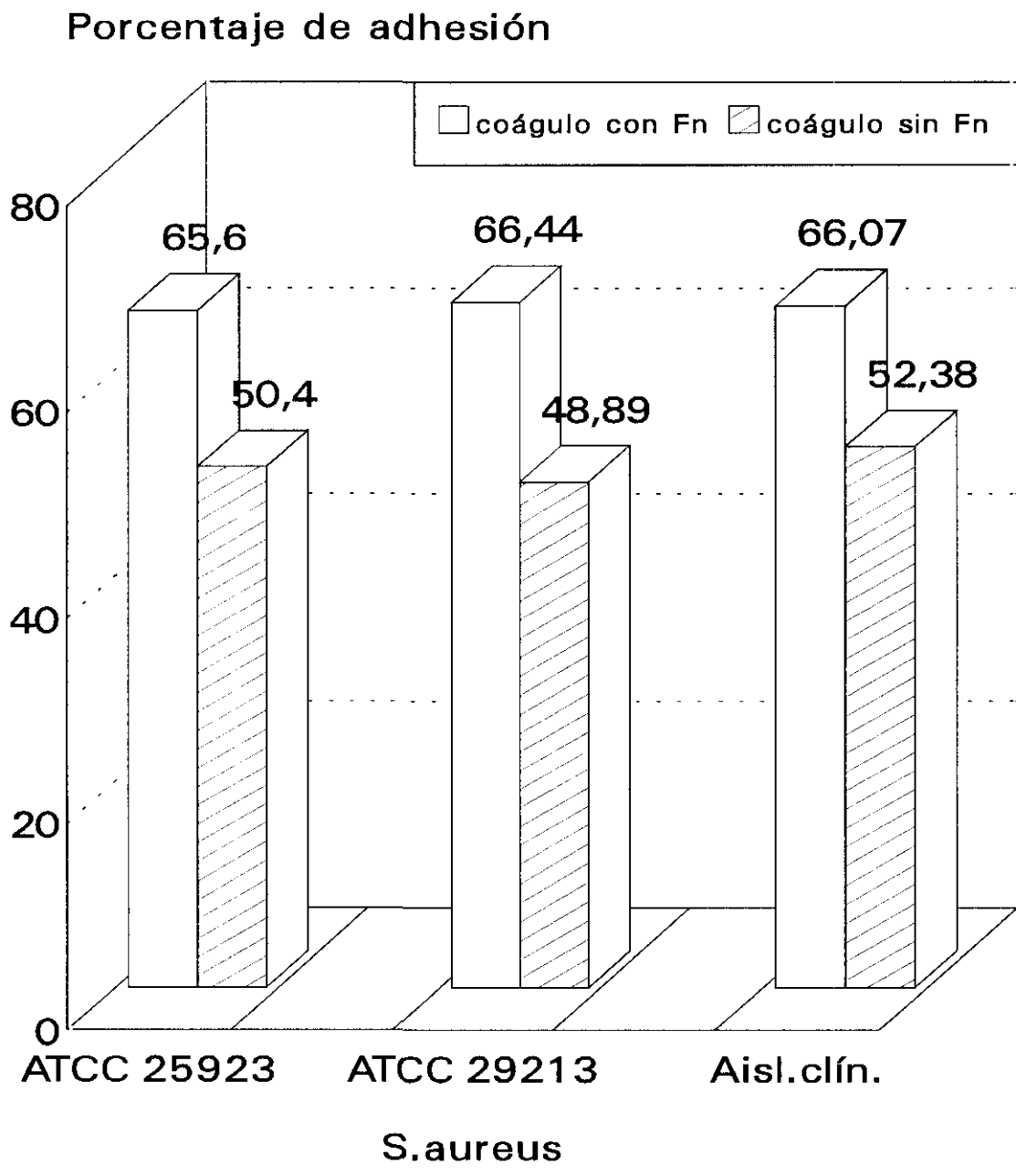


Figura 27

Efecto de la repleción del coágulo con F_n sobre la adherencia de S.aureus.

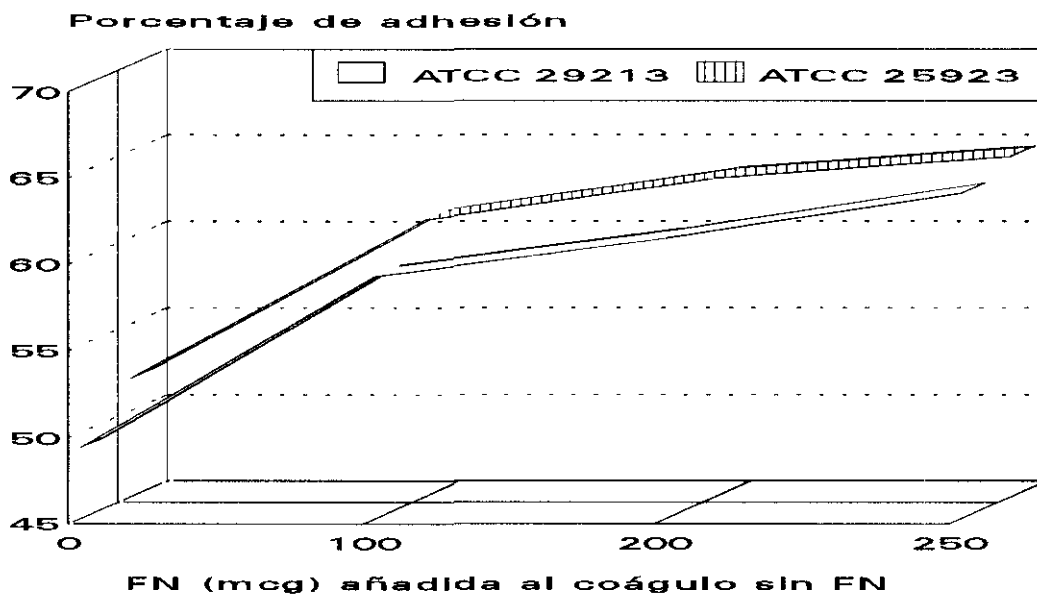


Figura 28

Efecto de la saturación del coágulo con F_n sobre la adherencia de S.aureus.

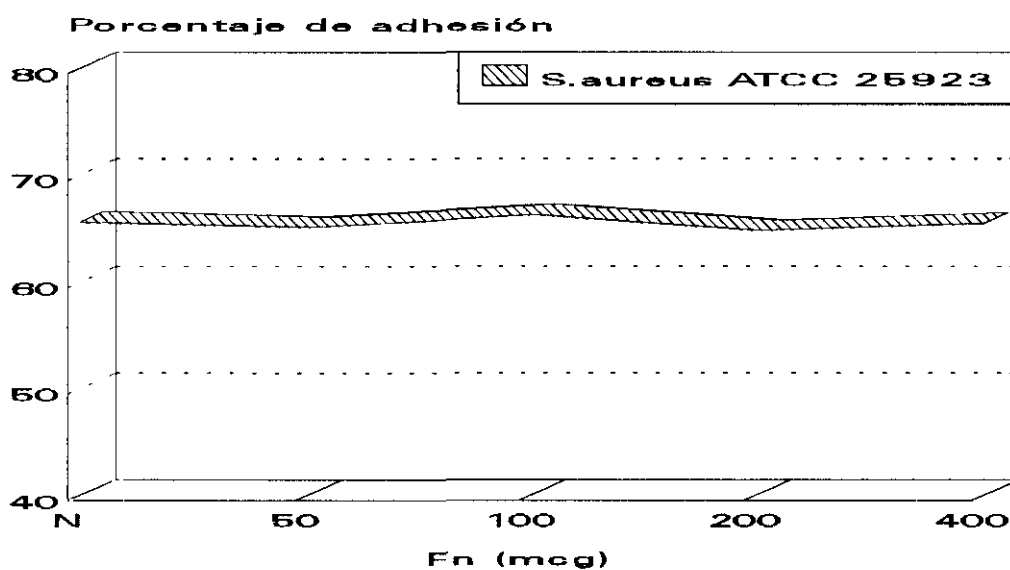


Figura 29

N: coágulo de plasma con concentración normal de F_n.

7.3. EFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA ADHESION DE *S.aureus* A COAGULOS DE FIBRINA.

Los efectos del tratamiento de *S.aureus* con 1/2 CMI de antimicrobianos se muestran en la tabla 32. Azitromicina, ampicilina, sultamicilina y ligeramente la teicoplanina dieron lugar a un aumento de adherencia a coágulos con fibronectina, la mayor adhesión se observó con ampicilina (97.7% en comparación con una adhesión-control de 59.76%). Cuando se eliminó la fibronectina del coágulo, estos porcentajes de adhesión disminuyeron significativamente en comparación con aquellos en presencia de fibronectina aunque se sigue observando un aumento ligero de adhesión sobre el control excepto en el caso de teicoplanina. Con tetraciclina y norfloxacino, se observa un descenso de adhesión a ambos tipos de coágulos (con y sin fibronectina). Este descenso presenta un máximo con la tetraciclina (14.1% en comparación con un control de 59.76). Kanamicina no afectó la adhesión a los coágulos, y se observan porcentajes de adhesión idénticos a los controles. En cuanto a la adhesión debida a la fibronectina, azitromicina, ampicilina, sultamicilina y teicoplanina la aumentaron, tetraciclina y norfloxacino la disminuyeron y kanamicina no la afectó significativamente.

Antimicrobiano	Inóculo: UFCx10 ⁵	UFCx10 ⁵ adheridas		Porcentajes de adhesión		
		con Fn	sin Fn	con Fn	sin Fn	debida a Fn
Azitromicina	12,6 (1,1)	09,9 (0,9)	6,0 (0,2)	78,6 (0,5)	47,6 (0,1)	31 (3,1)
Norfloxacino	14,0 (2,6)	05,5 (0,5)	4,3 (3,1)	39,3 (0,4)	30,7 (2,3)	8,6 (3,5)
Ampicilina	15,1 (4,4)	14,5 (2,1)	8,5 (0,5)	96,7 (1,2)	58,6 (0,6)	38,1 (0,4)
Tetraciclina	08,5 (0,6)	01,2 (1,4)	2,1 (2,1)	14,1 (0,9)	24,7 (1,8)	-10,6 (2,2)
Sultamicilina	13,7 (0,5)	12,6 (0,6)	8,8 (1,4)	91,9 (0,5)	64,2 (1,0)	27,7 (1,9)
Kanamicina	10,8 (1,9)	05,4 (0,8)	4,1 (0,8)	50,0 (0,5)	37,9 (0,7)	12,1 (5,4)
Teicoplanina	17,5 (2,8)	09,7 (1,6)	4,6 (0,7)	55,1 (0,8)	26,3 (0,6)	28,8 (2,7)
Sin antimicrob.	09,9 (3,0)	04,9 (0,3)	3,6 (0,1)	49,5 (0,1)	36,4 (0,5)	13,1 (4,2)

Tabla 32: Efecto de antimicrobianos sobre la adhesión de *S.aureus* atcc 25923 a coágulos con y sin fibronectina. Los resultados son las medias (SD) de cinco experimentos.

Efecto de antimicrobianos sobre la adherencia de S.aureus a coágulos.

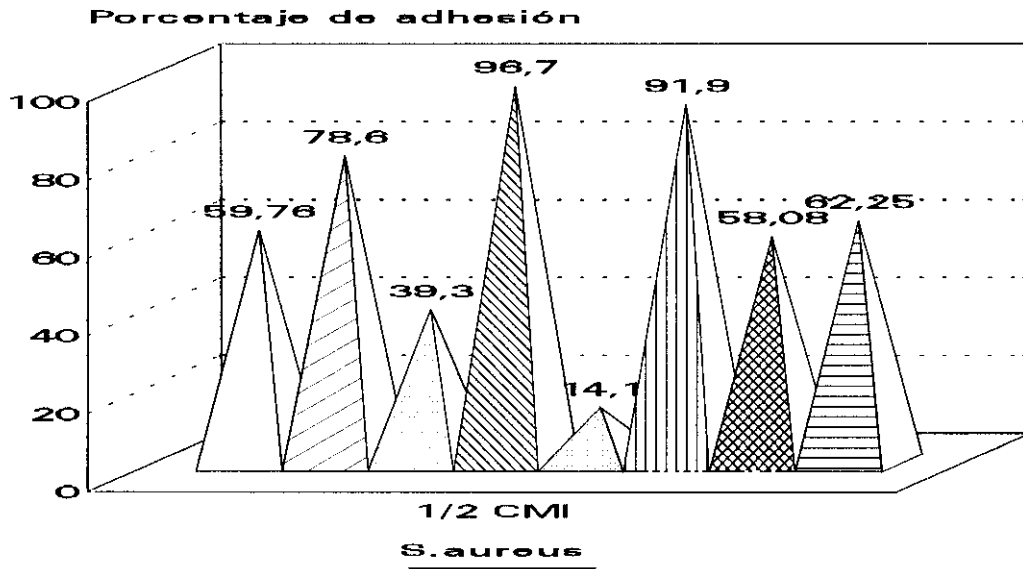


Figura 30
Coágulo con Fn

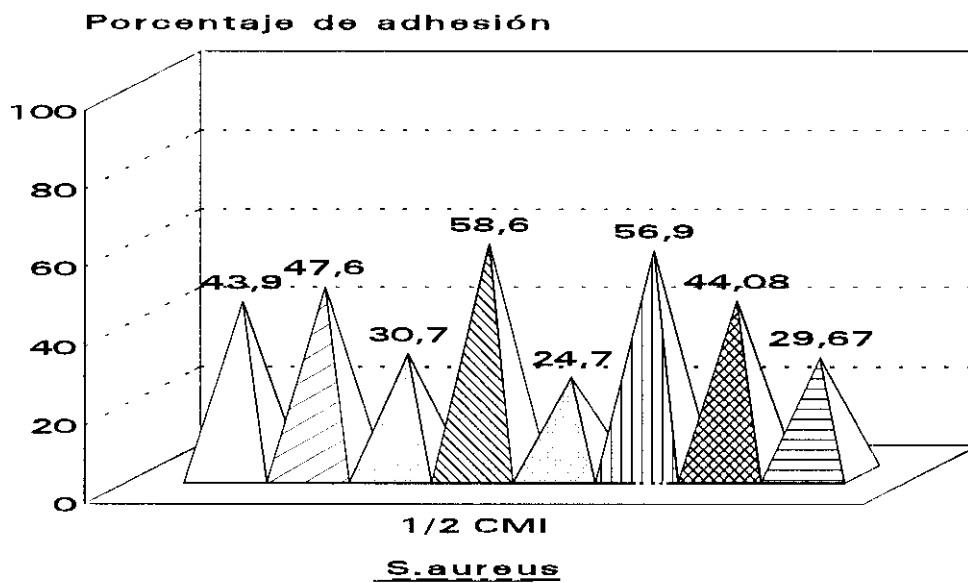
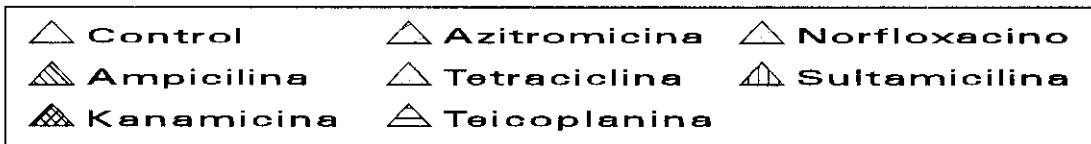


Figura 31
Coágulo sin FN.

8. EFECTOS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES *S.aureus*-FIBRINOGENO.

Resultados del test de coagulasa (C) y del clumping factor (CF) de <i>S.aureus</i> .						
Tratamiento antimicrob.	ATCC				Aislado clínico	
	25923		29213		Hemocultivo	
1/2 CMI de:	C	CF	C	CF	C	CF
<i>Control sin antimicrob.</i>	+	+	+	+	+	+
Azitromicina	-	-	-	-	-	-
Norfloxacino	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	++	++	++	++	+	+
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-
Sultamicilina	++	++	++	++	++	++
Kanamicina	+-	-	+-	-	-	-
Cefotaxima	++	++	++	++	++	++
Clindamicina	-	-	-	-	-	-
Teicoplanina	+	++	+	++	+	+
Ciprofloxacino	-	-	-	-	-	-

Tabla33

Reacción positiva en menos de 20 segundos (CF) y 2 horas (C)..... (+)

Reacción positiva en menos de 10 segundos (CF) y 1 hora (C)..... (++)

Reacción negativa hasta 30 segundos (CF) y hasta 8 horas (C)..... (-)

Comienzo de coagulación a partir de las 8 horas (C)..... (+-)

Efecto de CSI de antimicrobianos sobre la adhesión de Fn a S.aureus.

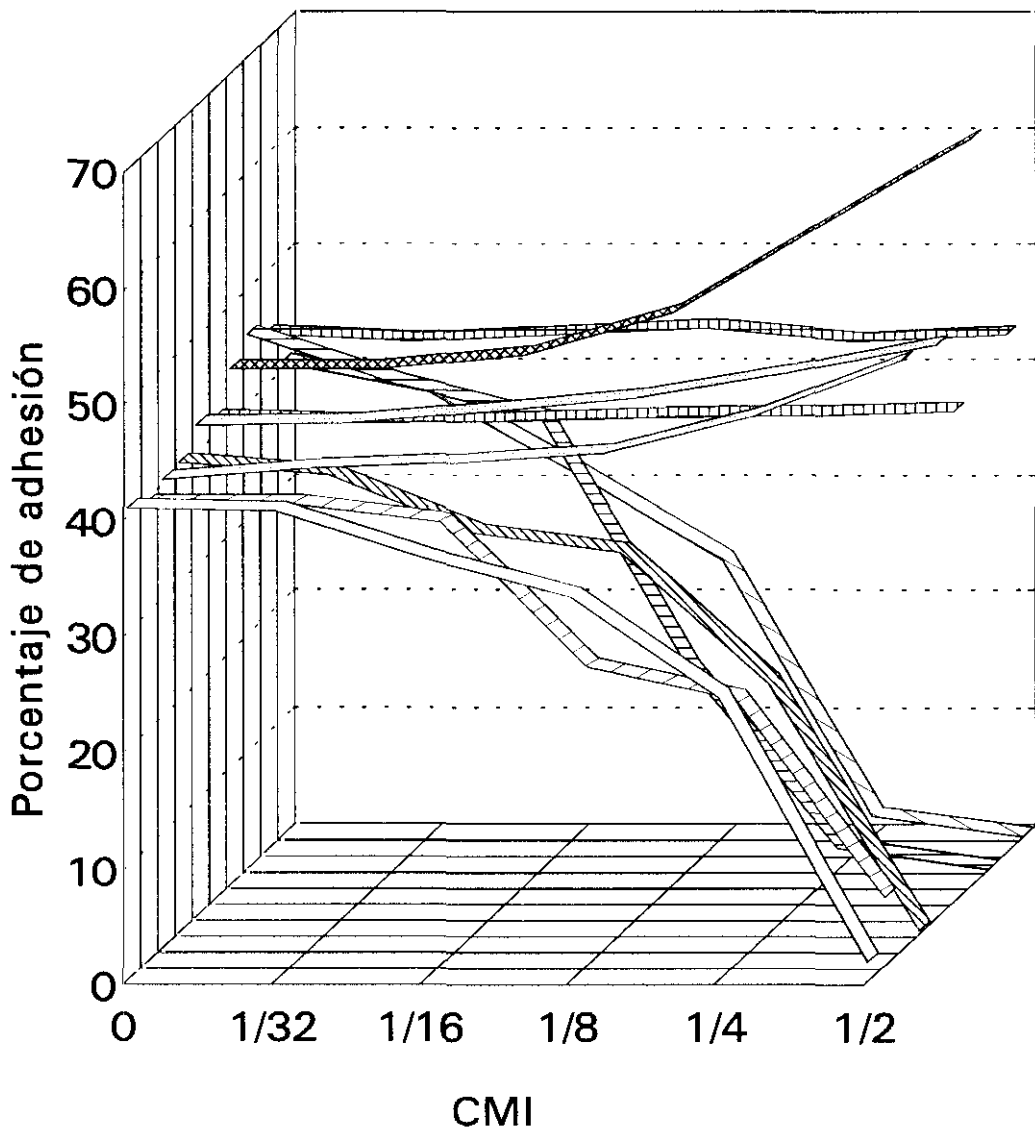
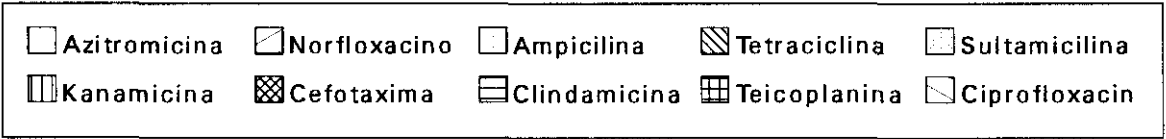
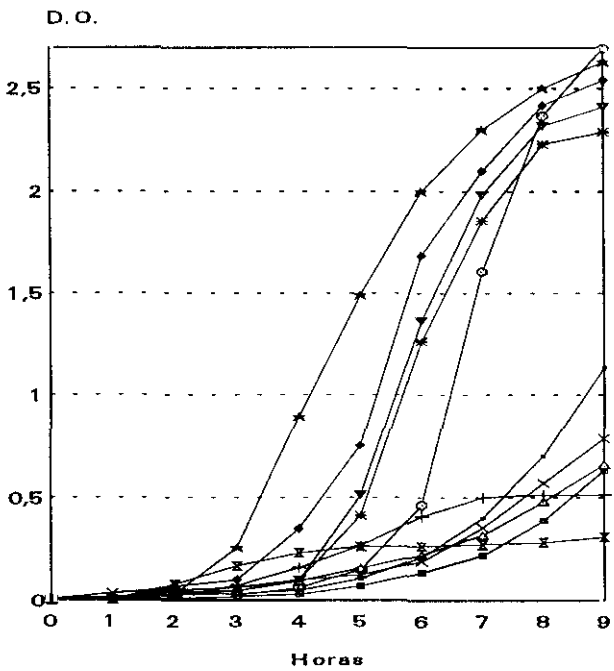


Figura 32

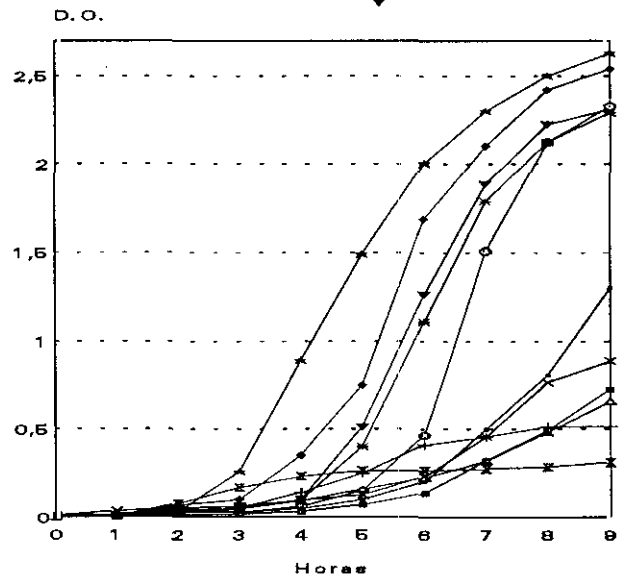
Crecimiento de S.aureus con 1/2 CMI de antimicrobianos

- | | | | |
|------------------|-----------------|----------------|------------------|
| —○— Azitromicina | + Norfloxacino | * Ampicilina | ■ Tetraciclina |
| × Kanamicina | ◆ Cefotaxima | △ Clindamicina | ⊗ Ciprofloxacino |
| ⊙ Teicoplanina | ▽ Sultamicilina | ☆ Control | |



← *S.aureus* ATCC 25923

S.aureus : aislado clínico



← *S.aureus* ATCC 29213

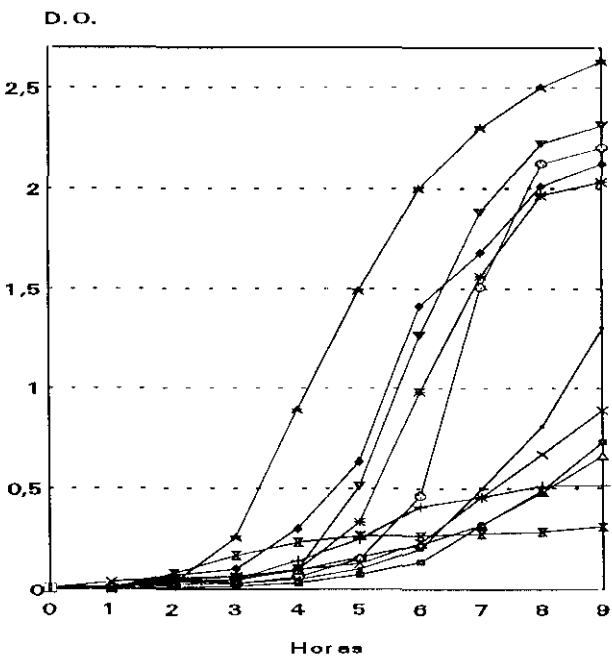


Figura 34

"Efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre las interacciones fibronectina-Staphylococcus aureus"

V. DISCUSION

1. EVALUACION DEL MODELO EXPERIMENTAL

1.1 NEFELOMETRIA

El método de la determinación de fibronectina por nefelometría se basa en el principio de que la fibronectina contenida en el plasma, en una reacción inmunoquímica con anticuerpos específicos, forman inmunocomplejos. Las concentraciones existentes pueden determinarse cuantitativamente mediante medición de la dispersión luminosa y del enturbimiento. La valoración se efectúa mediante una curva de referencia obtenida con ayuda de diluciones estándar.

Los antisueros utilizados son de origen animal elaborados mediante inmunización de conejos con las correspondientes proteínas plasmáticas. Los anticuerpos inespecíficos se eliminaron mediante inmunoadsorción con fracciones protéicas de suero o de plasma humano. La especificidad de estos antisueros permite su uso en la mayoría de los métodos inmunoquímicos de precipitación.

Como muestran los resultados del estudio de imprecisión y sensibilidad, el nefelómetro permite una determinación precisa de las concentraciones de fibronectina. Las medias, las desviaciones estándares y el intervalo de variación determinados cada vez son aceptables y los límites de la detección (los valores mínimos de fibronectina que se pueden medir) no se alcanzan debido a que se utilizó plasma con valores normales de fibronectina.

Es una técnica sencilla y rápida que permite una determinación precisa de la fibronectina soluble.

1.2. USO DE PLASMA COMO FUENTE DE FIBRONECTINA SOLUBLE.

La incubación "in vitro" de *S.aureus* con plasma humano de voluntarios sanos y a continuación la medición de los niveles de fibronectina reproduce con cierta precisión lo que ocurre realmente en la sangre cuando se encuentra el microorganismo en la circulación sanguínea. Otros trabajos se hicieron con solución de fibronectina purificada (127-129,37-44); el uso de fibronectina purificada es importante para el estudio de las interacciones fibronectina-bacterias pero el uso de plasma se puede considerar como un modelo que refleja las interacciones que ocurren en la sangre aproximándose más a las condiciones "in vivo".

Así, este método además de ser económico, permite el estudio de los efectos que producen los antimicrobianos sobre las interacciones *S. aureus*-fibronectina plasmática una vez se encuentra el microorganismo en la sangre además que incluye el descenso en la concentración de fibronectina debido a la coagulación plasmática.

En cuanto a los inconvenientes, la medición de la disminución de las concentraciones plasmáticas de fibronectina tras incubación del plasma con *S. aureus* es poco sensible utilizando inóculos bajos de bacterias. Se pudo determinar el descenso de fibronectina utilizando inóculos hasta 5×10^6 UFC, con inóculos más bajos, la técnica no detecta el descenso probablemente muy pequeño.

1.3. CRECIMIENTO DE *S. aureus* CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias se determinaron después de una incubación "overnight" (18-24 horas), el crecimiento de las bacterias con concentraciones subinhibitorias para los ensayos se realizó cambiando algunas condiciones (se crecieron en agitaciones a 150 rpm) lo que implica un crecimiento más rápido de las bacterias, esta diferencia no ha dado lugar a cambios en las CMIs. La turbidez medida por espectrofotometría guarda relación directa con el crecimiento bacteriano y el número de bacterias (127), como se demuestra en la figura 34, el crecimiento de *S. aureus* con 1/2 CMI de distintos antimicrobianos produjo un retraso en el crecimiento bacteriano.

De otra parte, como algunos antimicrobianos producen a concentraciones subinhibitorias cambios en la morfología bacteriana (elongaciones, membranas comunes etc.) (96,101-112), fenómeno que puede dar lugar a errores del recuento bacteriano (más de una bacteria dan lugar a una colonia única), Cuando se estudió el efecto de antimicrobianos sobre la adherencia de *S. aureus* a coágulos de fibrina, se realizó cada vez un recuento comparativo entre bacterias tratadas con antimicrobiano y bacterias normales no tratados partiendo de la misma turbidez (D.O. =0.3) comprobando que el número de bacterias utilizado como inóculo es idéntico en los dos casos.

1.4. DEPOSITO POR CENTRIFUGACION DE LAS BACTERIAS CON LA FIBRONECTINA ADHERIDA.

El depósito se hizo mediante centrifugación a 3500/rpm durante 30 minutos. Se eligió este tiempo y esta velocidad porque en estas condiciones el número de bacterias encontrado en el sobrenadante se encuentra despreciable en comparación con el inóculo bacteriano utilizado. El lavado de este sedimento (*S. aureus* + Fn adherida) seguido con la determinación de la concentración de fibronectina en este lavado muestra que la cantidad de fibronectina liberada no es significativa (< 21 mg/l) razón por la que se descartó la importancia de lavar el "pellet".

1.5. ELIMINACION DE LA FIBRONECTINA DEL PLASMA

Para quitar la fibronectina del plasma los investigadores se basaron sobre la afinidad que tiene esta proteína a la gelatina y utilizaron la cromatografía (gelatin-sepharose-4B-column) (79-81). En este trabajo se utilizan antisueros "anti-fibronectina" siendo anticuerpos específicos. El tratamiento del plasma con el antisuero consigue eliminar la totalidad la fibronectina del plasma (concentración de fibronectina <21 mg/l). La ventaja de este método sobre otros puede ser la alta especificidad de las interacciones antígeno-anticuerpo.

1.6. USO DE COAGULOS DE FIBRINA

Para el estudio de la adherencia de *S. aureus* a la fibrina, algunos autores utilizaron coágulos de fibrina (80,82), otros utilizaron matriz de fibrina en placa de petri (79). En este trabajo, y para evitar las deformaciones que pueden sufrir los coágulos al formarse en recipientes distintos o al transportarse, se han utilizado tubos idénticos y los ensayos de adhesión se realizaron directamente en éstos sin transportar los coágulos visto que se pueden romper fácilmente durante el manejo experimental.

2. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

2.1. DETERMINACION DE LA FIBRONECTINA DE PLASMA Y SUERO CORRESPONDIENTES

Según algunos autores que han estudiado las interacciones de la fibronectina con el fibrinógeno (89,136), la concentración de la fibronectina en el suero es de 20 a 50% más baja que en el plasma. Con una temperatura entre 22 y 37°C, la incorporación de la fibronectina en el coágulo se debe a un enlace covalente catalizado por el factor XIIIa entre la fibronectina y la cadena alfa de la molécula de fibrina; a 4°C, la incorporación de fibronectina es mayor (89).

En este trabajo, para determinar el porcentaje de incorporación de fibronectina en la matriz de fibrina a la hora de la coagulación, se determinaron los niveles de esta proteína en plasma y suero correspondientes, la coagulación se realizó a una temperatura entre 26 y 30°C. La media aritmética de este porcentaje de incorporación fue de 19,24 con una desviación estándar de 5,41.

2.2. EFECTO DE INCUBACION DE *S.aureus* CON PLASMA, SUERO Y FIBRONECTINA PURIFICADA

Cuando se incubó *S.aureus* con plasma, la concentración de fibronectina se encontraba más baja. La presencia de esta bacteria en contacto con el plasma origina el descenso de la concentración de fibronectina probablemente por dos causas:

1- Las interacciones de la fibronectina con las bacterias. Se sabe que *S.aureus* tiene en su superficie receptores específicos de la fibronectina (37-40, 42-45), cuando esta adhesión ocurre, es del tipo irreversible y saturable (37,44).

2- La coagulación del fibrinógeno que incorpora en el coágulo una parte de la fibronectina (89, 75-77).

De otro lado, la incubación de *S.aureus* (5×10^8 UFC) con plasma produce un descenso de 42,9% del nivel plasmático de fibronectina y un descenso de 28,8% del nivel plasmático de fibrinógeno como medias de las tres cepas, mientras que, y según nuestras

determinaciones, la concentración de la fibronectina en el suero (que corresponde a la coagulación del 100% del fibrinógeno) es de 19,24% más baja que en el plasma (tabla 3).

Este resultado muestra que la coagulación de una parte del fibrinógeno debida a la presencia de *S.aureus* es responsable de una parte del descenso del nivel plasmático de fibronectina y este descenso es menor que aquel debido a las interacciones de la fibronectina con las bacterias por la razón que la coagulación de todo el fibrinógeno conlleva una disminución de sólo 19,24% del nivel de la fibronectina.

Entonces, el descenso de la concentración de fibronectina se debe principalmente a las interacciones de la proteína con las bacterias en presencia del F XIIIa. Este factor juega un papel muy importante en dichas interacciones (89, 75-77). Los autores lo describieron como factor imprescindible para las interacciones *S.aureus*-fibronectina (79,82,89).

Nuestros resultados en cuanto al efecto de la incubación de *S.aureus* (10^8 UFC) con suero o con fibronectina purificada muestran que en estas condiciones la bajada de fibronectina es menor (14.7 y 15.3% respectivamente por suero y fibronectina purificada), esta diferencia se debe probablemente a dos factores:

1- Ausencia de la coagulación del fibrinógeno.

2- Ausencia del F XIIIa y otros factores plasmáticos que se pierden después de la coagulación y que son prácticamente ausentes en el suero.

En algunos trabajos se ha estudiado la adhesión de la fibronectina purificada a *S.aureus* y se han encontrado resultados similares a los nuestros (82). Aunque con plasma no se han hecho muchos trabajos, los primeros trabajos de Kuusela se hicieron con plasma y fueron los primeros en demostrar las interacciones fibronectina-*S.aureus* (137).

De otro lado, y en cuanto a los porcentajes de adhesión a la fibronectina plasmática, las tres cepas ensayadas de *S.aureus* muestran resultados semejantes, la diferencias observadas no son significativas ($p=0.92$) por lo tanto se han considerado los resultados como similares.

Como se puede observar en las tablas y con las tres cepas, la adhesión a la fibronectina llega a un máximo con un inóculo bacteriano de 10^7 UFC a partir del cual se mantiene prácticamente estable. Mientras que el porcentaje de coagulación del fibrinógeno sigue una curva parabólica, llegando a un máximo con 10^7 UFC, inóculos más grandes o

más pequeños dan lugar a concentraciones más bajas probablemente porque la presencia de un gran número de bacterias en el medio puede bloquear las interacciones molécula-bacterias.

Otras dos conclusiones se pueden sacar de estos datos:

1- La coagulación del fibrinógeno y la adhesión de la fibronectina, ambas debidas a la presencia de *S.aureus*, se observan unidas y directamente relacionadas pero siguen curvas distintas probablemente porque dependen de factores distintos.

2- El inóculo de 10^7 UFC produce una mayor bajada simultánea de fibronectina y de fibrinógeno.

Durante una sepsis, las bacterias se encuentran en la circulación y en contacto directo con la fibronectina plasmática libre; en este caso, las interacciones fibronectina-*S.aureus* producen una disminución de los niveles plasmáticos de fibronectina (138-141). Sin embargo, estas interacciones no son la única causa de la disminución de la concentración plasmática de fibronectina (143); de una parte la fibronectina ayuda a la fagocitosis de *S.aureus* desempeñando el papel de una opsonina no específica y está directamente relacionada con la actividad del sistema retículo-endotelial (140,143) responsable de eliminar los residuos y restos orgánicos, de otra parte el inóculo bacteriano encontrado "in vivo" no llega a coincidir con las condiciones "in vitro" donde se utilizan inóculos muy altos.

Klingeman (143) resume las causas del descenso de la fibronectina en el shock séptico de la manera siguiente:

1- Las alteraciones hepáticas reducen la síntesis de la proteína.

2- En el caso de Coagulación Intravascular Diseminada, la fibronectina está consumida por fijación a monómeros de fibrina.

3- La fibronectina es utilizada como opsonina, dado que numerosos productos metabólicos pasan a la circulación, siendo la mayoría de ellos fijados por la fibronectina.

4- Se produce una reducción de fibronectina a través de procesos proteolíticos mediados por proteasas, que son liberadas en mayor cantidad por leucocitos y bacterias.

Se ha asociado con un empeoramiento del cuadro clínico la disminución de la concentración de fibronectina; dicha disminución parece ser un factor esencial sobre todo en el mantenimiento del estado de shock (138,139,143).

2.3. ESTUDIO DE LOS PARAMETROS

2.3.1. INOCULO BACTERIANO

El inóculo bacteriano es un factor importante en el estudio de la fisiopatología de las infecciones. Desde que se empezó a estudiar la endocarditis infecciosa experimental, se consideró el inóculo como factor determinante de la colonización de válvulas por los distintos microorganismos (76-81, 144). Así, la incidencia de la infección se puede ajustar fácilmente cambiando el inóculo (78-83, 144). De esta manera se define la ID⁹⁰ como "dosis infecciosa" necesaria para infectar el 90% de los animales (144, 54). Durack y cols. utilizan un inóculo de 10⁸ UFC (vía intravenosa) y causan la infección en 100% de los animales (ID⁹⁰ = 10⁶-10⁷ UFC).

Kuypers y Proctor (145) aislaron una cepa mutante de *S.aureus* con baja capacidad de fijar la fibronectina. Para el estudio de la virulencia de esta cepa en comparación con la cepa original, se considera el inóculo utilizado como característica principal y esencial; un inóculo de 10³-10⁴ UFC de la cepa original era capaz de infectar los animales mientras que se necesita un inóculo mucho mayor de la cepa mutante para causar la misma proporción de infección.

En este trabajo, se consideraron ineficaces los inóculos inferiores o iguales a 5x10⁵ UFC, en los que no se observa bajada de la concentración de fibronectina en el plasma. Con inóculos más grandes, el porcentaje de adhesión aumenta y llega a un máximo. Un inóculo entre 10⁷ y 5x10⁷ UFC se consideró como inóculo óptimo en el que se observa un porcentaje alto de adhesión con un número razonable de bacterias, por lo que a lo largo del trabajo, se realizaron los experimentos con este inóculo. De otro lado, los efectos de antimicrobianos se observan mejor con este inóculo, mientras que con inóculos más grandes, el porcentaje de adhesión parecía inalterado, probablemente porque un número alto de bacterias en el medio bloquee las interacciones y esconde un gran número de receptores de fibronectina en *S.aureus*.

Utilizando inóculos bajos (< 5x10⁶ UFC) no se pudo demostrar la disminución de fibronectina, esto lleva a definir la técnica como poco sensible a estos inóculos.

En cuanto a las diferencias entre las tres cepas, el aislado clínico, el ATCC 25923 y el ATCC 29213 manifestaron porcentajes de adhesión comparables y altos, la cepa ATCC

29213 muestra porcentajes ligeramente más bajos, pero las diferencias no son significativas. En los trabajos de Proctor, se ha relacionado la capacidad de fijación de fibronectina con la infectividad de los aislados clínicos ensayados (37,41,43,44, 146-149).

En todos los trabajos "in vivo" como "in vitro", la magnitud de los inóculos bacterianos utilizados se puede considerar como diferente a la realidad cuando se compara con las bacteriemias observadas en la clínica (150-152). De todas maneras hay que tener en cuenta que el número de bacterias inyectado "in vivo" o incubado con plasma (en este estudio), no presenta el número de bacterias que termina circulando en la sangre y que el número de bacterias encontrado en el sitio infectado es mucho menor que el inyectado y esto es debido a un fenómeno pasivo de hemodilución y otro fenómeno activo por parte del Sistema Reticulo Endotelial (SRE).

2.3.2. TEMPERATURA

La temperatura es una de las constantes más importantes del organismo humano, su valor normal tiene una media constante de 37°C.

Una de las características de la inflamación es la elevación de temperatura en el foco inflamatorio y entre las manifestaciones de la sepsis es la fiebre que acompaña la mayoría de los casos (a veces y con menor frecuencia (94, 150,151), una hipotermia puede acompañar esta enfermedad).

La importancia de este factor como indicador del estado general del paciente en invasiones bacterianas nos llevó a estudiar los efectos que producen los cambios de temperatura en las interacciones fibronectina-*S.aureus* con distintos inóculos.

Con 10^7 UFC y con 10^8 UFC, la evolución del porcentaje de adhesión según la temperatura tiene un aspecto similar. En cuanto a las tres cepas ensayadas, las diferencias no son significativas ($p > 0.91$) aunque en general el aislado clínico parece manifestar ligeramente más adhesión.

A 37°C se observa un máximo de adhesión con los dos inóculos. Con 26 y 42°C, las interacciones de la fibronectina con las bacterias se encuentran afectadas y los porcentajes de adhesión son más bajos. A 4°C la adhesión no es significativa.

Al extrapolar estos datos, cabe esperar mejor interacciones entre la fibronectina y

S.aureus a temperaturas normales del organismo, lo que puede explicar la colonización frecuente de tejidos sanos. En este sentido la temperatura es un factor importante que afecta el comportamiento de la fibronectina como factor de patogenicidad.

De otro lado, se sabe que la fibronectina soluble juega un papel importante en la fagocitosis de *S.aureus*. muchos trabajos estudian el papel de esta glicoproteína como opsonina no específica (142,153-162). En este caso, un aumento de la temperatura puede conllevar un descenso de las interacciones fibronectina-bacterias y a continuación una disminución de adhesión a la fibronectina plasmática y por tanto una reducción de la fagocitosis.

2.3.3. FASE DE CRECIMIENTO

Los resultados muestran que las bacterias en fase logarítmica de crecimiento fijan más fibronectina que aquellas en fase estacionaria o de declinación. Después de cuatro horas de incubación, las bacterias están en plena actividad reproductiva y presentan el máximo de adhesión, valor a partir del cual dicha adhesión va bajando para llegar a un estado estable y prácticamente invariable entre las horas 9 y 24, lo que corresponde a la fase estacionaria. A continuación la adhesión desciende y llega a un mínimo a las 125 horas. Este mínimo es solamente de 3.03% más bajo que aquel observado a las 24 horas.

Los trabajos de Doran y Rissing demuestran que bacterias en fase logarítmica de crecimiento fijan más fibronectina purificada por la razón que expresan más receptores (42-44) lo que habla a favor de un mecanismo activo.

2.3.4. TIEMPO DE INCUBACION

Un aspecto muy importante de la virulencia de una cepa bacteriana es su capacidad de escaparse o defenderse frente a las defensas del huésped. Para que las bacterias sean capaces de infectar un tejido, el primer paso que se tiene que asegurar es la adherencia a este tejido. En la fisiopatología de la endocarditis infecciosa, las bacterias circulando no llegan a infectar las valvulas cardíacas si no logran sobrevivir en la corriente sanguínea el tiempo necesario para adherirse a las células del endocardio.

Durante su estancia en la sangre, *S.aureus* está en contacto directo con la fibronectina plasmática y celular, la influencia del tiempo de incubación de las bacterias con la

fibronectina fijada en biomateriales ha sido estudiada por muchos autores. El depósito de fibronectina en las superficies de catéteres ocurre poco tiempo después de la inserción del biomaterial y las bacterias se adhieren a la fibronectina depositada de un manera tiempo-dependiente (186-188).

En el presente trabajo los resultados muestran que el inóculo utilizado es un factor importante junto al tiempo de incubación.

Las interacciones empiezan rápidamente y cinco minutos después de la incubación, con inóculo de 10^8 UFC, se observa la adhesión antes que con 10^7 UFC. En general las diferencias entre las tres cepas no eran significativas (ver resultados).

Aunque con valores distintos, las gráficas obtenidas con los dos inóculos tienen el mismo aspecto: es una adhesión rápida y lineal que empieza 5 minutos después de la incubación, al llegar a 60 minutos, la adhesión se mantiene prácticamente igual (con 120 y 180 min, la adhesión es sólo ligeramente superior).

La curva de la adhesión según el tiempo de incubación guarda relación con el inóculo utilizado, por tanto, sería importante en un futuro desarrollar una técnica que permita el uso de inóculos más pequeños que pueden reproducir mejor las condiciones "in vivo".

2.4. EFECTOS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES FIBRONECTINA LIBRE-*S.aureus*

La adherencia de microorganismos a células y tejidos humanos ha ganado mucha importancia siendo una etapa importante e inicial en la patogenia de la infección bacteriana. Dicha adherencia origina una colonización que puede conllevar una invasión y a continuación una inflamación. La adherencia de los microorganismos es esencial por lo menos por tres razones (163,170):

- 1- Resistir a la acción de las secreciones como las lágrimas, la saliva, la orina, etc.
- 2- Facilitar la unión bacteriana a los tejidos diana que se encuentren lejos de la puerta de entrada.
- 3- Liberar sus toxinas en mayor concentración.

La selectividad de la unión de las bacterias a las superficies de células epiteliales sugiere la existencia de moléculas en la superficie bacteriana (adhesinas) que interactúan con

moléculas complementarias (receptores) en la superficie de células epiteliales del huésped (164-170). La capacidad de los microorganismos de adherirse a células epiteliales depende no solamente de su capacidad de sintetizar las adhesinas pero también de su capacidad de expresarlas en una configuración accesible en la superficie bacteriana. La fibronectina presente en la superficie de células epiteliales o en la ME está directamente involucrada en la adherencia bacteriana sirviendo como receptor por los microorganismos y por tanto contribuyendo a la patogenicidad.

En el desarrollo de una endocarditis infecciosa, la fibronectina interviene en la formación del NBTV debido de un lado a su presencia en en el epitelio herido y a su adhesión al coágulo de fibrina, al colágeno y a las plaquetas, y de otro lado a su capacidad de adherirse a muchas células y microorganismos a la vez (75,79-82).

Las bacterias adheridas se han identificado en huesos comprometidos (173,176,181), en prótesis (177-179), biomateriales infectados (180-184) y en tejidos adyacentes (171-173). Estas infecciones suelen resistir al tratamiento antimicrobiano y persiste hasta que el biomaterial o el tejido infectado se retire (73,175,176,185). Gristina et al. presenta datos que muestran que que las bacterias buscan fragmentos de tejidos muertos y huesos que constituyen sustratos susceptibles por la colonización (175,176). Estos fragmentos, al no ser protegidos por membranas normales, sino que llevan glicoproteínas en su superficie, ya no son viables y no se pueden defender.

Del mismo modo, las infecciones relacionadas con catéteres intravenosos, intra-arteriales e intraperitoneales son infecciones hospitalarias importantes. Muchos estudios presentan datos estadísticos sobre estas infecciones (193-199). La mortalidad atribuible a septicemias asociadas a la infección de catéteres intravasculares es aproximadamente del 14 al 28% (193). La sepsis debida al uso de catéteres ha sido una causa importante de morbilidad por pacientes cateterizados. Dichas infecciones se deben frecuentemente a estafilococos (198-203) y presentan un riesgo significativo en los pacientes bajo terapia intravenosa.

Las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos inducen varios cambios en las capacidades bacterianas "in vivo" como "in vitro", incluyendo cambios morfológicos y ultraestructurales e inhibición o estimulación de la producción de enzimas y toxinas (96-98,126). El estudio de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre las interacciones de las bacterias con sus receptores en células del huésped es importante por muchas razones:

1- Durante la antibioterapia, concentraciones subinhibitorias de algunos antimicrobianos alcanzan las superficies de células epiteliales y llegan a interferir con la capacidad del microorganismo de colonizar las células del tejido.

2- El uso de antimicrobianos que alteran la producción y/o la exposición de sustancias bacterianas importantes en la adherencia ayudan al estudio de estos factores y de su papel en la virulencia.

3- Durante una quimioterapia profiláctica, la elección del antimicrobiano es importante debido a las interacciones que pueden tener lugar entre bacterias y receptores en presencia del antimicrobiano.

Los resultados de Doran y Rissing (127) y Proctor (128) muestran que concentraciones subinhibitorias de clindamicina y otros antimicrobianos que interfieren con la síntesis protéica inhiben las interacciones de la fibronectina con *S.aureus*. En este trabajo, azitromicina, norfloxacino, ciprofloxacino, clindamicina y tetraciclina inhiben la fijación de fibronectina por *S.aureus*. Esta inhibición podría explicarse por los mecanismos de acción de estos antimicrobianos; azitromicina es un macrólido (azálida) que inhibe la síntesis de polipéptidos bacterianos por unión a la subunidad 50S del ribosoma impidiendo la translocación de los péptidos. Norfloxacino y ciprofloxacino interfieren con la topoisomerasa II impidiendo la reparación del corte de la banda del DNA y a continuación el superenrollamiento. Tetraciclina inhibe la síntesis protéica impidiendo la acilación de aminoácidos a medida que entran en el ribosoma bacteriano, y clindamicina interfiere con la elongación de la cadena peptídica en el ribosoma. A concentraciones subinhibitorias sus efectos se manifiestan en la desaparición de muchas proteínas de la superficie bacteriana debido a falta de producción o de exposición.

En cambio, la kanamicina aumentó muy ligeramente o no afectó la adhesión de *S.aureus* a la fibronectina soluble, mientras que se esperaba una inhibición de esta adhesión debido a que es un aminoglicósido que induce efectos pleiotrópicos en la célula bacteriana, inhibición de la iniciación de replicación del DNA y inhibición de la función ribosómica por unión a uno/o más lugares del ribosoma bacteriano lo que produce una inhibición de la síntesis protéica o una producción de proteínas extrañas al producir errores a la hora de la lectura del ARNm.

Estos datos sugieren que la kanamicina que tiene mecanismos de acción además de la inhibición de la síntesis protéica y cuya entrada intracelular es condicionada por diferencia

de carga eléctrica no afecta dichas interacciones y esto independientemente de la inhibición de la función ribosómica. Un trabajo demuestra que los aminoglicósidos a concentraciones subinhibitorias aumentan la adhesión de *S. aureus* a células HeLa (129), también muestra que la astromicina aumenta la adhesión estafilocócica a la fibronectina insoluble y a la laminina aunque menos que la benzilpenicilina. De otro lado, las fuerzas fisicoquímicas como la interacción hidrofóbica y la interacción electrostática pueden tener algún papel en los efectos que produce la kanamicina.

Ampicilina, sultamicilina y cefotaxima, antimicrobianos con mecanismos de acción similares que bloquean la síntesis del peptidoglicano ejerciendo su acción en las PBPs, aumentaron significativamente la adhesión de fibronectina a *S. aureus*. Esto puede ser debido al mecanismo de acción que a concentraciones subinhibitorias según algunos autores, produce huecos en la pared bacteriana interfiriendo con la transpeptidación de forma a esconder algunos componentes de la pared y exponer otros como puede ser el caso de la fibronectina, o bien pueden facilitar la liberación de estos receptores, estos resultados concuerdan con, los de Proctor (128).

La teicoplanina no afectó las interacciones fibronectina-*S. aureus* como se esperaba de un antimicrobiano que actúa sobre la síntesis del peptidoglicano, esto puede ser debido a que la teicoplanina tiene mecanismo de acción distinto al de los betalactámicos: impide la polimerización del complejo lípido-fosfosacárido-pentapéptido en la segunda fase de formación de la síntesis de la pared y también altera la permeabilidad de la membrana e impide selectivamente la síntesis del ácido ribonucleico como puede ser debido a otros factores que determinan el efecto del antimicrobiano sobre la producción de proteínas de la pared.

2.5. EFECTOS DE CSI DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA PRODUCCION DE COAGULASA Y "CF" POR *S. aureus*

La contribución de la coagulasa a la virulencia de *S. aureus* es un tema controvertido visto que algunos estudios (205-207) demuestran la intervección de la coagulasa en la producción de endocarditis infecciosa, mientras que según otros autores (134,135), la mutación de la coagulasa no afecta la virulencia de la cepa.

En los trabajos de Roland y Heelen (210) como en aquellos de Peros et al. (209), se estudió la capacidad de los antimicrobianos de inhibir a concentraciones subinhibitorias la

adherencia bacteriana a células y al mismo tiempo la producción de factores de virulencia como la hemaglutinación. Se ha observado que algunos antimicrobianos son capaces de inhibir ambos fenómenos y otros no. La tetraciclina inhibió la hemaglutinación pero no tenía ningún efecto sobre la adherencia de microorganismos a hidroxiapatita pretratada con saliva. También la producción de enterotoxinas resistentes y sensibles a la temperatura en *E. coli* ha sido estudiado por Gaastra et al (211). De todas maneras, los datos son a veces conflictivos y dependen de muchos factores entre ellos si la proteína es codificada por un plásmido o por el cromosoma, pero en cualquier caso, el efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la producción simultánea de toxinas y de adhesinas no ha sido bastante estudiado, sólo algunos trabajos tratan el tema (209-211).

En el presente trabajo, los antimicrobianos, en cuanto a su acción sobre la producción del Clumping Factor y de la coagulasa, se clasifican en dos tipos:

1- Azitromicina, norfloxacino, ciprofloxacino, tetraciclina, kanamicina y clindamicina que inhiben la capacidad de *S. aureus* de coagular el plasma dando resultados negativos de los tests de la coagulasa y del "Clumping Factor".

2- Ampicilina, sultalicilina, teicoplanina y cefotaxima que todos aumentan dicha capacidad.

Cuando se comparan los dos factores: la producción de coagulasas y la adhesión a la fibronectina se observa que la inhibición de uno va acompañada de la inhibición del otro, excepto en los dos casos de kanamicina donde se ve una inhibición de coagulación mientras que el porcentaje de adhesión a la fibronectina no se encuentra afectado, y el caso de la teicoplanina donde el aumento de la coagulación del plasma no se acompaña de un aumento de fijación de fibronectina cuyo porcentaje de adhesión parece ser invariable. El tratamiento con concentraciones subinhibitorias de azitromicina, norfloxacino, ciprofloxacino, tetraciclina y clindamicina, disminuye la adhesión a la fibronectina y la coagulación del fibrinógeno mientras que el tratamiento con ampicilina, sultamicilina y cefotaxima aumentan ambos.

2.6. EFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS SOBRE EL NIVEL DE FIBRONECTINA EN EL PLASMA.

Se piensa que la fibronectina soluble interacciona con el sistema mononucleares-fagocitos (142,153-159), media en la adsorción de sustancias como colágeno desnaturalizado (153-157), y se fija al componente C1q del Complemento (158-162). También se ha estudiado la función de la fibronectina libre en el proceso de fagocitosis de *S.aureus* y se considera involucrada en todo el proceso desde la quimotaxis hasta la digestión de las bacterias (142).

Se observa una disminución de niveles plasmáticos de fibronectina en los estados fisiopatológicos caracterizados por aumento de la actividad opsónica (46). Dichos niveles disminuyen significativamente en pacientes sépticos, la recuperación de concentraciones normales se produce días después de la desaparición de síntomas clínicos (46). Algunos autores describen la reducción de la concentración plasmática de la fibronectina como marcador de sepsis (140,141,204). En algunos trabajos se muestra que la recuperación de los niveles normales de fibronectina tras inyección de la proteína conlleva una mejoría del estado del enfermo (140,141).

A concentraciones subinhibitorias, azitromicina, norfloxacino, ciprofloxacino, tetraciclina y clindamicina reducen las interacciones fibronectina-*S.aureus* (que pueden ser útiles para la fagocitosis opsónica de esta bacteria y al mismo tiempo reestablece un nivel normal de la fibronectina en el plasma). Mientras que concentraciones subinhibitorias de ampicilina, sulfamicilina y cefotaxima favorecen y aumentan la adhesión creando un gran descenso de la concentración plasmática de fibronectina. En cambio, la teicoplanina y la kanamicina no influyen.

Estos resultados pueden ser importantes en cuanto al papel opsónico que juega la fibronectina. Se ha demostrado que concentraciones subinhibitorias de clindamicina inhiben las interacciones fibronectina-*S.aureus* y al mismo tiempo disminuyen la fagocitosis (127).

2.7. FIBRONECTINA-COAGULOS DE FIBRINA

2.7.1. Fibronectina y adherencia de *S.aureus* a Coágulos de fibrina.

Los estafilococos son patógenos capaces de causar muchas infecciones nosocomiales asociadas a complicaciones postoperatorias y al uso de catéteres intravenosos y biomateriales (93,94). El inicio de dichas infecciones es debido a la previa adherencia específica de los microorganismos a la fibrina y al biomaterial en contacto con la sangre. Un gran número de proteínas plasmáticas adhesivas como la fibronectina, el fibrinógeno y la vitronectina presentes en la mayoría de las superficies celulares parecen ser factores importantes en la adherencia de cocos gram-positivos (186,187,189). Los coágulos de fibrina que se forman en los sitios heridos contienen una gran cantidad de estas proteínas y en la mayoría de los casos se forma una película de fibrina que lleva fibronectina incluida en la superficie del biomaterial insertado (185-190).

Los estafilococos, predominantemente estafilococos coagulasa negativo, y *S.aureus*, son los agentes infecciosos más importantes en infecciones a partir de catéteres intravasculares, infecciones asociadas a diálisis peritoneales y con dispositivos del líquido cerebro-espinal (71,72). Otros microorganismos involucrados en las complicaciones infecciosas de catéteres son también *Enterococcus faecalis* y *Candida (albicans, parapsilosis)* (72). Aunque con carácter epidémico se han descrito brotes con enterobacterias del tipo *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.* y también con los más diversos microorganismos incluyendo *Malassezia furfur*, las bacterias gram positivas, especialmente *S.epidermidis* y *S.aureus*, siguen siendo los microorganismos más frecuentemente aislados en dichas infecciones (208).

Muchos factores pueden explicar la frecuente colonización de los dispositivos intravenosos por el género *Staphylococcus* entre ellos la presencia de una herida transcutánea que permite a los microorganismos presentes en la piel migrar a través de la barrera dérmica, la producción por parte de las bacterias de sustancias exopoliméricas mucoides favoreciendo la adhesividad de los microorganismos y la presencia de proteínas plasmáticas adsorbidas a los dispositivos intravenosos capaces de favorecer selectivamente la adherencia estafilocócica a estas superficies.

En cuanto a las vías de contaminación de catéteres, las más importantes incluyen los desinfectantes contaminados, la microflora de la piel, el material contaminado, el equipo de

cateterización y la autoinfección (194-197).

Después de la colocación de un cateter en el espacio intravascular se produce una vaina de fibrina en la superficie de la parte en contacto con la sangre y puede ser posteriormente colonizada por los diferentes microorganismos dentro de un entorno protector donde las bacterias pueden multiplicarse y escaparse de las defensas del huésped (72). Muchos estudios "in vitro" han mostrado que la adherencia de *S.aureus* a superficies poliméricas está aumentada por la presencia selectiva de proteínas plasmáticas o de la matriz extracelular como el fibrinógeno (130,131,187,205,212), la fibronectina (131,187,205), la laminina (131,187), el colágeno (187,232), la vitronectina y la trombospondina (133).

La utilidad clínica de estas observaciones ha sido reflejada por estudios clínicos que demuestran la contribución "in vivo" de la fibronectina y del fibrinógeno a la adherencia de *S.aureus* a catéteres insertados en pacientes hospitalizados (185). Sin embargo, se piensa que estos dos factores son los más importantes dentro de las proteínas plasmáticas en cuanto a la mediación de la adherencia bacteriana a dispositivos intravasculares.

De otro lado la fibronectina y el fibrinógeno se depositan en el espacio extravascular durante los dos primeros días después de una herida de la piel; la fibronectina se encuentra dentro como en la superficie de los coágulos de fibrina formados. Como la fibronectina es una proteína que fija específicamente *S.aureus*, puede servir como puente entre esta bacteria y el tejido herido del huésped. Se ha pensado que la fibronectina presente en los coágulos juega un papel positivo midiendo la adherencia de células vitales para el proceso de curación de las heridas, pero al mismo tiempo puede mediar la adherencia de patógenos como es el caso de *S.aureus* y asegurando a continuación una colonización del tejido.

Resultados conflictivos han sido dados respecto a la función de la fibronectina en la adherencia bacteriana a superficies y coágulos de fibrina (79-82).

Un estudio hecho por Mertz et al.(134) indica que la adherencia de *S.aureus* a heridas en animales de laboratorio no se relaciona con la presencia de fibronectina. De otro lado Toy et al.(79) describe un papel que desempeña la fibronectina en la adherencia de *S.aureus* a coágulos de fibrina. Estos resultados conflictivos pueden ser debidos al uso de métodos distintos que dan resultados distintos en cuanto al número de bacterias adheridas.

El método descrito en este trabajo es sencillo, rápido y permite la cuantificación de las bacterias adheridas. Utilizando los antimicrobianos, se han descrito modificaciones de la

adherencia de *S.aureus* a los coágulos de fibrina, esto refleja las alteraciones que ocurren en los receptores de la fibronectina en las bacterias cuando se tratan con concentraciones subinhibitorias.

Nuestros resultados muestran que la fibronectina incorporada en el coágulo favorece la adhesión de las tres cepas ensayadas de *S.aureus*. Cuando se forma el coágulo a partir de un plasma sin fibronectina, la adherencia disminuye en todos los casos. En el estudio de Toy et al., se eliminó la fibronectina del plasma mediante cromatografía. En este proceso, la fibronectina es la mayor proteína plasmática eliminada debido a su afinidad por la gelatina. En nuestro trabajo, se utilizaron anticuerpos frente a la fibronectina y se formaron inmunocomplejos específicos; el fibrinógeno y las otras proteínas plasmáticas no se afectaron. Esto sugiere que el descenso en la adhesión bacteriana a los coágulos es causado, exclusivamente, por la ausencia de la fibronectina. La especificidad del tratamiento del plasma con anticuerpos probablemente sea al origen de la diferencia en los porcentajes de adhesión de este trabajo y del de Toy et al.(79) en el que la cromatografía en gelatina puede causar un descenso, aunque pequeño, de otras proteínas plasmáticas importantes en la adhesión.

2.7.2. Efecto de la replecion y saturacion del Coágulo con fibronectina

El hecho de que la reconstitución del plasma con fibronectina a concentraciones normales incremente la adhesión y vuelva a ser comparable con el coágulo normal da más validez a la función de fibronectina como mediador de la adherencia estafilocócica.

Al saturar el plasma con fibronectina, no se observa aumento de adherencia; esto puede sugerir que la fibronectina plasmática a concentraciones normales es capaz de asegurar un máximo de adherencia que no se encuentra elevado con el aumento del nivel de fibronectina.

Chwatwal et al.(80) presenta datos que demuestran que la fibronectina no juega ningún papel en la adherencia de *Streptococcus pyogenes* a coágulos de fibrina y supone que los dominios responsables de dicha adhesión ya no están dispuestos para interactuar con las bacterias una vez la proteína se incluye en una fase sólida como la fibrina.

Nuestros resultados, al igual de los de Toy et al.(79), sugieren que las moléculas de

fibronectina incluyen uno de sus extremos NH₂ en la fibrina y deja el otro extremos NH₂ que presenta el dominio de adhesión a *S.aureus* libre de manera que pueda adherirse a las bacterias sin descartar la posibilidad de que la molécula de fibronectina pueda presentar otros dominios de adhesión a *S.aureus*.

2.7.3. Efectos de antimicrobianos sobre la adhesión De *S.aureus* a coágulos de fibrina

Al tratar las bacterias con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, la adherencia de *S.aureus* a coágulos de fibrina con o sin fibronectina se encontró significativamente afectada dependiendo del antimicrobiano.

Utilizando un coágulo con concentración normal de fibronectina, norfloxacinó disminuyó dicha adherencia mientras que azitromicina, ampicilina y sultamicilina la aumentaron. En cuanto a kanamicina, la adherencia estafilocócica no se afectó mientras que teicoplanina la aumentó ligeramente, tetraciclina dió lugar a un descenso significativo al número de bacterias adheridas. Utilizando un coágulo sin fibronectina, el efecto de los antimicrobianos fue idéntico al caso anterior pero con porcentajes de adhesión más bajos debido a que la fibronectina no está presente en el coágulo excepto el caso de teicoplanina donde se observa un descenso de adhesión al coágulo sin fibronectina. Los cambios en la adhesión debida a la fibronectina por acción de los antimicrobianos muestra que azitromicina, ampicilina, sultamicilina y teicoplanina aumentan esta adhesión, teraciclina y norfloxacinó la disminuyen mientras que kanamicina no la afecta.

Si se comparan los efectos de antimicrobianos en el caso de fibronectina incorporada en coágulos de fibrina con el caso de fibronectina plasmática libre, se observa que el comportamiento de algunos antimicrobianos es igual en los dos casos (ampicilina, sultamicilina, tetraciclina , norfloxacinó y kanamicina), mientras que otros tienen un efecto distinto como por ejemplo azitromicina que aumenta la adhesión estafilocócica al coágulo de fibrina y a la fibronectina incluida en este coágulo mientras que disminuye la interacción fibronectina libre-*S.aureus*, y teicoplanina que no afecta el porcentaje de adhesión a la fibronectina libre pero aumenta el porcentaje de adhesión debida a la fibronectina incluida en el coágulo.

La capacidad de la fibronectina incluida en coágulos de fibrina de mediar la adhesión

de *S. aureus* es un factor importante en la patogénesis infecciosa. Los coágulos de fibrina que contienen fibronectina se acumulan en los espacios extravasculares después de una lesión del tejido. Estos coágulos normalmente ofrecen una matriz provisional para la migración celular durante la reepitelialización de las lesiones y heridas. La fibronectina media la adherencia de importantes células como los fibroblastos, los monocitos y los queratinocitos.

La mayoría de las teorías relativas a la patogenicidad de la endocarditis infecciosa incluye el requerimiento de un trauma inicial del endotelio después del cual hay formación de la NBTV que sirve a su turno como base por la adherencia bacteriana.

La formación de este coágulo no bacteriano ha sido bastante estudiada y se puede resumir como siguiente:

Algunos daños del endotelio exponen el colágeno subendotelial y otros componentes de la matriz extra-celular. Las plaquetas circulantes se depositan en estas zonas ulceradas y en el colágeno ya expuesto. La fibrina adhiere a las plaquetas y las células epiteliales al nivel de las lesiones y algunas células inflamatorias contribuyen al crecimiento del coágulo no bacteriano produciendo la tromboplastina tisular, ocurre entonces una formación de películas de fibrina y plaquetas. Las bacterias circulando adhieren a las superficies del coágulo no bacteriano y cuando se cura el NBTV, ocurre una endotelización de la superficie, se ve una fagocitosis de detritus bacterianos y resulta una organización mediante los fibroblastos; ocasionalmente, bacterias se pueden incluir en las superficies celulares (82,83).

La capacidad de los antimicrobianos de interferir con la adherencia de *S. aureus* a coágulos de fibrina con/sin fibronectina es una observación importante visto que puede interferir con la adherencia de esta bacteria a NBTV y a coágulos de fibrina que se forman en sitios lesionados.

3. POSIBLE APLICACION CLINICA

La fibronectina se encuentra en altas concentraciones en el epitelio dañado, adhiere al colágeno y a la fibrina y constituye 4.4% de la masa del coágulo de fibrina. Se ha demostrado su presencia en el trombo no bacteriano formado durante una endocarditis infecciosa. Esta proteína tiene dominios funcionales que aseguran su adhesión a muchos microorganismos. En *S.aureus*, el número de receptores correlaciona con la virulencia de la cepa. La fibronectina interviene en la adhesión de *S.aureus* a células epiteliales y fibroblastos y su presencia en el coágulo de fibrina aumenta la adhesión de *S.aureus* a este coágulo.

De otro lado, el depósito de fibronectina en la superficie de catéteres y dispositivos intravasculares es un factor importante en la colonización del biomaterial. Muchos autores muestran la importancia de su papel en relación con el desarrollo de sepsis a partir de catéteres (185-190, 200-211). Vaudaux et.al. la describe como factor más importante que el fibrinógeno en este sentido. Estos datos, al igual que los ofrecidos en el presente trabajo, muestran que la fibronectina se comporta como factor de patogenicidad, la presencia de esta proteína contribuye al establecimiento de una colonización y al desarrollo de una infección. En nuestro laboratorio, se estudia el efecto de la fibronectina en la adhesión bacteriana a distintos tipos de biomateriales, como se estudia el comportamiento de esta proteína como marcador pronóstico de sepsis; la presencia de fibronectina aumenta significativamente la adhesión de *S.aureus* a los distintos tipos de catéteres estudiados, y las concentraciones de fibronectina en enfermos sépticos se encuentran bajas y aumentan con la recuperación del enfermo.

Las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos son capaces de producir alteraciones en las propiedades superficiales de muchas bacterias, estas propiedades han sido utilizadas por varios investigadores con el objeto de interferir con la adherencia de algunas bacterias patógenas urinarias e intestinales. Utilizando modelos experimentales, muchos investigadores demostraron la eficacia de estas concentraciones de antimicrobianos bacteriostáticos y bactericidas en la prevención de infecciones.

Nuestros resultados junto a otros datos y observaciones de otros autores pueden tener una importancia clínica puesto que concentraciones subinhibitorias de algunos antimicrobianos aumentan "in vitro" la adhesión de *S.aureus* a la fibronectina (como en el caso de ampicilina, sultamicilina y cefotaxima), otros (como las quinolonas y clindamicina) disminuyen esta adhesión, mientras que kanamicina no la afecta. Los beta-lactámicos son los antimicrobianos más utilizados en profilaxis y tratamiento de endocarditis visto la etiología

microbiana de la enfermedad y las propiedades farmacocinéticas y microbiológicas de este grupo. Sin embargo, las interacciones de la fibronectina con las bacterias no son los únicos determinantes de la colonización, por consiguiente, el efecto de antimicrobianos no se limita al efecto producido sobre estas interacciones, pero al mismo tiempo sería interesante e importante a la vez tener en cuenta la influencia que se produce sobre las interacciones ya mencionadas a concentraciones subinhibitorias, dado que los niveles del antimicrobiano en el cuerpo coinciden en un momento dado con éstas. Nuestro trabajo extiende los conocimientos sobre las interacciones de la fibronectina, proteína de mayor importancia en la adhesión de cocos gram-positivos a las células epiteliales y cuya presencia adsorbida en la superficie de los catéteres y biomateriales aumenta significativamente la adhesión bacteriana, con *S.aureus*, patógeno frecuentemente aislado en infecciones graves y en sepsis a partir de catéteres intravasculares.

"Efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre las interacciones fibronectina-Staphylococcus aureus"

VI. CONCLUSIONES

1- "In vitro", la presencia de *S.aureus* en plasma produce un descenso de la concentración de fibronectina plasmática. Hemos comprobado que este descenso se debe a las interacciones específicas fibronectina-*S.aureus* y a una pequeña incorporación de la proteína en el coágulo de fibrina formado.

2- Las interacciones de la fibronectina con *S.aureus* son temperatura-dependientes. Demostramos que la máxima adhesión se observa a 37° C.

3- Nuestros resultados muestran que el inóculo bacteriano es un factor importante en la adhesión de fibronectina plasmática a *S.aureus*, puesto que esta adhesión aumentó proporcionalmente al inóculo utilizado. Se consideró como óptima la adhesión observada con 10⁷ UFC y como máxima aquella observada con 10⁸ UFC.

4- Como se demuestra, la fijación de fibronectina soluble por *S.aureus* es un proceso tiempo-dependiente durante las primeras sesenta minutos. A partir de este tiempo la adhesión se mantiene prácticamente igual.

5- Hemos comprobado que las bacterias en fase logarítmica de crecimiento manifiestan mayor adhesión a la fibronectina plasmática en comparación con las bacterias en fase estacionaria y de declinación lo que habla a favor de un mecanismo activo.

6- La adhesión de *S.aureus* a coágulos de fibrina es dependiente de la concentración de fibronectina en el coágulo; La ausencia de esta proteína causa un descenso significativo en los porcentajes de adhesión.

7- Se ha demostrado en este trabajo que concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos afectan las interacciones de la fibronectina con *S.aureus*. De forma constante, algunos, como los betalactámicos aumentan dichas interacciones, otros como las quinolonas las disminuyen, y otros como la teicoplanina no las afectan. Esto conlleva un cambio de las concentraciones de la fibronectina en el plasma.

8- Hemos comprobado que la adhesión de *S.aureus* a coágulos de fibrina con y sin fibronectina se encuentra afectada por concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, de hecho, la adhesión debida a la fibronectina a estos coágulos se encuentra afectada; sin embargo, los resultados no siempre coinciden con los ofrecidos en la conclusión anterior.

9- El efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre las interacciones fibronectina-*S. aureus* y las interacciones fibrinógeno-*S. aureus* tanto cuantitativas como cualitativas dependen del antimicrobiano utilizado lo que se puede interpretar en función de mecanismos específicos.

"Efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre las interacciones fibronectina-Staphylococcus aureus"

VII. BIBLIOGRAFIA

1. **Morrison PR, Edsall JT, Miller SG.** Preparation and properties of serum and plasma proteins XVII. The separation of purified fibrinogen from fractio I of human plasma. *J Am Chem Soc* 1948; 70: 3103.
2. **Chamberg CG, Hakomori S.** Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in external leveled glycoprotein and glycolipid. *Proc Nat Acad Sci* 1973; 70: 3329.
3. **Wolff I, Timpl R, Pecker I, Steffen C.** A two-component system of human serum agglutinating gelatin-coated erythrocytes. *Vox Sanguinis* 1967; 12: 443.
4. **Blumenstock F, Weber P, Saba TM.** Isolation and biochemical characterization of alpha-2-opsonic glucoprotein from serum. *J Biol Chem* 1977; 252: 7156.
5. **Gahmberg CG, Hakomori S-I.** Altered growth behavior of malignant cells associated with changed in externally labeled glycoproteins and glycolipid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 3329-33.
6. **Hynes RO.** Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proc Natl Acad USA* 1973; 70: 3170-4.
7. **Ruoslahti E, Vaheri A, Kuusela P, Linder E.** Fibroblast surface antigen: a new serum protein. *Biochim Biophys Acta* 1973; 322: 352-8.
8. **Keski-Ojal J.** Polimerization of a major surface-associated glycoprotein, fibronectin in cultured fibroblast. *Febs Letters* 1976; 71: 325.
9. **Keski-Ojal J, Mosher DF, Vaheri A.** Cross-linking of a major fibroblast surface associated glycoprotein (fibronectin) catalysed by blood coagulation factor XIII. *Cell* 1976; 9: 29-35.
10. **Mosher DF.** Physiology of fibronectin. *Annu Rev Med* 1984; 35: 561-75.
11. **Hynes R.** Molecular biology of fibronectin. *Annual Review Cell of Biology* 1985; 1: 67-90.
12. **Vartio T.** Disulfide bonded polymerization of plasma fibronectin in the presence of metal ions. *J Biol Chem* 1986; 261: 9433-7.
13. **Kornblihtt AR, Vibe-Pederson K, Baralle FE.** Human fibronectin: molecular clonong evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structure domain. *EMBO J* 1984; 3: 221-6.
14. **Vibe-Pederson K, Kornblihtt AR, Baralle FE.** Expression of a human alpha-globulin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing. *EMBO J* 1984; 3: 2511-6.
15. **Hynes R.** Molecular biology of fibronectin. *Ann Rev Cell Biol* 1985; 1: 67-90.
16. **Ingham KC, Landwehr R, Engel J.** Interaction of fibronectin with C1q and collagen: effect of ion strength and denaturation of the collagenous component. *Eur J Bio-chem* 1985; 148: 219-24.

17. **Mc Keown-Longo P.** Fibronectin-cell surface interactions. *Rev Infect Dis* 1987; 9 (Suppl 4): S322-34.
18. **Mosher DF.** Cross-linking of cold insoluble globulin by fibrin stabilizing factor. *J Biol Chem* 1975; 250: 6614-21.
19. **Cooper HA, Wagner RH, Mosesson MW.** The cold insoluble globulin of plasma and its relationship to factor VIII. *J Lab Clin Med* 1974; 84: 258-63.
20. **Engvail E, Ruoslahti E.** Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer* 1977; 20: 1-5.
21. **Molnar J, Gelder FB, Lai MZ, Siefiring GE, Credo RB and Lorand L.** Purification of opsonically active human and rat cold insoluble globulin (plasma fibronectin). *Biochemistry* 1979; 18: 3909-16.
22. **Stathakis NE, Mosesson MW, Chen AB, Galanakis DK.** Cryoprecipitation of fibrin-fibrinogen complexes induced by the cold insoluble globulin of plasma. *Blood* 1978; 51: 1211-2.
23. **Simpson WA, Courtney HS, Ofek I.** Interaction of fibronectin with streptococci: the role of fibronectin as a receptor of *Streptococcus pyogenes*. *Rev Infect Dis* 1987; 9(Suppl 4): S351-9.
24. **Cohen MS, Black JR, Proctr RA, Spartling PF.** Host defenses and the vaginal mucosa: a re-evaluation. *Scand J Urol Nephrol[Suppl]* 1984; 86: 13-22.
25. **Gonzales-Calvin J, Scully MF, Sanger Y, Fok J, Kakkar VV, Hughes RD, Gimson AES, William R.** Fibronectin in fulminant hepatic failure. *Br Med J* 1982; 285: 1231-2.
26. **Mosher DF, William EM.** Fibronectin concentration is decreasee in plasma of severely ill patients with disseminated intravascular coagulation. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 729-35.
27. **Scott DL, Wainwright AC, Walton WK, Williamson N.** Significance of fibronectin in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1981; 40: 142.
28. **Mosher DF.** Fibronectin. *Prog Hemost Thromb* 1980; 5: 111-51.
29. **Akiyama SK, Yamada RM, Hayashi M.** The structure of fibronectin and its role in celular adhesion. *Journal of Supramolecular Structure and Celular Biochemistry.* 1981; 16: 345-58.
30. **Grinnel F.** Fibronectin and wound healing. *J Cell Biol* 1984; 26: 107-16.
31. **Godfrey HP, Purohit A.** Reversible binding of a guinea pig lymphokine to gelatin and fibrinogen: possible relationship of macrophage agglutination factor and fibronectin. *Immunology* 1982; 46: 515-26.
32. **Bevilacqua MP, Amrani D, Mosesson MW, Bianco C.** Receptors fpr cold insoluble

- globulin (plasma fibronectin) on human monocytes. *J Exp Med* 1981; 153: 42-60.
33. **Marino JA, Pensky J, Culp LA, Spagnuolo PJ.** Fibronectin mediates chemotactic facto-stimulated neutrophil substrate adhesion. *J Lab Clin Med* 1985; 105: 725-30.
 34. **Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E.** Identification and isolation of a 140-kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 1985; 40: 191-8.
 35. **McKeown-Longo PJ, Mpsher DF.** Interactions of the 70,000-mol-wi amino terminal fragment of fibronectin with the matrix assembly receptor of fibroblasts. *J Cell Biol* 1985; 100: 364-74.
 36. **McDonald JA, Kelly DG, Broekelmann TJ.** Role of fibronectin in collagen deposition: Fab to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracelular matrix. *J Cell Biol* 1982; 92: 485-92.
 37. **Proctor RA.** The staphylococcal fibronectin receptor: Evidence for its inportance in invasive infections. *Rev Infect Dis* 1987; 9: (SUPPL 4) S335-40.
 38. **Aly R, Levit S.** Adherence of *S.aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teicoic acid. *Rev Infect Dis* 1987; 9: (SUPPL 4) S341-50.
 39. **Kuusela P.** Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature* 1978; 276: 718-20.
 40. **Proctor RA, Mosher DF, Olbrantz PJ.** Fibronectin binding to *S.aureus*. *J Biol Chem* 1982; 257: 14788-94.
 41. **Proctor RA, Christman G, Mosher DF.** Fibronectin-induced agglutination of *S.aureus* correlates with invasiveness. *J Lab Clin Med* 1984; 104: 455-69.
 42. **Espersen F, Clemmensen I.** Clumping of *S.aureus* by human fibronectin. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1981; 89: 317-21.
 43. **Maxe I, Rydén C, Wadström T, Rubin K.** Specific attachment of *S aureus* to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 1986; 54: 695-704.
 44. **Imai S, Okahashi N, Koga T, Nisizawa T, Hamada S.** Ability of various oral bacteria to bind human plasma fibronectin. *Microbiol Immunol* 1984; 149: 49-102.
 45. **Vann JM, Proctor RA, Mosher DF.** Morphological studies of fibronectin binding to *S.aureus*. In: Program and Abstract of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1984.
 46. **Grossman JE.** Plasma fibronectin and fibronectin therapy in sepsis and critical illness. *Rev Infect Dis* 1987; 9(Suppl \$): S420-30.
 47. **Doran JE.** A critical assessment of fibronectin´s opsonic role for bacteria and microagregates. *Vox Sang* 1983; 45: 337-48.
 48. **Snyder EL, Luban NLC.** Fibronectin: application to clinical medicine. *CRC Crit Rev*

- Clin Lab Sci 1986; 23: 15-34.
49. **Kaplan JE.** Plasma fibronectin and resistance to thrombosis during sepsis. *Adv Shock Res* 1982; 7: 159-72.
 50. **Freedman LR.** The pathogenesis of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 1-6.
 51. **Bain RJI, Geddes AM, Littler WA, McKinlay AW.** The clinical and echocardiographic diagnosis of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 17-24.
 52. **Washington JA.** The microbiological diagnosis of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 29-36.
 53. **Stratton CW.** The role of microbiology laboratory in the treatment of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 41-50.
 54. **Glauser MP, Francioli P.** Relevance of animal models to the prophylaxis of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 87-94.
 55. **Oakley CM.** Controversies in the prophylaxis of infective endocarditis: a cardiological view. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 99-104.
 56. **McGowan DA.** A dental view of the controversies of prophylaxis of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 105-10.

 57. **Shulman ST.** Prevention of infective endocarditis: the view from the United States. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 111-8.
 58. **Shanson DC.** Antibiotic prophylaxis of infective endocarditis in the United Kingdom and Europe. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 119-32.
 59. **Flemming HA.** General principles of the treatment of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 143-6.
 60. **Eykyn SJ.** The treatment of staphylococcal endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 161-8.
 61. **Braimbridge MW, Eykyn SJ.** Prosthetic valve endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20(Suppl A): 173-80.
 62. **Bayer A.** Infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 313-20.
 63. **Bow EJ and Ronald AR.** Antibacterial chemoprophylaxis in neutropenic patients-Where do we go from here? *Clin Infect Dis* 1993; 17: 333-7.
 64. **Chambers HF, Kartalija M, Sande M.** Ampicillin, sulbactam and rifampin combination treatment of experimental methicillin-resistant *S.aureus* endocarditis in rabbits. *J Infect Dis* 1995; 171: 897-902.
 65. **Parras-Vázquez F.** Nuevos aspectos de la bacteriemia y la endocarditis por grampositivos. *Rev Clin Esp* 1994; 194: 821-8.

66. **Santapau JG, Berga AP.** Epidemiología y fisiopatología de la endocarditis infecciosa. *Jano* 1995; XLVIII: 358-62.
67. **Tornos-Mas MP, Almirante Gragera B.** Endocarditis infecciosa. Clínica, complicaciones y pronóstico. *Jano* 1995; XLVIII: 430-2.
68. **Almirante-Gragera B, Tornos Mas MP.** Endocarditis protésica. *Jano* 1995; XLVIII: 437-42.
69. **Pascuet Ribera E.** Endocarditis infecciosa en adictos a drogas por vía parenteral. *Jano* 1995; XLVIII: 443-8.
70. **Almirante Gragea B, Pahissa Berga A, Tornos Mas MP.** Tratamiento y profilaxis (de la EI). *Jano* 1995; XLVIII: 449-54.
71. **Donald, A.G. and Gerald, B.P.** Pathogenesis of infections related to intravenous catheters. *Clin Microb Rev* 1993; 6: 176-192.
72. **Vaudaux, P., François, P., Proctor, R., McDevitt, D., Fostu, T.J., Albrecht, R.M., Lew, D.P., Wabers, H., Cooper, S.L.** Use of adhesin-defective mutants of *S.aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Inf Imm* 1995; 63: 585-590.
73. **Vaudaux, P., Pittet, D., Haeberli, A., Lerch, P.G., Morgenthaler, J.J., Proctor, R.A., Waldvogel, F.A., Lew, D.P.** Fibronectin is more effective than fibrin or fibrinogen in promoting *S.aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J Infect Dis* 1993; 167: 633-641.
74. **Watanakunakorn C, Burket T.** Infective endocarditis at a large community teaching hospital, 1980-1990. A review of 210 episodes. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72: 90-102
75. **Hamill R.** Role of fibronectin in infective endocarditis. *Rev Infect Dis* 1987; 9(Suppl \$): S360-71.
76. **Mosher DF, Proctor RA.** Binding and factor XIIIa mediated cross-linking of a 27 kilodaltons fragment of fibronectin to *S.aureus* . *Science* 1980; 209: 927-9.
77. **Scheld WM, Valone JA, Sande MA.** Bacterial adherence in the pathogenicity of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets and fibrin. *J Clin Invest* 1978; 61: 1394-1404.
78. **Scheld WM, Strunk RW, Balian G, Calderone RA.** microbial adhesion to fibronectin in vitro correlates with production of endocarditis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985; 180: 474-82.
79. **Toy PTC, Lai LW, Drake TA, Sande MA.** Efect of fibronectin on adherence of *S.aureus* to fibrin thrombi in vitro. *Infect Immun* 1985; 48: 83-6.
80. **Chhwtwal GS, Valentin-Weigand P, Timmis KN.** Bacterial infection of wound: fibronectin-mediated adherence of group A and C streptococci to fibrin thrombi in

- vitro. *Infect Immun* 1990; 58: 3015-9.
81. **Vaudaux PE, Waldvogel FA, Morgenthaller JJ and Nydegger UE.** Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *S.aureus* adherence. *Infect Immun* 1984; 45: 768-74.
 82. **Valentin-Weigand P, Timmis KN and Chhwatwal GS.** Role of fibronectin in staphylococcal colonization of fibrin thrombi and plastic surfaces. *Med Microbiol* 1993; 38: 90-95.
 83. **Raja RH, Raucci G, Hook M.** Peptide analogues to a fibronectin receptor inhibits attachment of *S.aureus* to fibronectin-containing substrates. *Infect Immun* 1990; 58: 2593-8.
 84. **Mosesson MW, Colman RW, Sherry S.** Chronic intravascular coagulation syndrome. Report of a case with special studies of an associated plasma cryoprecipitate ("cryofibrinogen"). *N Engl J Med* 1968; 278: 815-21.
 85. **Mosher DF.** Action of fibrin stabilizing factor on cold insoluble globulin and alpha-2 macroglobulin in clotting plasma. *J Biol Chem* 1976; 251: 1639-45.
 86. **Iwanaga S, Suzuki K, Hashimoto S.** Bovine plasma cold insoluble globulin: cross structure and function. *Ann NY Acad Sci* 1978; 312: 56-73.
 87. **Sakata Y, Aoki N.** Cross-linking of alpha2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin stabilizing factor. *J Clin Invest* 1980; 65: 290-7.
 88. **Stanthakis NE, Mosesson MW.** Interactions among heparin, cold insoluble globulin and fibrinogen in formation of the heparin precipitable fraction of plasma. *J Clin Invest* 1978; 60: 855-65.
 89. **Mosher DF, Proctor RA, Grossman JE.** Fibronectin: role in inflammation. *J Lab Clin Med* 1978; 189-207.
 90. **Kloos W, Lambe DW.** Staphylococcus. In: *Manual of clinical microbiology*. 5th edition, eds. Balows A, Hausler Jr W, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy JH. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp: 222-37.
 91. **Pumarola A.** Staphylococcus. In: *Microbiología y Parasitología Médica*. 2 edición, eds. Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García Rodríguez JA, Piédrola Angulo G. Salvat editores S.A. pp: 333-52.
 92. **Arbuthnott JP.** Staphylococcus. Skin and wound infections; abscess; osteomyelitis; food poisoning. In: *Medical Microbiology*. 40th edition, ed. Greenwood D, Slack R, Penhetherer J. Churchill Livingstone. pp: 203-10.
 93. **Sheagren JN.** *Staphylococcus aureus* the persistent pathogen. *The New England Journal of Medicine* 1984; 310: 1437-12.
 94. **Waldvogel F.** New insights into septic and toxic diseases produced by *S.aureus*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1995; 8(Suppl 1): S3-S6.

95. **Espersen F, Clemmensen I, Barkholt V.** Isolation of *S.aureus* clumping factor. *Infect Immun* 1985; 49: 700-8.
96. **Lorian V, Gemmel CG.** Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edition, Ed. Lorian V, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 493-555.
97. **Baquero F.** Aspectos generales de los antibióticos antimicrobianos. En: *Plan de formación en enfermedades infecciosas. Módulo III: Antimicrobianos*, Ed. Médica Internacional S.A.1991; pp: 11-40.
98. **Ahlstedt S.** The antibacterial effects of low concentrations of antibiotics and host defense factors: a review. *J Antimicrob Chemother* 1981; 8(Suppl. C): 59-70.
99. **Van Den Broek PJ.** Antimicrobial drugs, microorganisms, and phagocytes. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 213-39.
100. **Wise EM Jr, Park JT.** Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; 54: 75-81.
101. **Lorian V and Tkinson.** Effect of subinhibitory concentrations of fosfomicin on bacteria. *G Ital Chemother* 1976; 23: 65-74.
102. **Lorian V.** Effects of antibiotics on hemolysin production. *Appl Microbiol* 1971; 22: 106.
103. **Lorian V.** Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Bull.N.Y.Acad.Sci* 1975; 51: 1046-55.
104. **Lorian V.** Some effects of subinhibitory concentrations of penicillin on the structure and division of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 7: 864-70.
105. **Lorian V.** Antibiotiques a concentrations subinhibitrices: efect sur la morphologie et la croissance. *Pathol Biol* 1977; 25: 291-8.
106. **Lorian V.** Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Curr Chemother* 1978; 1: 72-8.
107. **Lorian V.** Phagocytosis of staphylococci after exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16: 129-33.
108. **Lorian V and Atkinson B.** Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on cross-wells of cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9: 1043-55.
109. **Lorian V, et al.** Weight and morphology of bacteria exposed to antibiotics. In: *The influence of antibiotics on the host-parasite relationship*, edited by Giliissen G, Hahn H and Obferkuch W. Berlin, Springer-Verlag 1985; 65-72.
110. **Lorian V.** In vitro stimulation of in vivo conditions, ophysical state of the culture medium. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2403-7.

111. **Shibl AM.** Effect of antibiotics on adherence of microorganisms to epithelial cell surfaces. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 51-65.
112. **Bell GI.** The function of bacterial fimbriae. *Arch Immunol Ther Exp* 1978; 16: 173-88.
113. **Brinton CC.** The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram-negative bacteria. *Trans N.Y. Acad Sci* 1968; 27: 1003-54.
114. **Jones JW.** The attachment of bacteria to surfaces of animal cells. In: *Microbial interactions, receptors and recognition*, edited by JL Reisig. Chapman & Hall, London. Ser.B 1977; 3: 141-76.
115. **Gibbon RJ.** Adherence of bacteria to host tissue. In: *Microbiology 1977*, edited by Schelssinger D, American Society for Microbiology, Washington DC., 1977; 395-406.
116. **Retsema JA et al.** Spectrum and mode of action of Azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organism. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31(12): 1939-47.
117. **Golstein EJC.** Nprfloxacin, a fluoroquinolone antibacterial agent: classification, mechanism of action, and in vitro activity. *Am J Med* 1987; 82(6B): 3-17.
118. **Barry AL, Jones RN, Thorsberry C et al.** Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin and nalidixic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 633-7.
119. **Simons C, Stille W, Perea AJ.** Tetraciclina. In: *Manual de terapeutica antimicrobiana*. 1ed. Salvat. pp: 162-70.
120. **Simons C, Stille W, Perea AJ.** Clindamicina. In: *Manual de terapeutica antimicrobiana*. 1ed. Salvat. pp: 217-9.
121. **Bryan LE, Godfrey AJ.** Beta-lactam antibiotics: mode of action and bacterial resistance. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edition. Lorian V. Williams & Williams PP: 599-664.
122. **Yokota T.** Inactivation of beta-lactamases by sulbactam and enhanced clinical activity due to target site binding of the combination of sulbactam and ampicillin. *APMIS* 1989; Suppl 5: 9-16.
123. **Gehamo P, Taillebe M, Denis P, Iacqurt P, Hoareau J, Gojon D, Pascarel J, Kosowski A.** Short-course cefotaxime compared with five -day co-amoxyclav in acute otitis media in children. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26(Suppl A): 29-36.
124. **Simons C, Stille W, Perea AJ.** Kanamicina. In: *Manual de terapeutica antimicrobiana*. 1ed. Salvat. pp: 188,189.
125. **Davey PG, Williams AH.** Teicoplanin monotherapy of serious infections caused by gram-positive bacteria: a reevaluation of patients with endocarditis or *S.aureus*

- bacteraemia from an european open trial. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27(Suppl B): 43-50.
126. **Barza M.** A critique of animal models in antibiotic research. *Scand J Infect Dis* 1978; 14(Suppl. A): 109-117.
127. **Doran JE, Rissing JP.** Influence of clindamycin on fibronectin-staphylococcal interactions. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12 (Suppl, C): 75-83.
128. **Proctor RS, Olbrantz PJ, Mosher DF.** Subinhibitory concentrations of antibiotics alter fibronectin binding to *S.aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24: 823-26.
129. **Miyake Y, Kohada A, Fujii I, Sugai M, Suginaka H.** Aminoglycosides enhance the adherence of *S.aureus* to HeLa cells. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23: 79-86.
130. **Herrmann, M., Lai, R.J., Albrecht, K.M., Mosher, D.F. and Proctor R.A.** Adhesion of *Staphylococcus aureus* to surface-bound platelets: Role of fibrinogen/fibrin and platelets integrins. *J Infect Dis* 1993; 177: 312-322.
131. **Herrmann, M., Vaudaux, P., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, D.P., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G. and Woldvogel, F.A.** Fibronectin, fibrinogen and laminin as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 1988; 158: 693-701.
132. **Holderbaum, D., Spech, T., Ehrhart, L.A., Keys, T., Hall, G.S.** Collagen binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microb* 1987; 25: 2258-2261.
133. **Herrmann, M., Suchard, S.J., Boxer, F.A., Waldvogel, F.A., Lew, P.D.** Trombospondin binds to *S.aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. *Inf Imm* 1991; 59: 277-288.
134. **Mertz PM, Patti JM, Marcin JJ, Marshall DA.** Model studying bacterial adherence to skin wounds. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1601-4.
135. **Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley J, Foster TJ.** The coagulase of *S.aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Mol Microbiol* 1990; 4: 393-404.
136. **Mosher DF, Williams EM.** Fibronectin is decreased in plasma of severely ill patients with disseminated intravascular coagulation. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 729-35.
137. **Kuusela p.** Fibronectin binds to *S.aureus*. *Nature* 1978; 276: 718-20.
138. **Gerdes GS, Yoder MC, Douglas SD, Polin RA.** Decreased fibronectin levels in cases of neonatal sepsis. *Pediatrics* 1983; 72: 877-814.
139. **Brodin B, Von Schenck H, Schildt B, Liljedahl SO.** Low plasma fibronectin indicates septicaemia in major burns. *Acta Chir Scand* 1984; 150: 5-11.
140. **Yang DK, Bohnsack JF, Hill HR.** Fibronectin in host defense: implications in the diagnosis, prophylaxis and therapy of infectious diseases. *Pediatr Infect Dis* 1993; 12: 234-9.

141. **Díaz J, Arriba MJ, Vallina E, Maradona JA, Hevia C, Blanco F.** Reactantes de la fase aguda en la sepsis. *Rev Clin Esp* 1992; 191: 473-7.
142. **Proctor RA.** Fibronectin: an enhancer for phagocyte function. *Rev Infect Dis* 1987; 9(Suppl 4): S412-19.
143. **Klingemann HG.** Fibronectin. *Die Gelben Hefte* 1982; XXII.
144. **Baddour LM.** Virulence factors among gram-positive bacteria in experimental endocarditis. *Infect Immun* 1994; 62: 2143-8.
145. **Kuypers JM, Proctor RA.** Reduced adherence to traumatized rat heart valve by a low fibronectin binding mutant of *S.aureus*. *Infect Immun* 1989; 57: 2306-16.
146. **Doran JE, Raynor RH,.** Fibronectin binding to protein A-containing staphylococci. *Infect Immun* 1981; 33: 683-9.
147. **Rydén C, Rubin K, Speziale P, Höök M, Lindberg M, Wadström T.** Fibronectin receptors for *S.aureus*. *J Biol Chem* 1983; 258: 3396-401.
148. **Vann JM, Kuypers J, Proctor RA, Mosher DF.** Encapsulation and fibronectin-binding: two independent factors for enhancing *S.aureus* infectivity. In: Program and abstracts of the 22nd Interscience conference and Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985.
149. **Velazco MI, Waldvogel FA.** Molecular mechanisms of *S.aureus* adherence and pathogenicity of catheter infections [107]. In: Program and abstracts of the 22nd Interscience conference and Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985.
150. **Bihari DJ.** Septicaemia-the clinical diagnosis. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25 (Suppl C): 1-8.
151. **Easmon CSF.** Pathogenesis of septicaemia. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25 (Suppl C): 9-16.
152. **Eykyn SJ, Gransden WR, Phillips I.** The causative organisms of septicaemia and their epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25 (Suppl C): 41-58.
153. **Norris DA, Clark RAF, Swigart LM, Huff JC, Weston WL, Howell SE.** Fibronectin fragment(s) are chemotactic for human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1982; 129: 1612-8.
154. **Clark RAF, Della Pelle PD, Manseau E, Lanignan JM, Dvorak HF, Colvin RB.** Blood vessel fibronectin increases in conjunction with endothelial cell proliferation and capillary ingrowth during wound healing. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 269-76.
155. **Häkansson L, Venge P.** The combined action of hyaluronic acid and fibronectin stimulates neutrophil migration. *J Immunol* 1985; 135: 2735-9.
156. **Pommier CG, O'Shea J, Chused T, Yancey K, Frank NM, Takahashi T, Brown EJ.** Studies on the fibronectin receptor of human peripheral blood leucocytes:

- morphologic and functional characterization. *J Exp Med* 1984; 159: 137-51.
157. Weissman G, Perstein E, Perez HD, Falkow S, Golstein IM, Hofstein ST. Neutrophils synthesize and deposit fibronectin on surfaces to which they attach. *Trans Assoc Am Physicians* 1980; 93: 72-83.
 158. Jarstrand C, Ahigren T, Berghem L. Fibronectin increases the motility, phagocytosis and NBT (Nitroblue tetrazolium)-reduction of granulocytes. *J Clin Lab Immunol* 1982; 8: 59-63.
 159. Marino JA, Penski J, Culp LA, Spagnuolo PJ. Fibronectin mediates chemotactic factor-stimulated neutrophil substrate adhesion. *J Lab Clin Med* 1985; 105: 725-30.
 160. Bevilacqua MP, Amrani D, Mosesson MW, Bianco C. Receptors for cold insoluble protein (plasma fibronectin) on human monocytes. *J Exp Med* 1981; 153: 42-60.
 161. Proctor RA, Prendergast E, Mosher DF. Fibronectin mediates attachment of *S. aureus* to neutrophils. *Blood* 1982; 59: 681-7.
 162. Johnson E, Gauperaa T, Eskeland T. Fibronectin binds to complement-coated agarose beads and increases their association to mouse macrophages. *Scand J Immunol* 1985; 22: 315-20.
 163. Abraham Sn, Beachy EH. Host defenses against adhesion of bacteria to mucosal surfaces. *Adv Host Def Mec* 1985; 4: 63-88.
 164. Fletcher M. Adherence of marine microorganisms to smooth surfaces. In *Bacterial adherence*, Beachy EH. Chapman and Hall, London. 1980; 345-74.
 165. Roger AY. Adhesion of microorganisms to surfaces: some general considerations on the role of the envelope. In: DC Ellwood, Metting Y, Ryter P. *Adhesion of microorganisms to surfaces*. Academic Press, New York 1979; 29-55.
 166. Peters G, Loco P, Pulverer G. Microbial colonization of prosthetic devices. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheter. *Zentralbi Bakteriol* 1981; 173: 293-9.
 167. Ramirez-Ronda CH. Adherence of glucan positive and glucan negative streptococcal strains to normal and damaged heart valves. *J Clin Invest* 1978; 62: 805-14.
 168. Ramirez-Ronda CH. Effects of molecular weight of dextran on the adherence of *S sanguis* to damaged heart valve. *Infect Immun* 1980; 29: 1-7.
 169. Scheld MW, Vaone JA, Sande MA. Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran platelets and fibrin. *J Clin Invest* 1978; 61: 1394-404.
 170. Shibl AM. Effect of antibiotics on adherence of microorganisms to epithelial cell surfaces. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 51-65.
 171. Andrews HJ, Ardan GP, Hart GM, et al. Deep infection after total hip replacement. *J Bone Joint Surg.* 1981; 63B: 53-7.

172. **Beachy EH.** Bacterial adherence: adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 1981; 143: 325-45.
173. **Bombelli R, Glangrande A, Malacrida V et al.** The control of infection in orthopedic surgery. *Orthoped Rev* 1981; 10: 67-72.
174. **Bucholz HW, Elson RA, Engelbrecht F et al.** Management of deep infection in total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 1981; 63B: 343-53.
175. **Gristina AG, Oga M, Webb L, Hobgood C.** Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science* 1985; 228: 990-3.
176. **Gristina AG, Costerton WJ.** Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. *Orthopedic Clinics of North America* 1984; 15: 517-30.
177. **Doughety SH, Simmons RL.** Infections in bionic man: the pathobiology of infections in prosthetic devices-Part I. *Curr Prop Surg* 1982; 19: 221-64.
178. **Doughety SH, Simmons RL.** Infections in bionic man: the pathobiology of infections in prosthetic devices-Part II. *Curr Prog Surg* 1982; 19: 269-318.
179. **Eftechkar NS.** Wound infection complicating total hip joint arthroplasty. Scope of the problem, and its diagnosis. *Orthop Rev* 1979; 8: 49-64.
180. **Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachy EH.** Adherence of slime-producing strains of *S epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 37: 318-26.
181. **Marrie TJ, Costerton JW.** Mode of growth of bacterial pathogens in chronic polymicrobial human osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 924-33.
182. **Mayberry-Carson KJ, Tober-Meyer B, Smith JK, Lambe DW, Costerton JW.** Bacterial adherence and glycocalyx formation in osteomyelitis experimentally induced with *S.aureus*. *Infect Immun* 1984; 54: 23-36.
183. **Locci R, Peters G, Pulverer G.** Microbial colonization of prosthetic devices. III Adhesion of staphylococci to lumina of intravenous catheters perfused with bacterial suspensions. *Zbl Bact Hyg, I Abt Orig* 1981; B 173: 300-7.
184. **Peters G, Locci R, Gristina AG, Winston-Salem MD, Carolina N, Costerton JW.** Bacterial adherence to biomaterial and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg* 1988; 67A: 264-73.
185. **Bock, S.N., Lee, K.E., Fisher, B., Rubin, J.T., Schwartzentruber, D.J., Wei, J.P., Callender, D.P., Yang, J.C., Lotze, M.T., Pizzo, P.A., Rosenberg, S.A.** A prospective randomised trial evaluating prophylactic antibiotics to prevent triple-lumen catheters related sepsis in patients treated with immunotherapy. *J Clin Onc* 1990; 8: 161-169.
186. **Espersen F, Wilkinson BJ, Gahren-Hansen B, Thamdrup Vibeke Rosadil, Inge Climmensen.** Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *APMIS* 1990; 98: 471-8.

187. **Herrmann, M., Vaudaux, P., Pittet, D. et al.** Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign body material. *J Infect Dis* 1988; 159: 693-701.
188. **Vaudaux PE, Waldvogel FA, Morgenthaler JJ, Nydegger UE.** Adsorption of fibronectin to polymethylmethacrylate and promotion of *S-aureus* adherence. *Infect Immun* 1984; 45: 768-74.
189. **Dickinson, G.M. and Bisno, A.L.** Infections associated with indwelling devices: concepts of pathogenesis; infections associated with intravascular devices. *Antimicrob Agents Chemoth* 1989; 38: 597-601.
190. **Vaudaux, P., Lew D.P., Waldvogel, F.A.** Host factors predisposing to foreign body infections. In: Bisno, A.L., Waldvogel, F.A., eds. *Infections associated with indwelling medical devices*. Washington. DC: American Society for Microbiology 1989; 3-26.
191. **Chung, A.L. and Fischetti, V.A.** The role of fibrinogen in staphylococcal adherence to catheters in vitro. *J Infect Dis* 1990; 161: 1177-1186.
192. **Vaudaux, P., Suzuki, R., Waldvogel, F.A., Morgenthaler, J.J., Nydegger, U.E.** Foreign body infections: Role of fibronectin as a ligand for adherence to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1984, 150: 546-553.
193. **Mermel Leonard A.** Prevention of infections associated with intravascular catheters. *Infectios Diseases in Clinical Practice* 1994; 2: 53-60.
194. **Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachy, E.H.** Experimental foreign infections in mice challenged with slime-producing *S.epidermidis*. *Inf Imm* 1983; 40: 407-410.
195. **Donowitz, L.G., Haley, C.E., Gregory, W.W., Wenzel, R.P.** Neonatal intensive care unit bacteremia: emergence of gram-positive bacteria as a major pathogens. *Am J Infect Control* 1987; 15: 141-147.
196. **Christensen, G.D., Bisno, A.L., Parisi, J.T., Mc Laughlin, B., Hester, M.G. and Luther, R.W.** Nosocomial septicaemia due to multiply-resistant *S.epidermidis*. *Ann Inter Med* 1982; 96: 1-10.
197. **Rubin, J., Roger, A., Taylon, H.M., Everett, E.D., Prowant, B.F., Fruto, L.V., Nolph, K.D.** Peritonitis during continuous peritoneal dialysis. *Ann Inter Med* 1980; 92: 7-13.
198. **Maki, D.G., Goldman, D.A., Rhame, F.S.** Infection control in intravascular therapy. *Ann Inter Med* 1973; 79: 867-887.
199. **Maki, D.G. and Martin, W.T.** Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated infusion intravenous products. Growth of microbial pathogens in fluids for intavenous infusion. *J Infect Dis* 1975; 131: 267-272.