

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II

***LA FIBRONECTINA COMO FACTOR DE
COLONIZACION EN CATETERES. EFECTO DE
VARIOS ANTIMICROBIANOS***

TESIS DOCTORAL

M^a ELISA MEDINA ROMERO
MADRID, MARZO 1996



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

28040 MADRID

D. José Prieto Prieto y Dña María Luisa Gómez-Lus Centelles, Catedrático y Profesora titular respectivamente del Departamento de Microbiología I de la facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación, titulado:

"LA FIBRONECTINA COMO FACTOR DE COLONIZACION EN CATETERES. EFECTO DE VARIOS ANTIMICRIBIANOS". Constituye la Memoria presentada por Dña M^a **Elisa Medina Romero** para aspirar al grado de Doctora en Farmacia y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Marzo de 1996.



Edo: M^a Luisa Gómez-Lus Centelles



Fdo: José Prieto Prieto

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis el Dr José Prieto Prieto y la Dra M^a Luisa Gómez-Lus por su comprensión, respaldo, consejos e inestimable ayuda.

A mi tutora la Dra Angela Gómez-Alferez por su animo y amabilidad.

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a Ziad por su constante estímulo y colaboración en la realización de este trabajo.

A Jose Luis, Blanca Mar y familia por su ayuda y su amistad.

A mis padres por su su apoyo, confianza y esfuerzo constante, sin los cuales hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A Francisco Jose y a mis hermanas, Maribel y Beatriz que con su cariño me han acompañado en todo momento haciendo las situaciones difíciles más agradables.

A mi madre

A Francisco José

ABREVIATURAS

CID	Coagulación Intravascular Diseminada
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DNA	Acido Desoxirribonucleico
FN	Fibronectina
F XIIIa	Factor XIII activado
PBS	Phosphate Buffered Saline
P	Plasma
PT	Plasma tratado
S	Suero
ST	Suero tratado
RNA	Acido Ribonucleico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1. FIBRONECTINA	1
1.1. CONOCIMIENTO HISTORICO	1
1.2. ESTRUCTURA	3
1.3. ORIGEN Y DISTRUBUCION	3
1.4. FUNCIONES BIOLOGICAS	5
2. STAPHYLOCOCCUS	6
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.1. Interacciones fibronectina- <i>S.aureus</i>	8
2.1.1.1. Receptor de <i>S.aureus</i> en la fibronectina	8
2.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
2.2.1. Interacciones fibronectina- <i>S.epidermidis</i>	10
3. CATETERES INTRAVASCULARES	11
3.1. INTERACCIONES FIBRONECTINA- BIOMATERIAL	11
3.2. COMPLICACIONES	13
3.2.1 Complicaciones mecánicas	13
3.2.2. Complicaciones infecciosas	13
3.3. INFECCIONES POR CATETERES INTRAVASCULARES	14
3.3.1. Diagnóstico	16
3.3.2. Fisiología de la infección	17
3.3.3. Microorganismos responsables de la infección	18
3.3.4. Profilaxis de la infección	18
4. EFECTOS DE CONCENTRACIONES BAJAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS BACTERIAS	19
4.1. EFECTOS SOBRE LA VIRULENCIA	20
4.2. EFECTOS SOBRE LA ADHERENCIA	20
5. ANTIMICROBIANOS	21
5.1. AMPICILINA	21
5.2. CEFOTAXIMA	22

5.3. TETRACICLINA	23
5.4. AZITROMICINA	24
5.5. KANAMICINA	25
5.6. NORFLOXACINO	27
5.7. TEICOPLANINA	28
5.8. CLINDAMICINA	28
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	32
III. MATERIALES Y METODOS	33
1. ASPECTOS GENERALES	33
1.1. CATETERES	33
1.2. MICROORGANISMOS	33
1.3. ANTIMICROBIANOS	34
1.4. FIBRONECTINA HUMANA	34
1.5. ANTISUERO	35
1.6. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS	35
1.7. PREPARACION DE LAS BACTERIAS PARA LOS ENSAYOS DE ADHESION	35
1.8. MEDIOS DE INCUBACION DEL CATETER	36
2. EFECTO DE LOS PARAMETROS EN LA ADHERENCIA BACTERIANA AL CATETER INCUBADO CON PLASMA	38
2.1. EFECTO DEL INOCULO BACTERIANO	38
2.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA	38
2.3. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION CON PLASMA	38
2.4. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION CON LAS BACTERIAS	39
3. EFECTO DEL PLASMA, SUERO, PLASMA TRATADO Y SUERO TRATADO EN LA ADHERENCIA DE <i>S.aureus</i> AL CATETER	39
4. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FN PURIFICADA EN LA ADHERENCIA DE <i>S.aureus</i> AL CATETER	39
5. CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANO	40

5.1. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CRECIMIENTO . . .	40
5.2. DETERMINACION DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR ESPECTROFOTOMETRIA	40
5.3. PREPARACION DE LAS BACTERIAS PARA LOS EXPERIMENTOS	41
5.4. ENSAYO DE ADHESION	41
6. METODO ESTADISTICO	42
IV. RESULTADOS	43
1. ADHERENCIA DE <i>S.aureus</i> A CATETERES DE VIALON Y TEFLON ⁴³	
2. FACTORES QUE AFECTAN LA ADHERENCIA DE <i>S.aureus</i> AL CATETER	44
2.1. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE ADHESION AL CATETER INCUBADO CON PLASMA, PT, SUERO Y ST	44
2.2. DETERMINACION DE LA ADHERENCIA AL CATETER INCUBADO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FIBRONECTINA	45
2.3. ESTUDIO DE DISTINTOS PARAMETROS EN LA ADHESION DE <i>S.aureus</i>	46
2.3.1. Efecto del inóculo	46
2.3.2. Efecto de la temperatura	47
2.3.3. Efecto del tiempo de incubación con plasma y con bacterias	48
3. EFECTO DE CONCENTRACIONES SUB-INHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS EN LA ADHESION DE <i>S.aureus</i> AL CATETER DE TEFLON Y VIALON	50
3.1. AMPICILINA	51
3.2. CEFOTAXIMA	51
3.3. AZITROMICINA	51
3.4. TEICOPLANINA	52
3.5. NORFLOXACINO	52
3.6. TETRACICLINA	52
3.7. CLINDAMICINA	53

3.8. KANAMICINA	53
4. ADHERENCIA DE <i>S.epidermidis</i> A CATETERES DE TEFLON Y VIALON	58
5. EFECTO DE CONCENTRACIONES SUB-INHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS EN LA ADHESION DE <i>S.epidermidis</i> AL CATETER DE TEFLON Y VIALON	59
V. DISCUSION	81
1. VALORACION METODOLOGICA	81
1.1. TIPOS DE CATETERES	81
1.2. RECUENTO DE COLONIAS	81
1.3. PLASMA Y FIBRONECTINA HUMANA PURIFICADA	82
1.4. ELIMINACION DE FIBRONECTINA POR ANTICUERPOS	82
1.5. CRECIMIENTO BACTERIANO CON SUB-CMIs DE ANTIMICROBIANOS	83
2. ADHERENCIA A CATETERES DE TEFLON Y VIALON	83
3. FACTORES QUE AFECTAN LA ADHERENCIA DE <i>S.aureus</i> AL CATETER	90
3.1. INCUBACION CON PLASMA, PLASMA TRATADO, SUERO Y SUERO TRATADO	90
3.2. DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FIBRONECTINA	91
3.3. INOCULO	92
3.4. TEMPERATURA	93
3.5. TIEMPO	94
4. EFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS EN LA ADHESION AL CATETER	95
VI. CONCLUSIONES	104
VII. BIBLIOGRAFIA	105

I. INTRODUCCION

1. FIBRONECTINA

1.1. CONOCIMIENTO HISTORICO

La fibronectina es una glicoproteína descubierta en 1948 por Morrison (1) cuando estudiabas las propiedades de las proteínas plasmáticas, al observar que sometiendo el plasma al frío (método de Cohn) precipitaba junto al fibrinógeno otra albúmina, que se la designó como globulina insoluble al frío.

Posteriormente, en 1967 se la identificó como factor antigelatina del plasma. Al principio se le dio poca importancia hasta que se observó que se parecía mucho inmunológica y estructuralmente a una proteína que en 1973 se localizó en la superficie de una gran cantidad de células (2,3). Por lo que a ambas proteínas se las nombró con el término de "fibronectina" que describe la propiedad de adhesión a proteínas fibrilares ("fibra": fibra, "nectere": fijar en latín) (4).

En 1976 se descubrió que esta glicoproteína estaba compuesta por dos subunidades de 220.000 Dalton cada una y cuya composición era idéntica en cuanto a aminoácidos y carbohidratos implicando un mismo comportamiento inmunológico sea cual sea su origen, incluso entre distintas especies de vertebrados (5). A partir de este momento se profundizó en el estudio de su estructura y de sus funciones biológicas.

1.2. ESTRUCTURA

La fibronectina es una glicoproteína con un peso molecular de 440.000 Dalton, contiene aproximadamente 2.300 aminoácidos y un 5% de carbohidratos (el porcentaje de carbohidratos varía considerablemente según sea fibronectina plasmática o procedente del líquido amniótico). Además, está compuesta por dos subunidades casi idénticas, unidas entre sí por dos puentes disulfuros que confieren gran estabilidad a la molécula. Cada subunidad posee un grupo N-amino terminal (6,7).

La secuencia de aminoácidos es la siguiente:

Serina, Treonina, Acido glutámico, Prolina, Glicina, Alanina, Alfa-cistina, Valina, Metionina, Isoleucina, Leucina, Tirosina, Fenil alanina, Lisina, Histidina y Triptófano.

La secuencia de carbohidratos es la siguiente:

Acido siálico, Exosa y Exosamina.

Estudios de aminoácidos del m-RNA y de secuencias del DNA genómico muestran que la proteína está formada por tres tipos de secuencias homólogas de repetición de 45 (tipo I), 60 (tipo II), 90 (tipo III) aminoácidos, lo que supone más de 90% de la secuencia aminoacídica de la fibronectina y se organizan en filas lineales formando las dos subunidades (4,6).

En las secuencias tipo I y II se establecen puentes disulfuro, por el contrario en las secuencias tipo III no, aunque sí aparecen grupos sulfidrilo libres en algunas de ellas, cuya función no se conoce todavía, parece ser que influyen en la formación de multímeros de elevado peso molecular de fibronectina al oxidarse estos grupos.

Estudios que analizaron la incorporación de fibronectina marcada con I¹²⁵ en la matriz extracelular de fibroblastos sugieren que el mecanismo de formación de multímeros de fibronectina mediada por uniones disulfuro implica un intercambio disulfuro en el tercio del amino terminal de la molécula (4-8).

Cada brazo de la fibronectina puede dividirse en varios dominios funcionales que fijan diferentes macromoléculas y células:

-D1: Fibrina, heparina y *S.aureus*.

-D2: Colágeno, gelatina, fragmento C1q y *S.pyogenes*.

-D3: Función desconocida.

-D4: ADN.

-D5: Función desconocida.

-D6: Plástico, *T.pallidum*, vinculina, α -actina, tropomiosina, miosina y adhesión celular (en varios tipos de células la secuencia Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) de esta región es la que interacciona con glicoproteínas de la superficie celular como la IIb/IIIa en las plaquetas).

-D7: Heparina.

-D8: Fibrina.

-D9: Corresponde al carboxilo terminal y es posible que constituya otro sitio de fijación para *S.aureus*.

La fibronectina también se fija a distintas bacterias como estreptococos (9) y estafilococos (10), a *Candida albicans* (11) y a distintos parásitos como *Trypanosoma cruzi* (12) y *Leishmania* (13).

Se ha identificado dos regiones en la molécula que pueden variar por ajuste diferencial del m-RNA dando lugar a subunidades de fibronectina con diferentes secuencias de aminoácidos. Se ha identificado un subtipo en células tumorales humanas y fibroblastos que contiene una secuencia adicional tipo III llamada extra domino (ED). Su presencia puede ser exclusiva de la fibronectina celular (14-16), lo que sugiere que esta región juega un papel en la organización de tejidos quizá por afectar a la fibrillogénesis o proporcionar sitios de unión para la migración celular y otras moléculas de la matriz extracelular.

La fibronectina se encuentra presente en el organismo en dos formas (6):

La forma soluble que se distribuye de manera dimérica en sangre y otros fluidos orgánicos, se dispone globularmente al plegarse cada brazo hacia el carboxilo terminal.

La forma insoluble se dispone oligoméricamente en la superficie de algunas células y tejidos mostrando una forma abierta. También se localiza en la matriz extracelular en forma fibrilar.

1.3. ORIGEN Y DISTRIBUCION

La forma soluble de la fibronectina se encuentra distribuida en el plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, fluido sinovial, seminal y exudados inflamatorios. En situaciones patológicas está presente en líquido ascítico y exudado pleurales.

Muchos tipos de células sintetizan y secretan fibronectina como fibroblastos, células de la astrogía, endoteliales, musculares, epiteliales, células del melanoma y plaquetas. Pero la mayoría de la fibronectina circulante es sintetizada por los hepatocitos.

La vida media de la fibronectina plasmática es de 24 a 72 horas y cuando se retira de la circulación no se conoce bien cual es su destino, aunque sí se sabe que una

parte es incorporada en la matriz extracelular.

La concentración plasmática guarda relación con la edad y el sexo. Su rango normal oscila de 250 a 600 $\mu\text{g/ml}$, siendo los valores en las mujeres inferiores a la de los hombres, salvo en la edad postmenopausica. La concentración máxima en los varones se alcanza entre la cuarta y quinta década de vida (17).

La concentración de esta glicoproteína en el plasma es ligeramente superior a la del suero, ya que una parte se incorpora en la matriz de fibrina por enlace covalente gracias al factor XIII (4) o factor estabilizador de la fibrina. Esta incorporación es mayor cuanto más baja es la temperatura a la que se trabaja.

Los niveles de fibronectina se ven alterados en distintas patologías :

-En Disfunciones hepáticas graves, coagulopatías intravasculares diseminadas (CID), sepsis, traumatismos graves, grandes quemados, intervenciones quirúrgicas, el valor de la fibronectina plasmática desciende como resultado de una disminución en la producción y/o un aumento en el consumo (17,18).

-Por otro lado en osteoartrosis y conectivopatías como artritis reumatoide el nivel de fibronectina se encuentra aumentado en el líquido sinovial (19).

La fibronectina en forma insoluble se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos, se localiza en zonas de regeneración tisular, de forma interendotelial, en membranas basales, paredes vasculares, tejido conjuntivo y fijada intracelularmente a la actina.

Por inmunofluorescencia se ha podido comprobar que existen estrechas interacciones entre la fibronectina extracelular y la arquitectura celular, implicando una desorganización a nivel de microfilamentos la separación proteolítica de la fibronectina pericelular, con lo que se alteraría la estructura y la capacidad de relación de la célula.

Agentes oncológicos, virales, físicos, químicos, etc, ocasionan una pérdida de la fibronectina de la superficie celular, alterando su morfología y adhesividad. De manera que si a células malignas se le añade fibronectina se observa una regresión de la alteración (3).

Tanto la fibronectina soluble como la insoluble poseen los mismos determinantes antigénicos y se comportan inmunológicamente de la misma forma sea cual sea su origen, incluso entre distintas especies de vertebrados.

La forma libre se puede incorporar a la fibronectina de la matriz extracelular de los tejidos pasando a forma insoluble y parece ser que en este mecanismo están implicados receptores de la superficie celular (2).

Deficiencias o anomalías en la síntesis de fibronectina es muy raro, sí se han descrito deficiencias parciales (3), quizá porque defectos genéticos importantes son letales, debido al papel que desempeña en la morfogénesis y la fisiología.

1.4. FUNCIONES BIOLÓGICAS

La fibronectina se caracteriza principalmente por su función adhesiva que le permite desempeñar importantes papeles en diversas y complejas funciones biológicas:

- Ayuda en cicatrización de heridas, ya que al depositarse en el colágeno dañado favorece la unión de plaquetas, la migración de fagocitos y fibroblatos y la proliferación celular (6,20).

- Interviene en la estabilización del coágulo, puesto que se sabe que se une covalentemente a coágulos de fibrina gracias al factor XIIIa (4).

- Aumenta la neovascularización al estimular la migración de la célula endotelial.

- Favorece la normal queratinización al servir como guía en el movimiento de las células epidérmicas a través del tejido de granulación y ayudando a la reorganización de la membrana basal.

- Es importante en la embriogénesis y en la regeneración de los nervios por intervenir en la adhesión, migración y diferenciación celular (20-22).

- Se puede destacar su papel en la respuesta inmunitaria al aumentar la unión de linfoquinas a macrófagos, su expresión de receptores Fc y ayuda a mantener su capacidad oxidativa. También aumenta la adhesión y quimiotaxis de fagocitos.

- La fibronectina también se encuentra en áreas de fibrosis e inflamación. Algunas veces aparece incluida en complejos inmunes encontrados en pacientes con enfermedades reumáticas (6-7) bacterianas, aunque su papel en este proceso se desconoce.

- Desempeña una importante función en la fagocitosis por su capacidad de fijar sustancias, como fragmentos de membrana, inmunocomplejos, agregados de fibrina, bacterias, etc, de este modo se la ha considerado como un opsonina inespecífica del

plasma al actuar como puente de unión entre la partícula y el macrófago (20-23).

2. STAPHYLOCOCCUS

Los estafilococos son cocos grampositivos de 0.5-1 μm de diámetro, inmóviles, fermentan los azúcares, no esporulan, generalmente son no capsulados y productores de catalasa. Se suelen agrupar en forma de racimos y se consideran bacterias poco exigentes, que crecen en medios comunes y ofrecen cierta resistencia a los agentes externos (24).

Se encuentran generalmente en el medio ambiente que rodea al hombre, formando parte de la flora normal de la piel y las mucosas.

El prototipo de los de los estafilococos patógenos es *S.aureus* que es el agente causal de la mayoría de las infecciones y el prototipo de estafilococos oportunistas es *S.epidermidis*, comensal de la piel que en ocasiones interviene en procesos patógenos (25). Así, recientes datos sugieren que las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo tienden a aumentar por patógenos grampositivos como los estafilococos coagulasa negativos que son los más frecuentemente aislados y *S.aureus* (26,27).

2.1. *Staphylococcus aureus*

La estructura antigénica de es microorganismo es bastante compleja, se han determinado cerca de 30 antígenos diferentes en su pared celular, de los cuales los más importantes son (24,28-30):

-Polisacárido A: específico de especie y constituido por ácidos teicoicos, polímeros de fosfato de ribitol unidos al péptidoglicano por enlaces covalentes.

-Proteína A: específica también de especie, está en la pared pero se puede liberar al medio. Tiene la capacidad de unirse a la extremidad Fc de las Ig G normales y a la F(ab)₂ de las Ig G

específicas, también se caracteriza por activar al complemento.

-Proteínas responsable de la tipospecificidad.

Por otro lado su acción patógena es debida al efecto de:

-Antígenos de superficie por sus propiedades antifagocitarias.

-Toxinas: Asociadas a estados de lisogenia o a la presencia de plásmidos (24,28-31).

* Hemolisinas: son exotoxinas termolábiles citolíticas o citotóxicas de las que se conocen cuatro tipos: alfa, beta, gamma y delta.

* Leucocidinas: además de las leucocidinas asociadas a hemolisinas existen otras no hemolíticas compuestas por dos subunidades F y S que provocan alteraciones en la permeabilidad de los fagocitos ocasionando su muerte.

* Exfoliatinas: es una exotoxina proteica dermatropa.

* Enterotoxinas: son exotoxinas proteicas y resistentes al calor y a los fermentos gástricos. Se fijan en receptores nerviosos del tubo digestivo produciendo nauseas, vómitos y diarreas por acción de la toxina sobre el centro del vómito.

-Enzimas:

* Coagulasas: Parece que están relacionadas con la virulencia puesto que la mayoría de las cepas de *S.aureus* la producen (98%), aunque recientes trabajos ponen en duda esta capacidad.

-coagulasa libre es una proenzima que en presencia de protrombina y/o un cofactor del plasma sanguíneo (coagulase reacting factor o CRF) forma un complejo con actividad proteolítica que transforma el fibrinógeno en fibrina y produce la coagulación del plasma, a su vez se liberan distintos fibrinopéptidos que tienen acción sobre la fibra muscular lisa. Interviene en el proceso inflamatorio y en la formación del coágulo intravenoso.

-coagulasa combinada llamada también "clumping factor" (32): se encuentra ligada a la pared celular y se supone que es la causa de la formación de una cubierta protectora de fibrina responsable de la agrupación de los estafilococos y de su acción inhibidora de la fagocitosis.

*Fibrinolisin: activan el plasminógeno por lo que son las responsable

de la formación de microémbolos causantes de metástasis supurativas y también contribuyen a la capacidad de invasión del estafilococo en focos inflamatorios.

*Penicilasas: son β -lactamasas . Su producción es debida a plásmidos que se trasmiten por transducción.

*Existen otras enzimas que ayudan al establecimiento de la infección, invasión y producción de lesiones como son: hialuronidasas, desoxirribonucleasas, fosfatasas y lipasas.

Se debe tener en cuenta que no todas las cepas de *S.aureus* poseen los mismos determinantes antigénicos, ni producen las mismas toxinas, ni enzimas en calidad y cantidad. Por lo que la acción patógena difiere según la cepa que se considere.

2.1.1. Interacciones fibronectina-*S.aureus*

Debido a las propiedades adhesivas de la fibronectina a plásticos y membranas basales (6,20,21) y la existencia de dominios específicos de adherencia a *S.aureus* en la molécula es importante tener en cuenta este tipo de interacciones ya que pueden constituir un paso previo, en una posible colonización y posterior infección por este microorganismo.

2.1.1.1. Receptor de *S.aureus* en la fibronectina

Con el uso de proteasas se han aislado diferentes fracciones de la molécula de fibronectina. Así, una ligera tripsinización da lugar a un fragmento amino terminal de 27 Kdal y a un fragmento carboxilo terminal de 180 Kdal.

Estudios competitivos de adhesión mostraron que el fragmento de 27 Kdal era tan efectivo como la molécula de fibronectina intacta en bloquear la unión de fibronectina marcada a estafilococos (33).

Otros autores informaron de la existencia de un segundo sitio de adhesión que se sitúa en el fragmento de 180 Kdal. Estos estudios se realizaron con bacterias muertas

por calor o con formaldehído, en cambio, con microorganismos vivos se encontró que el fragmento de 180 Kdal solo adhería estafilococos en el caso de la fibronectina fija (34,35).

La estructura dimérica de la fibronectina nos indica que cada brazo de la molécula lleva un dominio de adhesión para *S.aureus*, además puede unir a dos estafilococos al mismo tiempo produciendo aglutinación (35-37). De hecho algunas cepas aglutinan con una concentración de fibronectina de 3 $\mu\text{g/ml}$ (100 veces menor que la concentración plasmática) (38).

A. Localización del receptor

La fibronectina se une a la superficie de *S.aureus*. El tamaño considerable de esta molécula y fragmentos de 27 Kdal marcados corroboran esta localización en las porciones más externas de la pared celular, de manera que con una tripsinización o sonicación suave se eliminaría este receptor (6,38).

B. Caracterización del receptor

El receptor estafilocócico de fibronectina no ha sido todavía completamente caracterizado, ya que existen discrepancias entre los distintos autores. Algunos estudios informaron que el receptor estaba compuesto principalmente por un carbohidrato, en cambio otros vieron que se trataba de la proteína A (35,37,38). En estudios más recientes se ha demostrado la existencia de dos genes altamente homólogos que codifican para una proteína transmembranaria que interactúa con la fibronectina y que muestran analogía con el gen que codifica para la proteína A (39).

C. Número de receptores

Estudios han mostrado un número entre 100-20.000 receptores de fibronectina por microorganismo (38-41). Lo cual está dentro de lo posible, ya que el tamaño de la

molécula y el área de superficie de *S.aureus* hace improbable que exista un número mayor de 25.000 receptores por bacteria.

El número de receptores expresados depende de la fase de crecimiento, del pH del medio y del tipo de medio utilizado, siendo máximo en fase logarítmica, a pH ácido y con medio de crecimiento enriquecido (37,40-42). Parece ser que también está aumentado en el caso de aislados clínicos (43).

2.2. *Staphylococcus epidermidis*

Se encuentra dentro del grupo de estafilococos coagulasa negativos, no produce toxina alfa, ni fermenta el manitol, elabora generalmente un pigmento blanco y es sensible a la novobiocina. Sus ácidos teicoicos están constituidos por polímeros de fosfato de glicerol, posee una resistencia a los antibióticos variable, aunque generalmente alta y aproximadamente un 10% de las cepas pueden ser hemolíticas. Se encuentra en la piel, principalmente en lugares húmedos (24).

Generalmente no es patógeno pero se puede comportar como oportunista y producir ocasionalmente infecciones urinarias, postoperatorias, endocarditis, meningitis y sepsis en enfermos sometidos a técnicas instrumentales.

La colocación de catéteres venosos o urinarios o la implantación de prótesis artificiales abren nuevas puertas de entrada facilitando la difusión de este microorganismo.

2.2.1. interacciones fibronectina-*S.epidermidis*

Las interacciones fibronectina-*S.epidermidis* no han sido estudiadas tanto como aquellas con *S.aureus*. Los estudios no llevan a una caracterización ni expresión de receptores frente a esta glicoproteína. Sin embargo, sí se ha estudiado el papel de la fibronectina como mediador de la adhesión de *S.epidermidis* a biomateriales.

Teniendo en cuenta que los catéteres una vez introducidos en el vaso sanguíneo son recubiertos rápidamente por proteínas del hospedador como la fibrina, fibrinógeno y fibronectina (44-46). Se han realizado numerosos estudios para valorar las interacciones de *S.epidermidis* con la fibronectina y comprobar de este modo la importancia de esta glicoproteína en la fijación de la bacteria al catéter obteniéndose resultados controvertidos:

Russell y cols (47) encontraron un modesto incremento en la adherencia de SCN a catéteres de PVC preincubados con fibronectina. Vaudaux también observó un ligero aumento de la adhesión a CIV retirados de pacientes y lo atribuyó a la presencia de esta proteína (46).

Por otro lado Pascual y cols (48) no detectaron aumento de la adhesión en catéteres recubiertos de fibronectina, además otro grupo de investigadores demostraron que la adherencia de SCN a catéteres de silicona era inhibida por la fibronectina y otras proteínas de la sangre (49).

Al observar estos resultados podemos considerar que el papel de la fibronectina y otras proteínas de la sangre en la adhesión de estos microorganismos a la sangre no está del todo aclarado.

3. CATETERES INTRAVASCULARES

3.1. INTERACCIONES FIBRONECTINA-BIOMATERIAL

Varias observaciones clínicas y experimentales (50) realizadas en distintos tipos de biomateriales insertados en pacientes, tales como válvulas, suturas o catéteres (51) han demostrado una alta susceptibilidad a las infecciones estafilocócicas.

Por otro lado se sabe que la fibronectina establece interacciones con bacterias grampositivas, lo que sugiere un papel importante de esta proteína en las infecciones, principalmente en las que se encuentran implicada *S.aureus*. También, estudios de inmunofluorescencia han demostrado que la fibronectina se fija a implantes de

polimetilmetacrilato (PMMA) (52) y a otros tipos de biomateriales.

En la actualidad la mayoría de los catéteres intravasculares son de composición plástica (teflón, polivinilo...) y considerando que la molécula de fibronectina tiene la capacidad de unirse al plástico, es lógico pensar que esta molécula se fije al catéter favoreciendo de este modo la adherencia de los estafilococos.

Se ha visto que existe una estrecha relación entre la adherencia de *S.aureus* y la cantidad de fibronectina depositada en láminas de PMMA. El proceso de adsorción de esta glicoproteína es saturable, con una fijación máxima de fibronectina en forma de monocapa de aproximadamente $0.32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (52).

La adsorción de la glicoproteína se inhibe por tratamiento térmico de la molécula o por digestión proteolítica con tripsina.

Algunos estudios sugieren que ocurren cambios conformacionales y en la actividad biológica de la fibronectina tras su adsorción en superficies hidrófobas a bajas concentraciones en "buffer"(53,54).

Se ha visto que existen varias sustancias que pueden influir en la adsorción de esta molécula al material sintético:

Varios estudios han mostrado un descenso de la afinidad de la fibronectina por varias superficies hidrofóbicas en presencia de proteínas del suero (53-55). Así, la inhibición de la adsorción de la proteína a un amplio rango de materiales plásticos puede ser debida a sus propiedades comunes de superficies hidrófobas. También, es posible que la presencia de proteínas del suero prevengan la adsorción por efectos competitivos, como ocurriría con la albúmina (52).

La presencia del colágeno cubriendo la superficie de láminas de PMMA favorece la fijación de la fibronectina (55) y también asemeja más al medio en que se encuentra un biomaterial implantado, pues se recubre de compuestos celulares y fibrilares organizados igual que en la matriz extracelular.

Con respecto a las fuentes que pueden proporcionar fibronectina para su adsorción en el biomaterial es importante destacar la fibronectina exógena plasmática procedente de los fluidos extracelulares que bañan el implante y la procedente de síntesis endógena de las células que colonizan dichos implantes, como es el caso de los fibroblastos (56).

3.2. COMPLICACIONES

El uso de cánulas intravasculares en la medicina moderna es una práctica común que afecta tanto a pacientes hospitalizados como a enfermos ambulatorios. Junto a los enormes beneficios que supone el facilitar el acceso a la circulación sanguínea, se olvidan a menudo algunos riesgos potenciales, de los cuales la infección es el más relevante.

Su extensivo uso conlleva, además de a una serie de complicaciones infecciosas, a otras de origen mecánico.

Todas estas complicaciones pueden estar relacionadas con una negligencia en el seguimiento de las normas de cuidado, entre otras posibles causas.

3.2.1. Complicaciones mecánicas

Aparecen entre el 1 y el 7% (57-61) y son debidas a procesos traumáticos durante la colocación de la cánulas, por punción vascular, punción linfática, o simplemente por lesión de alguna zona determinada.

3.2.2. Complicaciones infecciosas

Conlleva una serie de manifestaciones clínicas que las podemos dividir en locales y generales o sistémicas:

LOCALES:

- Infección del túnel subcutáneo:

En los catéteres de Hickman o Brobiac ocupa un 10% del total de las causas de infección. Clínicamente resulta evidente por la presencia de un cordón enrojecido y doloroso a lo largo del trayecto subcutáneo del vaso (62).

- Flebitis supurada:

Ocurre de un 5 a un 15% de los casos de infección y se caracteriza por acúmulo

de polinucleares y microorganismos en la luz y endotelio vascular (63).

El abordaje terapéutico ha variado desde la última década que generalmente se procedía a la exéresis del vaso. En la actualidad, un número considerable puede resolverse satisfactoriamente con la retirada del catéter y el uso de antimicrobianos por vía parenteral. La aparición de flebitis supurada incrementa notablemente la mortalidad atribuible a la infección del catéter, que pasa de un 6-10% a un 85% en los casos donde resulta inadecuadamente tratada (64).

GENERALES:

Las manifestaciones generales son esencialmente las de toda infección endovascular caracterizada por fiebre, manifestaciones multiorgánicas y otras complicaciones propias de cualquier bacteriemia.

- Bacteriemia:

La bacteriemia asociada a catéteres puede ocurrir hasta en un 2.1% (65) de cánulas periféricas y llega a alcanzar el 3.8-21% (66,67) en catéteres centrales. La colocación de los catéteres en vasos centrales y la etiología principalmente estafilocócica hacen que las manifestaciones sépticas pulmonares sucedan con mayor frecuencia en la bacteriemia asociada a dispositivos intravasculares. También es posible la aparición de un shock séptico en algunos casos.

- Endocarditis infecciosa:

La endocarditis bacteriana sobre todo con afectación de la válvula tricúspide, se asocia a un 2-10% con el uso de catéteres centrales (65).

3.3. INFECCIONES POR CATETERES INTRAVASCULARES

En base a numerosos estudios puntuales sobre los factores relacionados con la infección de los dispositivos intravasculares se han podido establecer importantes variables de riesgo entre las que se destacan las derivadas del paciente y de la cateterización:

DERIVADAS DEL PACIENTE

Los grupos de enfermos con un mayor riesgo de infección son los menores de 1 año y los mayores de 60, los granulocitopénicos o que reciben quimioterapia, los que sufren lesiones cutáneas como quemaduras o psoriasis, los que presentan enfermedades de base, incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, los que presentan bacteriemia clínica o algún foco infeccioso vecino (traqueotomía en accesos de subclavia o yugular) (63).

DERIVADAS DEL CATETER

-Numero de lúmenes:

Estudios no comparativos (68,69) han dado un mayor porcentaje de estas complicaciones en los multilúmenes (3-19%). Estos datos sin embargo no han sido confirmados en un estudio comparativo realizado por Gil y cols (70).

-Composición del material empleado:

La mayoría de los periféricos son de composición plástica (polivinilo o teflón), aunque en pacientes de edad pediátrica se usan "palomillas" metálicas, éstas tienen un porcentaje de infección menor que los de plástico (8,5% frente a 11.5%, estudios no comparativos) . Los catéteres de silicona son los que presentan menor incidencia de infección, que se estima en un 0.14% de casos por cada 100 días de uso, por lo que se considera el material idóneo para tiempos prolongados de uso (63).

Para disminuir la tasa de infección se han comercializado dispositivos intravasculares bañados en solución antiséptica (clorhexidina más sulfadiazina-plata) o antibiótica (cefazolina) y aunque los primeros resultados parecen ser favorables (71-74), se requiere más información en este sentido.

- Lugar de inserción:

Parece ser que los catéteres venosos centrales colocados en la yugular interna se infectan más que los colocados en la vena subclavia (75), ésto puede ser debido a una mayor colonización de la piel en la zona de inserción de la vena yugular con respecto a la subclavia (76), a un incremento de la colonización por patógenos respiratorios y a una menor adherencia del vendaje. La región femoral, la vía umbilical (en recién nacidos) y pliegues cutáneos incrementan la probabilidad de infección.

3.3.3. Microorganismos responsables de la infección

La etiología de la infección asociada a catéteres intravasculares se centra primordialmente en los microorganismos de la flora habitual de la piel. De ahí que los patógenos más frecuentes sean los estafilococos. Numerosos autores coinciden en señalar un mayor número de aislamientos de *S.epidermidis*, seguido de *S.aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida* (63) (con una mortalidad asociada a esta levadura de un 38%). Con una capacidad de producir bacteriemia del 3% en *S.epidermidis* y del 15% en *S.aureus* (91).

Las enterobacterias tales como *klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, *Citrobacter sp*, bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas sp* y por último *Cándida sp*, han sido relacionadas con brotes epidémicos. Generalmente estos brotes suelen estar relacionados con una contaminación del líquido de infusión, ya que estos microorganismos pueden sobrevivir en agua destilada, soluciones isotónicas, glucosadas y en soluciones de nutrición parenteral (91).

También se han detectado casos con microorganismos tales como *Malassezia furfur* (92) en neonatos con nutrición parenteral, *Aspergillus flavus* (93) en pacientes con neoplasias hematológicas, *Corynebacterium jeikeium* (94) en inmunocomprometidos. Otros microorganismos como *Campylobacter fetus* (95), *Pseudomonas putida* (96) micobacterias no tuberculosas (97), *Fusarium chlamydosporum* (98) han sido descritos en casos muy aislados como responsables de la infección asociada al catéter.

3.3.4. Profilaxis de la infección

Con el fin de evitar en lo posible las infecciones relacionadas con el catéter es necesario tomar una serie de medidas generales en la inserción y mantenimiento de éste. Entre las precauciones a considerar podemos destacar la elección adecuada de la zona de inserción, uso de antisépticos cutáneos como la povidona-

zona de inserción, soluciones de lavado para el lumen del catéter a las que, en ocasiones, la adición de antibióticos ha sido recomendada por algunos autores como medida profiláctica (99,100), aunque se ha de tener en cuenta, la posible aparición de resistencias (101,102), y por último el uso de catéteres recubiertos de antimicrobianos y antisépticos.

4. EFECTOS DE CONCENTRACIONES BAJAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS BACTERIAS

Los efectos que producen concentraciones bajas de antimicrobianos en las bacterias pueden ser evaluados observando cambios en la morfología, ultra estructura, bioquímica y tasa de multiplicación bacteriana (103). Para cuantificar y comprobar la sensibilidad de un microorganismo respecto a un antibiótico es preciso considerar los siguientes términos:

-Concentración mínima inhibitoria (CMI): Es la concentración menor de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo tras 18-24 horas de incubación (103,104).

-Concentración mínima bactericida (CMB): Es la concentración menor antibiótico capaz de destruir o matar 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo tras 18-24 horas de incubación (103,104).

-Concentración mínima antibiótica (CMA): Es la concentración menor capaz de producir "in vitro" alteraciones morfológicas y/o estructurales en la bacteria. Son concentraciones inferiores a la CMI (103).

Estos valores obtenidos "in vitro" no se identifican necesariamente con los obtenidos "in vivo" ya que el tamaño del inóculo, las condiciones de vida, la presencia de sustancias endógenas, etc, hacen cambiar la respuesta del germen al antimicrobiano. Aunque sí presentan un alto valor orientativo.

Los antimicrobianos según la concentración y sitio de infección pueden afectar tanto a los microorganismos alterando su estructura interna, como al hospedador modificando la eficacia de los mecanismos de defensa (104). Puesto que en el foco de

tanto a los microorganismos alterando su estructura interna, como al hospedador modificando la eficacia de los mecanismos de defensa (104). Puesto que en el foco de infección no siempre se puede alcanzar concentraciones tisulares comparables a la CMI, ya sea por un acceso difícil del antimicrobiano al foco infeccioso o bien por una excesiva CMI para un microorganismo o por una estrecha relación con la concentración tóxica del paciente. También se debe considerar en un tratamiento bacteriano el efecto de concentraciones subinhibitorias (sub-CMIs) sobre la relación hospedador-bacteria (103,105).

4.1. EFECTOS SOBRE LA VIRULENCIA BACTERIANA

La virulencia es un fenómeno muy complejo que resulta de las interacciones entre las bacterias y el hospedador, se puede definir como la capacidad de un agente infeccioso para producir efectos patológicos o como el mínimo inóculo bacteriano capaz de dañar al hospedador; a menor inóculo mayor capacidad de virulencia (103,106,107).

Son muchos los factores que pueden contribuir a la virulencia bacteriana como la morfología, velocidad de crecimiento, productos del metabolismo como las toxinas y enzimas, algunos componentes de la superficie y productos de lisis bacteriana. Concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos pueden afectar a diversos componentes de virulencia (108), así, pueden producir cambios en la superficie bacteriana alterando su capacidad de adhesión, afectar la resistencia frente a factores de inmunodefensa, la proliferación local, daño tisular, invasión y diseminación.

4.2. EFECTOS SOBRE LA ADHERENCIA

La adherencia bacteriana es uno de los primeros pasos en un proceso infeccioso. Los efectos de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la adherencia bacteriana dependen de muchos factores entre ellos podemos destacar su mecanismo de acción, las fuerzas electrostáticas y la hidrofobicidad bacteriana.

Estas concentraciones subinhibitorias pueden modificar la superficie bacteriana

afectando la capacidad de adherirse a las superficies celulares. Esta afectación puede llevarse a cabo de tres maneras diferentes (103,109-112):

-Induciendo la rotura de adhesinas preformadas en la célula bacteriana como es el caso de la penicilina sobre el ácido lipoteicoico en la superficie de *Streptococcus pyogenes*.

-Impidiendo la formación y/o expresión de las adhesinas en fase de crecimiento bacteriano.

-Induciendo la formación de adhesinas no funcionales.

5. ANTIMICROBIANOS

5.1. AMPICILINA

Pertenece al grupo de los β -lactámicos 6-aminopenicilánicos. Las penicilinas junto a las cefalosporinas constituyen el grupo más amplio en número y de mayor importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Esto es debido a su potente actividad bactericida, al amplio espectro alcanzado por muchos de sus derivados, a la existencia de preparados que resisten la inactivación enzimática por β -lactamasas y de inhibidores de estas enzimas sin actividad antibacteriana propia y a la cualidad de poseer una farmacocinética favorable para su uso (113).

La ampicilina es un derivado semisintético de la penicilina (alfa-aminobencilpenicilina). La presencia de un grupo amino en la cadena lateral de la bencilpenicilina le permite ampliar su espectro de acción frente algunas bacterias gram negativas.

MECANISMO DE ACCION

Este compuesto ejerce una acción bactericida al bloquear la síntesis de peptidoglicano en su última etapa por inhibición de la transpeptidasa (enzima esencial en esta síntesis) gracias a su analogía estructural con la D-alanina terminal propia de los

β -lactámicos.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Tiene un amplio espectro de acción pues es activa tanto en gérmenes gram positivos, como gram negativos, siempre y cuando no sean cepas productoras de β -lactamasas que inactivarían la molécula.

5.2. CEFOTAXIMA

Es una cefalosporina de tercera generación. La característica más importante de estos β -lactámicos, derivados del ácido 7-aminocefalosporánico (7-APA), es que presentan una gran estabilidad frente a las β -lactamasas (114), lo que supone un factor importante a la hora de su elección en la aplicación clínica.

La cefotaxima es una cefalosporina semisintética de tercera generación que se administra exclusivamente de forma parenteral y presenta una elevada estabilidad frente a β -lactamasas.

Se ha originado de la unión de la cadena lateral aminotiazol de la molécula de cefotiam con la cadena lateral oxima de la cefuroxima. Presenta un sustitutivo alfa-metoximino en el radical de la posición siete que protege a la molécula de la hidrólisis por las β -lactamasas y en la posición tres presenta una cadena lateral acetoximetil, lo que permite la existencia de un metabolito activo, la desacetil-cefotaxima que junto con la cefotaxima presenta una acción sinérgica (115).

MECANISMO DE ACCION

Se comporta al igual que la ampicilina inhibiendo la síntesis del peptidoglicano en la pared celular al bloquear la transpeptidación.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Presenta un amplio espectro sobre gram negativos como enterobacterias, *N.meningitidis* y *N.gonorrhoeae* y también sobre gram positivos incluidos estafilococos resistentes a meticilina.

5.3. TETRACICLINA

Forman un grupo de antimicrobianos de amplio espectro derivados de la naftacenocarboxamida policíclica, con una amina terciaria en la posición cuatro y un grupo OH fenólico en la posición diez. Poseen elevada capacidad de quelar cationes divalentes. La primera tetraciclina obtenida fue la clortetraciclina en 1948 a partir de *Streptomyces aureofaciens*. Otras tetraciclinas se obtuvieron también por métodos sintéticos a partir del núcleo fundamental. Según su tiempo de acción se dividen en tres grupos: de acción corta, intermedia y larga (116).

La tetraciclina es un antibiótico del grupo de las tetraciclinas de acción corta (posee una vida media de aproximadamente dos horas). Es bacteriostático de amplio espectro y liposolubilidad intermedia. Corresponde a un derivado del tetraciclo naftacenocarboxamida con un grupo -CH₃OH en la posición seis.

MECANISMO DE ACCION

Ejerce su acción a nivel del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica. Para ello se fija a la fracción 30S ribosómica de tal manera que bloquea la fijación del aminoacil-t-RNA al complejo m-RNA-ribosoma, interfiriendo la incorporación de aminoácidos a la cadena creciente del polipéptido bacteriano. Para ejercer su acción es requerimiento previo la penetración del antimicrobiano en la bacteria. En las bacterias gram negativas penetra por difusión pasiva, a través de los poros hidrofílicos de la membrana externa y por transporte activo. Con respecto a las bacterias gram positivas se sabe que existe un transporte activo (117).

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Como todas las tetraciclinas en general presenta un espectro de acción frente a una gran variedad de microorganismos. Es muy activa frente a bacterias gram positivas y gram negativas, clamidyas, nocardias, rickettsias, micoplasmas, espiroquetas, anaerobios como *Clostridium tetani* y *Actinomyces israelii*.

5.4. AZITROMICINA

La azitromicina pertenece al grupo de los macrólidos, antimicrobianos que se caracterizan por la presencia de un anillo lactónico macrocíclico, al que se unen diversos desoxiazúcares y/o aminoazúcares. Son compuestos de naturaleza básica. En la segunda mitad de la década de los setenta los avances científicos y el descubrimiento de nuevas etiologías de síndromes infecciosos, motivaron un interés en el estudio de nuevas moléculas de macrólidos.

Desde que se descubrió la eritromicina, a partir de un cultivo de *Streptomyces erythaeus*, los macrólidos han sido ampliamente utilizados como alternativa a los β -lactámicos en el tratamiento de infecciones por gram positivos. Son considerados fármacos de segunda elección en las infecciones de vías respiratorias superiores, otorrinolaringológicas y otros cuadros infecciosos. Se clasifican en función del número de elementos contenidos en el anillo macrocíclico, así, aparecen anillos de 14, 15 y 16 miembros.

La azitromicina es el primer miembro de una nueva clase de antimicrobianos denominados azálidos derivados de la eritromicina y presenta mayor estabilidad en medio ácido. Esta molécula está constituida por un anillo de 15 átomos a diferencia de la eritromicina que está constituida por 14 átomos. Carece del grupo ceto del carbono nueve y se incorpora un nitrógeno entre los carbonos nueve y diez (118).

MECANISMO DE ACCION

Puesto que la azitromicina está dentro del grupo de los macrólidos se caracteriza

por inhibir la síntesis proteica de las bacterias al unirse de forma específica al sitio P (donador) de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Esta unión es reversible, pero para que se produzca es necesaria la presencia en dicha subunidad de dos proteínas L15 y L1 (el sitio de unión es común para el cloranfenicol y la clindamicina por lo que interfiere con la acción de estos antimicrobianos. La ocupación de este lugar por el macrólido impide la translocación, mediante la cual, la cadena de aminoácidos en formación unida al t-RNA pasa desde el sitio aceptor (A) al sitio donador (D), impidiendo con ello la progresión del siguiente codón del m-ARN.

El efecto de estos antimicrobianos puede ser bacteriostático o bactericida según la especie bacteriana sobre la que actúe, de la concentración del antibiótico, de la densidad del inóculo y de la fase de crecimiento en que se encuentren las bacterias.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La azitromicina presenta una gran actividad frente a bacterias gram positivas, además es mucho más activa “in vitro” que los otros macrólidos frente a algunos gram negativos, enterobacterias. También es activa frente a patógenos intracelulares y presenta resistencia cruzada con microorganismos resistentes a eritromicina.

5.5. KANAMICINA

Los aminoglucósidos constituyen un grupo de antimicrobianos de gran importancia por su actividad sobre enterobacterias y gram negativos que frecuentemente presentan resistencia a otros antibióticos.

La estreptomina fue el primer aminoglucósido obtenido en 1944 a partir de *Streptomyces griseus*, trece años después se aisló la kanamicina de una cepa de *S.kanamyceticus* en Japón (119). Químicamente los aminoglucósidos están formados por un anillo aminociclitol derivado del inositol, al que se le une por enlaces glicosídicos dos o más azúcares con o sin grupos amino. Aunque la relación estructura actividad no se conoce completamente se sabe que al modificar algunos grupos hidroxilo y amino se produce pérdida de la actividad bacteriana.

La kanamicina es un aminoglucósido muy estable que corresponde al grupo de la 2-dexosi-estreptamina (como anillo aminociclitol). La molécula está compuesta por la desoxiestreptamina a la que se le unen aminoazúcares en la posición cuatro y seis por enlaces glucosídicos, quedando libre el grupo hidroxilo en la posición cinco (120).

MECANISMO DE ACCION

La kanamicina inhibe la síntesis proteica y produce la lectura errónea del código genético a nivel ribosomal por unirse a las dos subunidades del ribosoma 30S y 50S. Presenta un marcado efecto bactericida sobre las bacterias en fase de crecimiento.

Los aminoglucósidos en general, al ser compuestos muy polares pasan con dificultad las membranas por simple difusión pasiva, por eso, para acceder a su lugar de acción es necesario que se establezcan puntos de unión con la membrana celular por enlace iónico y a continuación el paso a través de la membrana y posteriormente al ribosoma se realiza por procesos dependientes de energía que se producen en condiciones de aerobiosis (requisito indispensable para ejercer su acción).

Esta inhibición de la síntesis proteica o la síntesis de proteínas anormales, no son mecanismos suficientes para explicar su acción bactericida, teniendo en cuenta que otros antibióticos también inhiben la síntesis de proteínas y solo producen efectos bacteriostáticos, se sugieren como mecanismos adicionales la alteración de la membrana citoplasmática con salida de elementos intracelulares y alteración en el metabolismo y respiración celular, además de otros posibles mecanismos.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La kanamicina es activa frente a bacterias gram negativas aerobias como *Pseudomonas aeruginosa* y aunque existen antimicrobianos de actividad similar, los aminoglucósidos siguen siendo imprescindibles en el tratamiento de infecciones graves por esta bacteria. Son poco sensibles a las bacterias gram positivas salvo para *S. aureus*.

5.6. NORFLOXACINO

La importancia de las quinolonas ha ido progresivamente en aumento desde la aparición del primer miembro del grupo, el ácido nalidíxico. Se sintetizó en 1962 y se introdujo ese mismo año como quimioterápico sintético. Era un derivado de la 1,8 naftiridina, que junto con el ácido oxolínico, el ácido pipemidínico y la cinoxacino sus aplicaciones estaban limitadas a infecciones urinarias y digestivas. El grupo cobró una nueva dimensión con la introducción de las nuevas 4- quinolonas o fluorquinolonas (121,122); se caracterizan por tener un átomo de flúor en posición seis y un grupo piperacínico en posición siete. Presentan un espectro de acción mucho mayor que las anteriores resultando útiles en infecciones de diferentes tejidos.

Norfloxacinó es una fluorquinolona sintetizada a partir del ácido pipemídico, de un amplio espectro de acción. Su estructura química corresponde a 1-etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperacínil)-3-quinolincarbónico.

MECANISMO DE ACCION

Considerando que norfloxacinó es una fluorquinolona, actúa inhibiendo de manera específica la actividad de la DNA-girasa al interactuar con su subunidad A. Esta enzima es mil veces más sensible a la acción inhibidora de las quinolonas que otras topoisomerasas tipo II de las células de mamíferos; de tal modo que al interactuar el fármaco con ella inhibe la formación de superhélices del DNA bacteriano.

La actividad de esta fluorquinolona es superior a la del ácido nalidíxico, la causa puede deberse a diferencias en la penetrabilidad a través de la membrana bacteriana o a diferencias en las posibilidades de fijación en los sitios activos. Esto permite obtener "in vivo" niveles plasmáticos útiles para infecciones de diversos órganos y no sólo de las vías urinarias.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Es mucho más activa que las quinolonas de la primera generación, su espectro

es más amplio y se extiende a más gérmenes gram negativos que la anteriores y a gram positivos.

5.7. TEICOPLANINA

En los últimos años las bacterias gram positivas se han convertido en las responsables de múltiples y graves infecciones que comprometen la vida del paciente. Esto se pone de manifiesto por diversos estudios que nos alertan de la enorme relevancia que están alcanzando estos microorganismos. La aparición de múltiples resistencias frente a distintos microbianos hace necesario el empleo de glicopéptidos, tales como vancomicina y teicoplanina, como recurso terapéutico a pesar de sus efectos secundarios adversos (123).

La teicoplanina es un glicopeptido producido por *Actynoplanes teichomyceticus* que presenta una estrecha analogía estructural con la vancomicina, antibiótico con el cual comparte similares características. Se diferencia en que su semivida es más larga, permitiendo una sola administración al día.

MECANISMO DE ACCION

Inhibe la síntesis del peptidoglicano al impedir la polimerización del complejo lípido-fosfodisacárido-pentapéptido en la segunda fase de formación de la pared celular, acumulandose los compuestos intermediarios unidos a la membrana. También puede actuar secundariamente alterando la permeabilidad celular e inhibiendo selectivamente la síntesis del RNA. Presenta actividad bactericida en fase activa de crecimiento bacteriano.

5.8. CLINDAMICINA

Pertenece, junto a la lincomicina, al grupo de las lincosamidas y se caracterizan por poseer un aminoácido unido a un azúcar.

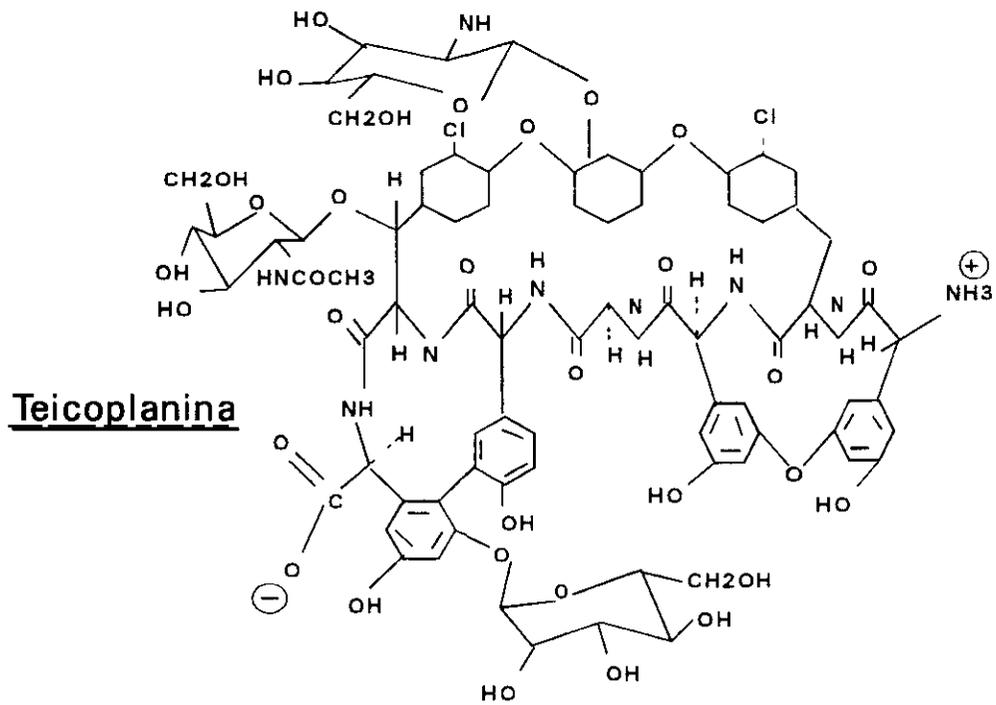
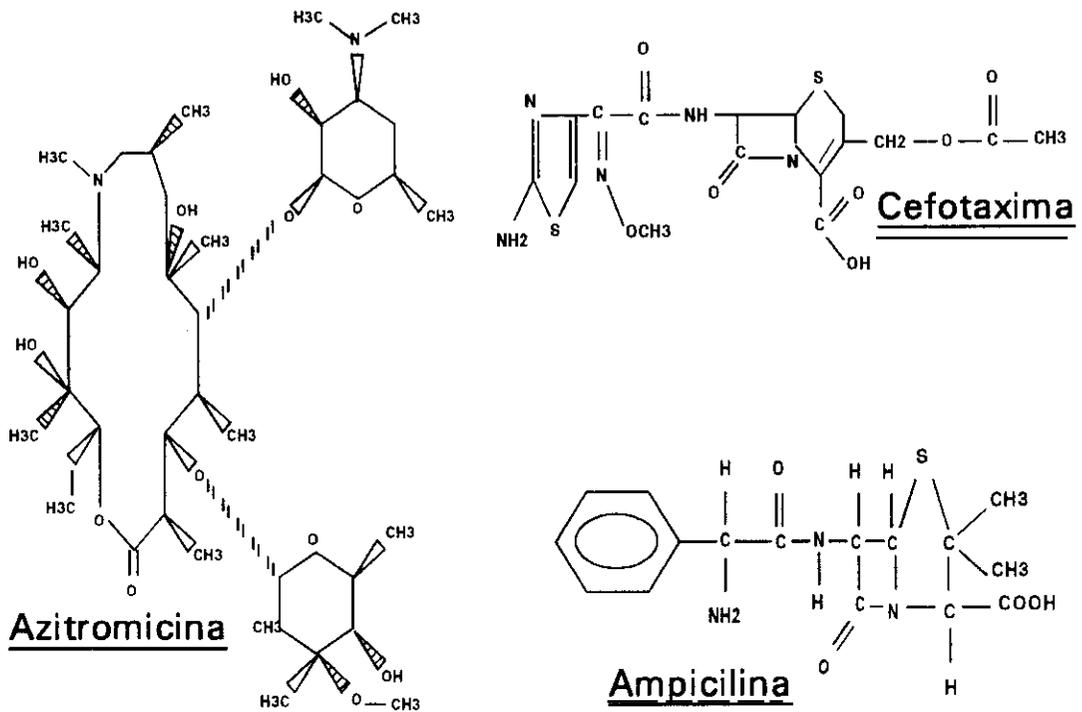
La clindamicina es un derivado semisintético de la lincomicina, más potente que ésta, se absorbe mejor por vía oral e induce en menor grado colitis asociada al uso de antibacterianos. Por lo que se emplea con mucha mayor frecuencia que la lincomicina. Corresponde a la 7-cloro-7-desoxi-lincomicina (124).

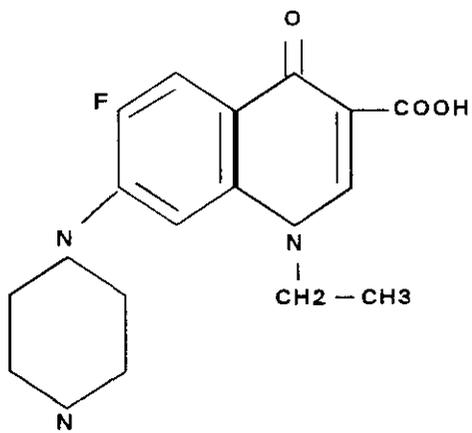
MECANISMO DE ACCION

Inhibe la síntesis proteica, uniéndose a la subunidad 50S de los ribosomas en los mismos receptores que la eritromicina y el cloranfenicol, parece ser que inhibe la peptidiltransferasa, interfiriendo en principio la unión del sustrato aminoacil-t-RNA al sitio A de la subunidad ribosómica 50S. Es bactericida a elevadas concentraciones y bacteriostático a concentraciones terapéuticas.

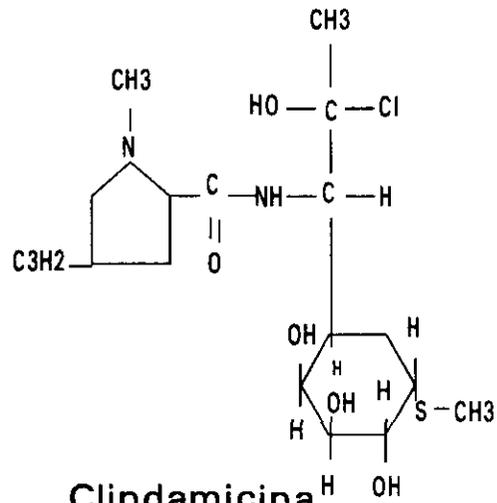
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La clindamicina es muy activa frente a bacterias anaerobias tanto gram positivas como gram negativas, también es activa frente a bacterias gram positivas como estreptococos, estafilococos y *Corynebacterium diphtheriae*.

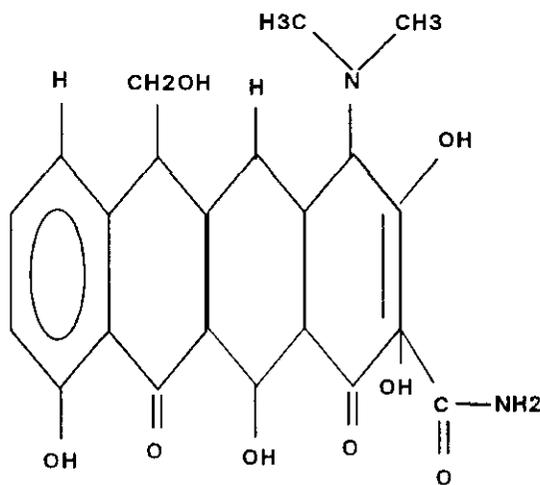




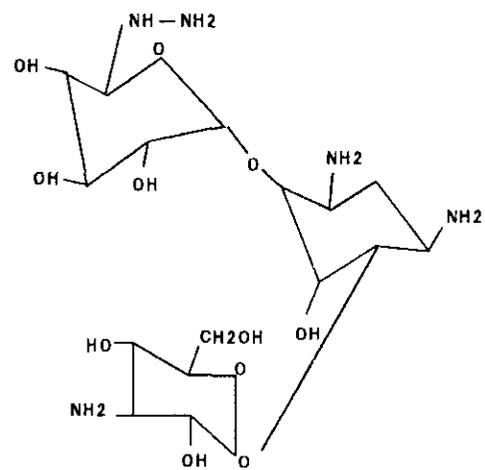
Norfloxacin



Clindamicin



Tetracycline



Kanamycin

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

La sepsis relacionada con catéteres y biomateriales es una infección nosocomial de carácter agudo cada vez más frecuente como consecuencia del gran uso de estos dispositivos intravasculares.

S.epidermidis y *s.aureus* son los principales patógenos aislados en dichas infecciones. Se ha comprobado que las proteínas plasmáticas del hospedador pueden influir favoreciendo la adhesión y posterior colonización e infección.

La capacidad de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos de interferir con la adhesión microbiana nos lleva a proponer los siguientes objetivos para este trabajo:

1-Analizar el papel de la fibronectina y de las proteínas plasmáticas en la adherencia de *S.epidermidis* y *s.aureus* a catéteres de teflón y vialón.

2-Estudiar la influencia de algunos parámetros como la temperatura, tiempo de incubación e inóculo bacteriano sobre la adherencia estafilocócica a catéteres.

3-Cuantificar los efectos que producen concentraciones subinhibitorias de distintos antimicrobianos en la adherencia de *S.epidermidis* y *s.aureus* a catéteres de teflón y vialón preincubados o no con fibronectina purificada o plasma.

III. MATERIALES Y METODOS

1. ASPECTOS GENERALES

1.1. CATETERES

Se utilizaron catéteres de dos materiales diferentes :

-Vialón (Insyte) : Material plástico desarrollado exclusivamente para uso médico, es un polímero de alta densidad que se ablanda a temperatura corporal y flota dentro del vaso.

-Teflón (Terumo) : material plástico de politetrafluoroetileno.

Las medidas de ambos catéteres fueron iguales, presentando una longitud de 25 milímetros por un diámetro de 0.8 milímetros.

1.2. MICROORGANISMOS

Se ensayaron dos cepas de *S.aureus* y dos cepas de *S.epidermidis*:

-*S.aureus*: ATCC 25923

-*S.aureus*: Aislado clínico de hemocultivo (Hospital Universitario San Carlos. Madrid).

-*S.epidermidis*: ATCC 12228

-*S.epidermidis*: Aislado clínico de hemocultivo (Hospital Universitario San Carlos. Madrid).

Estas cepas se conservaron a -20°C en leche desnatada. Para su uso se hicieron siembras y subcultivos de mantenimiento cada dos o tres días en placas de agar Müller-Hinton incubándose en estufa (Heraeus) a 37°C de 18 a 24 horas.

1.3. ANTIMICROBIANOS

Se emplearon ocho antibióticos frente a las cuatro cepas a estudiadas:

- Ampicilina (Beecham)
- Cefotaxima (Roussel)
- Teicoplanina (Marion Merrell Dow)
- Clindamicina (Upjohn)
- Azitromicina (Pfizer)
- Kanamicina (Bristol-Myers)
- Tetraciclina (Pfizer)
- Norfloxacino (Merck Sharp & Dohme)

Estos antimicrobianos fueron facilitados por los correspondientes laboratorios en forma de polvo valorado y las diluciones se realizaron según las indicaciones de la casa comercial. Posteriormente se distribuyeron en alícuotas de 1 ml y se conservaron a -20°C. Para su utilización se descongelaron el mismo día del ensayo, desechándose el antimicrobiano sobrante.

1.4. FIBRONECTINA HUMANA

Se utilizó fibronectina humana purificada mediante cromatografía (Sigma) y liofilizada. La suspensión de fibronectina se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Este liofilizado se reconstituyó con agua destilada esteril y se prepararon alícuotas de distinta concentración (500, 100 y 25 µg/ml). Estas se congelaron a -20°C y se utilizaron una sola vez tras su descongelación para no alterar sus propiedades..

1.5. ANTISUERO

Se empleó antisuero antifibronectina humana suministrado por Behring con el fin de retirar del plasma y del suero la fibronectina existente. El antisuero está constituido por anticuerpos específicos de origen animal obtenidos por inmunización de conejos con fibronectina humana, de tal forma que al ponerlo en contacto con plasma o suero la fibronectina que contienen es inactivada por una reacción inmunoquímica con estos anticuerpos y posteriormente es retirada por centrifugación.

Estos antisueros se conservaron a 4°C.

1.6. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS

Las concentraciones mínimas inhibitorias de los distintos antimicrobianos frente a las cepas ensayadas fueron determinadas mediante macrodilución en tubos:

Las bacterias fueron añadidas a series de diluciones dobles del antimicrobiano preparadas en caldo Müller-Hinton (Oxoid), en presencia de un control de crecimiento.

La CMI se estableció como la concentración de antibiótico que no permitió el crecimiento macroscópico (turbidez) de las bacterias tras 18-24 horas de incubación en estufa a 37°C.

1.7. PREPARACION DE LAS BACTERIAS PARA LOS ENSAYOS DE ADHESION

Para ello, una colonia de una placa de agar Müller-Hinton (Oxoid) se inoculó en 50 ml de caldo Müller-Hinton y se cultivó a 37°C con 150 agitaciones por minuto.

Las bacterias en cultivo se cogieron en fase logarítmica y se depositaron por centrifugación (Centrífuga Mod. Meditronic) a 3500 revoluciones por minuto (rpm)

durante 15 minutos. A continuación se lavaron 3 veces con Buffer fosfato salino (PBS) de BioMerieux de pH: 7.2-7.3 para eliminar restos del medio de cultivo y se prepararon suspensiones bacterianas de 10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro (Ufc/ml) a partir de una suspensión de 10^8 UFC/ml que según las determinaciones espectrofotométricas corresponden a una absorbancia de 0.3 a 580 nm. (Espectrofotómetro Hitachi Mod. U-1100).

1.8. MEDIOS DE INCUBACION DEL CATETER

Los catéteres fueron incubados en distintos medios:

A- Plasma pobre en plaquetas (ppp) y suero correspondiente:

Se preparó un “pool” de plasma de voluntarios sanos una hora antes de los experimentos, para ello, la sangre fue recogida en :

1-Tubo citratado (plasma) que se centrifugó durante 10-15 min a 1500 revoluciones por minuto (rpm).

2- Tubo seco (suero) que se dejó reposar a temperatura ambiente el tiempo suficiente para la formación del coágulo de fibrina y después se separó del suero mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10-15 min.

B- Plasma tratado (Pt) y el suero tratado (St) correspondiente:

Para eliminar la fibronectina del suero y el plasma una vez obtenidos se incubaron con cantidades adecuadas de antisuero durante 15 min a 37°C y después los inmunocomplejos formados fueron precipitados mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 min.

C- Soluciones de fibronectina.

D- PBS

1.9 PROCESO DE ADSORCION DE PROTEINAS AL CATETER

Cada cateter se incubó durante un periodo de una hora con 1 ml de una solución de fibronectina purificada de 100 µg/ml, con plasma, suero, plasma tratado (plasma sin fibronectina), suero tratado (suero sin fibronectina) o PBS, según correspondiese, a 37°C y a 150 ag./min . Posteriormente se lavó tres veces con PBS para eliminar los restos del líquido de incubación y de este modo impedir que interfiriese en los ensayos de adhesión.

1.10 ENSAYO ESTANDAR DE ADHESION AL CATETER

Al catéter previamente incubado con fibronectina, plasma, suero, Pt , St o PRS, según correspondiese, se le añadió 1 ml de suspensión bacteriana de 10⁷UFC/ml y se incubó durante una hora a 37°C a 150 agitaciones por minuto. A continuación se recogió la suspensión y se lavó el catéter con PBS frío (4°C) durante 10 min a 150 ag./min para parar la reacción y arrastar las bacterias no adheridas que hayan podido quedar depositadas en el catéter, el líquido de lavado se recogió en la suspensión bacteriana previamente retirada. Posteriormente se hizo recuento en placa de las bacterias no adheridas (existentes en el lavado y la suspensión). Se dedujo el número de baterias adheridas y se calculó los porcentajes de adhesión mediante la siguiente formula:

$$\%Adhesión = \frac{(A-B) \times 100}{A}$$

-A: N° de bacterias control

-B: N° de bacterias en el sobrenadante

2. INFLUENCIA DE LOS PARAMETROS EN LA ADHERENCIA BACTERIANA AL CATETER PREVIAMENTE INCUBADO CON PLASMA

2.1. EFECTO DEL INOCULO BACTERIANO

Para ello, se preparó suspensiones de *S. aureus* de distintas concentraciones y con cada una de estas suspensiones se siguió el ensayo estandar de adhesión calculandose posteriormente el porcentaje de adhesión obtenido.

2.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se prepararon cuatro series de reacciones siguiendo el ensayo de adhesión pero a temperaturas de incubación diferentes:

4°C, 26°C, 37°C, 42°C

2.3. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION CON EL PLASMA

Se valoró la influencia del tiempo de incubación del catéter con el plasma. El ensayo de adhesión se realizó habiendo variado previamente el tiempo de incubación con el plasma de 30 min a 120 min. Posteriormente se dedujo el número de bacterias adheridas y se procedió a determinar los porcentajes de adhesión.

2.4 EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION CON LAS BACTERIAS

Se valoró la influencia del tiempo de incubación de las bacterias en la adhesión al catéter de éstas.

El ensayo de adhesión se realizó variando el tiempo de incubación con las bacterias de 30 min a 120 min. Posteriormente se dedujo el número de bacterias adheridas se procedió a determinar los porcentajes de adhesión.

3. EFECTO DEL PLASMA, SUERO, PLASMA TRATADO Y SUERO TRATADO EN LA ADHERENCIA DE *S.aureus* AL CATETER

Con este fin se incubó previamente el catéter con plasma, suero, Pt y St durante una hora, a 37°C y a 150 ag./min realizando a continuación el ensayo de adhesión. Posteriormente se dedujo el número de bacterias adheridas, seguido del porcentaje de adhesión.

4. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FN PURIFICADA EN LA ADHERENCIA DE *S.aureus* AL CATETER

Para ello los catéteres fueron previamente incubados con suspensiones de distinta concentración de fibronectina purificada que oscilaban entre 200 μ /ml y 0.3 μ /ml. Después se realizó el ensayo de adhesión, calculándose los porcentajes de adhesión tras determinar el número de bacterias adheridas.

5. CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANO

5.1. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CRECIMIENTO

Una vez determinada la CMI del antimicrobiano frente a la cepa ensayada, se prepararon medios de caldo Müeller-Hinton con 1/2, 1/4, 1/8 CMI respectivamente y sin antimicrobiano. A continuación se añadió una suspensión bacteriana tal, que ofreció una concentración final de 5×10^5 UFC/ml y se incubaron a 37°C y 150 ag./min hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

5.2. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR ESPECTROFOTOMETRIA

Teniendo en cuenta que concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos producen cambios morfológicos en las bacterias dando lugar a formas filamentosas o a agregados bacterianos (según el antimicrobiano usado) y esto puede provocar errores en el recuento de bacterias en placa por no corresponder el número de colonias con el número real de bacterias vivas sembradas, se comprobó, con todos los antimicrobianos, que el inóculo bacteriano utilizado para el ensayo de adhesión correspondía a un número de bacterias tratadas idéntico al número de bacterias control crecidas en medio sin antibiótico.

Para determinar la influencia de las concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos sobre la curva de crecimiento de *S.aureus* se midió a partir de la hora cero y cada hora la turbidez de la suspensión bacteriana en crecimiento con el fin de determinar las densidades ópticas de los cultivos crecidos en diferentes concentraciones de antimicrobiano y del cultivo control, ya que estas densidades ópticas mantienen una

determinar las densidades ópticas de los cultivos crecidos en diferentes concentraciones de antimicrobiano y del cultivo control, ya que estas densidades ópticas mantienen una relación directa con el número de bacterias en el medio.

A continuación se trazaron las curvas de crecimiento correspondientes a los distintos medios con y sin antimicrobiano. Según éstas, se observó la influencia del antimicrobiano sobre el crecimiento bacteriano.

5.3. PREPARACION DE LAS BACTERIAS PARA LOS EXPERIMENTOS

Según las determinaciones de las curvas de crecimiento bacteriano en medios de cultivo con o sin antibiótico, se seleccionaron las bacterias en fase logarítmica de crecimiento, presentando una densidad óptica de 0.3 a 0.4. A continuación se lavaron tres veces con PBS estéril para eliminar los restos del antimicrobiano y se prepararon en PBS suspensiones bacterianas de 10^7 UFC/ml a partir de los medios con y sin antibiótico para los ensayos de adhesión.

5.4. ENSAYO DE ADHESION

Se realizó de igual forma que el ensayo estandar de adhesión pero utilizando bacterias crecidas en medios de cultivo que contenían distintas concentraciones de antimicrobiano y las bacterias control que fueron crecidas en medio sin antimicrobiano.

6. METODO ESTADISTICO

Todos los ensayos fueron realizados al menos cinco veces. Posteriormente se procedió a calcular las medias aritméticas y las desviaciones estándar de los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión al catéter.

IV. RESULTADOS

1. ADHERENCIA DE *S.aureus* A CATETERES DE VIALON Y TEFLON

Las dos cepas ensayadas de *S.aureus* presentan diferencias en la adhesión según sea un tipo de catéter u otro. En la tabla 1 se puede apreciar que la adhesión, cuando se ha incubado el catéter con PBS, es mayor en la cánula de vialón que en la de teflón. Por el contrario cuando ha sido incubado con fibronectina o con plasma la adhesión es mayor para el teflón que para el vialón.

También podemos apreciar que siempre hay más adhesión al catéter cuando éste está incubado con plasma o fibronectina que con PBS.

% (SD) DE ADHESION DE <i>S.aureus</i> (ATCC 25923) A DISTINTOS TIPOS DE CATETER:			
	PBS	FN	PLASMA
TEFLON	19.4 (0.3)	65.7 (0.2)	92.5 (0.4)
VIALON	25.4 (0.4)	39.1 (0.5)	86.6 (0.7)

Tabla 1: Adhesión de *S.aureus* (ATCC 25923) a catéteres de vialón y teflón.

% (SD) DE ADHESION DE <i>S.aureus</i> (A. CLINICO) A DISTINTOS TIPOS DE CATETER:			
	PBS	FN	PLASMA
TEFLON	45.2 (0.5)	71.2 (0.2)	95.1 (0.6)
VIALON	38.4 (0.3)	74.7 (0.4)	90.8 (0.5)

Tabla 2: Adherencia de *S.aureus* (aislado clínico) a catéteres de vialón y teflón.

2. FACTORES QUE AFECTAN LA ADHERENCIA *S.aureus* AL CATETER

2.1. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE ADHESION AL CATETER INCUBADO CON PLASMA, Pt, SUERO Y St.

Tras la exposición de *S.aureus* (aislado clínico y ATCC 25923) a catéteres de vialón previamente incubados con distintos medios, se puede apreciar una diferencia de adhesión (tabla 3 y figura 1). Aparece un máximo cuando el catéter ha sido incubado con plasma y un mínimo cuando lo ha sido con suero tratado.

Generalmente con el aislado clínico se observa un aumento de adhesión ligeramente mayor con respecto a la cepa ATCC 25923, salvo en el caso del suero donde la cepa ATCC 25923 presentó una adherencia de 47.8% y el aislado clínico de 57.2%.

En ambas cepas la adhesión del catéter incubado con plasma o con suero es siempre mayor que cuando se incubaba respectivamente con plasma o suero tratado.

% (SD) DE ADHESION AL CATETER PREVIAMENTE INCUBADO CON:					
<i>S.aureus</i>	PBS	PLASMA	Pt	SUERO	St
ATCC 25923	26.0 (0.3)	88.7 (0.6)	42.5 (0.4)	47.8 (0.5)	3.0 (0.2)
A. Clínico	39.0 (0.7)	92.0 (0.5)	48.0 (0.3)	57.2 (0.4)	11.0 (0.5)

Tabla 3: Efecto de la previa incubación del catéter con plasma, plasma tratado, suero y suero tratado en la adhesión de *S.aureus*.

2.2. DETERMINACION DE LA ADHERENCIA AL CATETER INCUBADO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FIBRONECTINA

Según se puede apreciar en la tabla 4 y gráfica 2, la adhesión de *S.aureus* al catéter es dependiente de la concentración de fibronectina con la que se ha incubado el catéter hasta llegar a una concentración de 12.5 $\mu\text{g/ml}$, a partir de la cual es prácticamente invariable.

El aislado clínico presenta una mayor adhesión, frente a una misma concentración, que la cepa ATCC 25923, desde una concentración de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ hasta los 200 $\mu\text{g/ml}$, en cambio a partir de 6.2 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0.3 $\mu\text{g/ml}$ la diferencia parece ser despreciable.

% (SD) DE ADHESION DE <i>S.aureus</i> AL CATETER INCUBADO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/ml}$) DE FIBRONECTINA PURIFICADA:										
<i>S.aureus</i>	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
	$\mu\text{g/ml}$									
ATCC	47.4 (0.5)	47.4 (0.3)	47.2 (0.7)	46.9 (0.2)	46.7 (0.4)	32.3 (0.6)	12.5 (0.4)	17.2 (0.4)	9.02 (0.7)	4.2 (0.6)
Aislado Clinico	70.7 (0.5)	68.3 (0.2)	61.9 (0.6)	61.5 (0.4)	61.3 (0.2)	38.4 (0.3)	20.1 (0.2)	16.8 (0.8)	11.4 (0.7)	2.8 (0.5)

Tabla 4: Efecto de la incubación del catéter con distintas concentraciones de fibronectina en la adhesión de *S.aureus*.

2.3. ESTUDIO DE DISTINTOS PARAMETROS EN LA AHDESION DE *S.aureus*

2.3.1. Efecto del inóculo

En las tablas 5 y 6 podemos apreciar los porcentajes de adhesión al catéter incubado con PBS y plasma en presencia de distintos inóculos de *S.aureus*.

Los resultados de las dos cepas son comparables, presentando siempre el aislado clínico una mayor adhesión. La cepa ATCC 25923 presenta un aumento de adhesión de un inóculo de 10^5 a uno de 10^9 , ya que en el caso del catéter incubado con el plasma vemos que con un inóculo de 10^5 presenta una adhesión de un 52% que aumenta hasta un 86.3% cuando el inóculo es de 10^9 .

% (SD) DE ADHESION DE <i>S.aureus</i> (ATCC 25923) AL CATETER INCUBADO CON:		
INOCULO (UFC/ml)	PBS	PLASMA
10^9	35.4 (0.8)	89.8 (0.7)
10^8	28.4 (0.7)	88.9 (0.6)
10^7	27.6 (0.3)	86.3 (0.4)
10^6	25.8 (0.5)	73.0 (0.5)
10^5	25.0 (0.6)	52.0 (0.8)

Tabla 5: Efecto del inóculo en la adhesión de *S.aureus* ATCC 25923 al catéter.

% (SD) DE ADHESION DE <i>S.aureus</i> (A. CLINICO) AL CATETER INCUBADO CON:		
INOCULO (Ufc/ml)	PBS	PLASMA
10⁹	41.0 (0.5)	92.4 (0.1)
10⁸	39.8 (0.7)	88.0 (0.3)
10⁷	39.1 (0.2)	85.1 (0.2)
10⁶	36.4 (0.8)	81.2 (0.6)
10⁵	32.3 (0.3)	79.7 (0.6)

Tabla 6: Efecto del inóculo en la adhesión de *S.aureus* (aislado clínico) al catéter.

2.3.2. Efecto de la Temperatura

La temperatura de incubación de las bacterias afectó su adhesión. En las tablas 7 y 8, que representan los porcentajes de adhesión de la cepa de *S.aureus* ATCC 25923 y del aislado clínico respectivamente se puede apreciar una adhesión máxima a los 37°C y una mínima a los 4°C. Con una temperatura de 42°C, cuando el catéter es incubado con PBS la adhesión es similar a la temperatura de 37°C, por el contrario, incubando con plasma la adhesión se ve disminuída marcadamente con respecto a la obtenida a los 37°C y 26°C.

% (SD) DE ADHESION DE <i>S.aureus</i> (ATCC 25923) AL CATETER INCUBADO A DISTINTAS TEMPERATURAS:				
	42°C	37°C	26°C	4°C
PBS	23.6 (0.2)	5.8 (0.5)	3.8 (0.6)	18.1 (0.4)
PLASMA	28.9 (0.5)	0.8 (0.7)	8.2 (0.3)	17.5 (0.4)

Tabla 7: Efecto de la temperatura en la adherencia de U ATCC 25923 al catéter.

% (SD) DE ADHESION DE <i>S.aureus</i> (A. CLINICO) AL CATETER INCUBADO A DISTINTAS TEMPERATURAS:				
	42°C	37°C	26°C	4°C
PBS	27.5 (0.5)	33.1 (0.5)	28.5 (0.2)	20.4 (0.5)
PLASMA	31.2 (0.2)	81.5 (0.4)	78.8 (0.5)	20.6 (0.4)

Tabla 8: Efecto de la temperatura en la adherencia de U aislado clínico al catéter.

2.3.3. Efecto del Tiempo de Incubación con Plasma y con Bacterias

Las tablas 9 y 10 representan el porcentaje de adhesión de *S.aureus* ATCC 25923 y del aislado clínico respectivamente según el tiempo de incubación del catéter con el plasma y con las bacterias.

Podemos observar que cuando la incubación con bacterias y con el plasma es de 30 minutos la adhesión es considerablemente menor que si se aumenta el tiempo de exposición del

plasma a 60 ó 120 minutos manteniendo fijo a 30 el tiempo de incubación con las bacterias. Por otro lado, si aumentamos el tiempo de exposición de las bacterias a 60 minutos no influye tanto el tiempo de exposición del catéter al plasma. Lo mismo ocurre al aumentar el tiempo de incubación con las bacterias a 120 minutos donde aparece un ligero aumento de los porcentajes de adhesión con el tiempo de exposición al plasma.

Si comparamos la adhesión de las bacterias variando su tiempo de incubación de 60 a 120 minutos vemos que cuando el catéter ha sido incubado con plasma hay un ligero aumento, en cambio cuando es incubado con PBS no se observa aumento de adhesión

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.aureus</i> (ATCC 25923) VARIANDO EL TIEMPO DE INCUBACION CON CON EL PLASMA-PBS Y CON LAS BACTERIAS:						
BACTERIAS	30 min		60 min		120 min	
	PBS	PLASMA	PBS	PLASMA	PBS	PLASMA
30 min	11.0 (0.5)	31.0 (0.8)	11.6 (0.3)	65.3 (0.2)	13.1 (0.8)	68.0 (0.4)
60 min	25.0 (0.2)	75.0 (0.6)	28.6 (0.3)	79.0 (0.4)	24.0 (0.6)	80.2 (0.6)
120 min	25.0 (0.7)	78.0 (0.4)	24.0 (0.5)	81.0 (0.5)	23.2 (0.3)	86.4 (0.3)

Tabla 9: Efecto del tiempo de incubación con el plasma y con *S.aureus* ATCC 25923 en su adhesión al catéter.

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.aureus</i> (A.CLINICO) AL CATETER VARIANDO EL TIEMPO DE INCUBACION CON CON EL PLASMA-PBS Y CON LAS BACTERIAS:						
BACTERIAS	30 min		60 min		120 min	
	PBS	PLASMA	PBS	PLASMA	PBS	PLASMA
30 min	15.2 (0.9)	37.5 (0.7)	17.6 (0.5)	72.1 (0.8)	20.1 (0.5)	70.8 (0.2)
60 min	36.4 (0.5)	81.0 (0.2)	38.4 (0.7)	84.3 (0.6)	38.2 (0.1)	89.5 (0.5)
120 min	30.2 (0.8)	82.3 (0.4)	32.2 (0.5)	86.4 (0.4)	32.0 (0.3)	91.2 (0.7)

Tabla 10: Efecto del tiempo de incubación con el plasma y con *S.aureus* (aislado clínico) en su adhesión al catéter.

3. EFECTO DE CONCENTRACIONES SUB-INHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS EN LA ADHESION DE *S.aureus* AL CATETER DE TEFLON Y VIALON

Las tablas 11-18 representan la influencia de las $\frac{1}{2}$ CMI de los distintos antimicrobianos en la adhesión de *S.aureus* (ATCC 25923 y aislado clínico) al catéter previamente incubado con PBS, fibronectina y plasma.

Las gráficas 7-14 recogen los porcentajes de adhesión de las $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{8}$ CMI de los antimicrobianos frente al catéter incubado con fibronectina y PBS.

Los mayores efectos se aprecian con la $\frac{1}{2}$ CMI y van disminuyendo conforme se reduce la concentración de antimicrobiano.

3.1. AMPICILINA

La concentración subinhibitoria de este antimicrobiano provocó un aumento de adhesión comparable en los dos tipos de catéteres, teflón y vialón. Aunque cuando el catéter fue incubado con PBS, en el caso del vialón (cepa ATCC 25923: 30.9%(control)-35.0%) el aumento fue menor que en el caso del teflón (cepa ATCC 25923: 21.5%(control)-58.4%).

Respecto a las cepas estudiadas, ambas presentaron un comportamiento similar con este antimicrobiano.

3.2. CEFOTAXIMA

Al igual que la ampicilina, la cefotaxima aumentó la adhesión en los dos tipos de catéteres pero de forma más marcada. Solo en los casos donde el porcentaje de adhesión era elevado (cepa ATCC 25923 Ampicilina/ Vialón / Plasma: 63.1%(control)-97.0% ; Cefotaxima/ vialón/plasma: 63.1% (control)-96.1%) no se precia un aumento muy marcado.

El aumento de adhesión presentado por el aislado clínico y la cepa ATCC 25923 fue comparable.

3.3. AZITROMICINA

Presentó un aumento de la adhesión tanto en el catéter de teflón como en el de vialón.

Considerando el catéter incubado con PBS generalmente se observó un aumento menor en la adhesión con respecto a los catéteres incubados con fibronectina o plasma.

El aislado clínico presentó una mayor adhesión con respecto a la cepa ATCC 25923 cuando el catéter fue incubado con plasma.

3.4. TEICOPLANINA

El comportamiento de la teicoplanina con los dos tipos de catéteres fue distinto:

-Con vialón disminuyó la adhesión.

-Con teflón también disminuyó la adhesión cuando el catéter se incubó con PBS, mientras que con el catéter previamente incubado con fibronectina o plasma la adhesión aumentó.

La cepa ATCC 25923 presentó un descenso o aumento de adhesión, según fuera el catéter de teflón o vialón respectivamente, más acusado que el aislado clínico cuando los catéteres fueron incubados con fibronectina o plasma (ATCC 25923 Vialón/ Fibronectina: 56.0%(control)-22.0% y aislado clínico Vialón/ Fibronectina: 73.2%(control)-61.4%).

3.5. NORFLOXACINO

Concentraciones bajas de este antimicrobiano provocaron una disminución en la adhesión de las dos cepas de *S.aureus* a los catéteres de teflón y vialón. Presentando un descenso mayor en el aislado clínico cuando el catéter fue incubado con PBS y por otro lado con la cepa ATCC 25923 el antimicrobiano apenas influyó en la adhesión (Teflón:21.5%(control)-20.1%).

El catéter de vialón incubado con fibronectina presentó una bajada de adhesión más marcada que con plasma en el aislado clínico (fibronectina: 72.5%(control)-51.2%; plasma: 68.5%(control)-61.0%).

3.6. TETRACICLINA

Su efecto implica un descenso de adhesión tanto en el catéter de vialón como de teflón.

En general este antimicrobiano afectó más al catéter incubado con fibronectina que con

plasma observándose el mayor descenso de adhesión con el aislado clínico cuando el catéter de vialón se incubó con fibronectina: 74.5%(control)-33.3%.

3.7. CLINDAMICINA

Al igual que la tetraciclina este antimicrobiano también provocó una disminución de la adhesión en ambos catéteres.

Con el catéter de teflón incubado con plasma se observó una bajada en la adhesión menor que en el caso del vialón en ambas cepas : aislado clínico (teflón: 75.0%(control)-68.0%; vialón: 68.5%(control)-41.7%) y ATCC 25923 (teflón: 60.8%(control)-55.9%; vialón: 63.1%(control)-17.2%).

3.8. KANAMICINA

La kanamicina entre todos los antimicrobianos utilizados fue el único que a bajas concentraciones no afectó de forma significativa la adherencia de *S.aureus* al catéter de teflón o vialón en ninguna de las dos cepas estudiadas.

% (SD) DE ADHESIÓN AL CATETER DE <i>S.aureus</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE AMPICILINA:							
		V I A L O N			T E F L O N		
		PBS	FN	PL	PBS	FN	PL
ATCC	Control	30.9(0.7)	65.0(0.2)	63.1(0.2)	21.5(0.4)	55.8(0.6)	60.8(0.6)
25923	Ampic.	35.0(0.5)	88.6(0.6)	97.0(0.3)	58.4(0.3)	79.4(0.2)	89.9(0.5)
Aislado	Control	40.2(0.5)	75.9(0.5)	68.5(0.5)	48.5(0.5)	72.3(0.5)	75.0(0.6)
Clinico	Ampic.	49.1(0.3)	97.3(0.4)	98.8(0.6)	75.2(0.4)	85.3(0.6)	89.3(0.4)

Tabla 11: Efecto de la ½ CMI de ampicilina sobre la adhesión de *S.aureus*

% (SD) DE ADHESIÓN AL CATETER DE <i>S.aureus</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE CEFOTAXIMA:							
		V I A L O N			T E F L O N		
		PBS	FN	PL	PBS	FN	PL
ATCC	Control	21.3(0.4)	57.0(0.6)	63.1(0.4)	21.5(0.3)	55.8(0.5)	60.8(0.2)
25923	Cefotax.	73.1(0.5)	81.3(0.5)	96.1(0.3)	61.6(0.3)	82.6(0.1)	85.8(0.3)
Aislado	Control	40.6(0.3)	74.3(0.2)	68.5(0.4)	48.5(0.7)	72.3(0.8)	75.0(0.4)
Clinico	Cefotax.	74.3(0.2)	96.6(0.4)	97.5(0.6)	81.3(0.4)	91.3(0.6)	88.3(0.4)

Tabla 12: Efecto de la ½ CMI de cefotaxima sobre la adhesión de *S.aureus*

% (SD) DE ADHESIÓN AL CATETER DE <i>S.aureus</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE AZITROMICINA:							
		V I A L O N			T E F L O N		
		PBS	FN	PL	PBS	FN	PL
ATCC	Control	26.3(0.6)	53.1(0.6)	63.2(0.2)	21.5(0.6)	55.8(0.4)	60.8(0.7)
25923	Azitro.	42.1(0.7)	68.2(0.1)	71.3(0.6)	27.0(0.4)	74.3(0.2)	78.9(0.3)
Aislado	Control	46.5(0.3)	73.5(0.6)	68.5(0.5)	48.5(0.9)	72.3(0.4)	75.0(0.2)
Clinico	Azitro.	53.5(0.4)	85.5(0.2)	89.0(0.4)	53.1(0.3)	87.1(0.6)	93.2(0.5)

Tabla 13: Efecto de la ½ CMI de azitromicina sobre la adhesión de *S.aureus*

% (SD) DE ADHESIÓN AL CATETER DE <i>S.aureus</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE TEICOPLANINA:							
		V I A L O N			T E F L O N		
		PBS	FN	PL	PBS	FN	PL
ATCC	Control	22.5(0.4)	56.0(0.3)	63.1(0.5)	21.5(0.3)	55.8(0.5)	60.8(0.2)
25923	Azitro.	19.5(0.5)	22.0(0.4)	28.5(0.6)	15.4(0.4)	73.9(0.4)	84.3(0.7)
Aislado	Control	47.8(0.2)	73.2(0.5)	68.5(0.4)	48.5(0.2)	72.3(0.6)	75.0(0.6)
Clinico	Azitro.	44.1(0.4)	61.4(0.4)	72.3(0.7)	31.1(0.7)	81.9(0.4)	80.2(0.4)

Tabla 14: Efecto de la ½ CMI de teicoplanina sobre la adhesión de *S.aureus*

% (SD) DE ADHESIÓN AL CATETER DE <i>S.aureus</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE NORFLOXACINO:							
		V I A L O N			T E F L O N		
		PBS	FN	PL	PBS	FN	PL
ATCC	Control	22.5(0.5)	47.0(0.3)	63.1(0.2)	21.5(0.4)	55.8(0.3)	60.8(0.4)
25923	Norflox.	19.4(0.4)	31.0(0.1)	23.9(0.2)	20.1(0.2)	44.5(0.5)	46.1(0.2)
Aislado	Control	43.0(0.2)	72.5(0.4)	68.5(0.4)	48.5(0.4)	72.3(0.4)	75.0(0.4)
Clinico	Norflox.	32.0(0.5)	51.2(0.1)	61.0(0.7)	35.0(0.3)	61.0(0.4)	60.8(0.2)

Tabla 15: Efecto de la ½ CMI de norfloxacinó sobre la adhesión de *S.aureus*

% (SD) DE ADHESIÓN AL CATETER DE <i>S.aureus</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE TETRACICLINA:							
		V I A L O N			T E F L O N		
		PBS	FN	PL	PBS	FN	PL
ATCC	Control	23.4(0.4)	48.0(0.4)	63.1(0.5)	21.5(0.1)	55.8(0.3)	60.8(0.2)
25923	Tetrac.	6.1(0.2)	13.0(0.7)	28.2(0.4)	11.5(0.3)	39.9(0.4)	49.2(0.2)
Aislado	Control	39.3(0.7)	74.5(0.6)	68.5(0.2)	48.5(0.9)	72.3(0.3)	75.0(0.7)
Clinico	Tetrac.	17.8(0.5)	33.3(0.4)	55.2(0.8)	23.0(0.4)	58.1(0.3)	65.2(0.3)

Tabla 16: Efecto de la ½ CMI de tetraciclina sobre la adhesión de *S.aureus*

% (SD) DE ADHESIÓN AL CATETER DE <i>S.aureus</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE CLINDAMICINA:							
		V I A L O N			T E F L O N		
		PBS	FN	PL	PBS	FN	PL
ATCC	Control	22.9(0.2)	48.7(0.3)	63.1(0.7)	21.5(0.6)	55.8(0.7)	60.8(0.6)
25923	Clinda.	10.1(0.6)	19.6(0.5)	17.2(0.4)	19.4(0.2)	37.5(0.3)	55.9(0.4)
Aislado	Control	48.2(0.5)	68.8(0.6)	68.5(0.3)	48.5(0.4)	72.3(0.5)	75.0(0.5)
Clinico	Clinda.	7.2(0.3)	25.4(0.2)	41.7(0.3)	20.0(0.8)	55.2(0.4)	68.0(0.8)

Tabla 17: Efecto de la ½ CMI de clindamicina sobre la adhesión de *S.aureus*

% (SD) DE ADHESIÓN AL CATETER DE <i>S.aureus</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE KANAMICINA:							
		V I A L O N			T E F L O N		
		PBS	FN	PL	PBS	FN	PL
ATCC	Control	24.5(0.5)	47.0(0.2)	63.1(0.6)	21.5(0.3)	55.8(0.7)	60.8(0.2)
25923	Kana.	23.1(0.5)	47.3(0.2)	47.5(0.4)	28.9(0.2)	54.6(0.3)	59.9(0.6)
Aislado	Control	41.3(0.8)	70.8(0.6)	68.5(0.3)	48.5(0.4)	72.3(0.4)	75.0(0.6)
Clinico	Kana.	40.7(0.4)	73.2(0.4)	69.5(0.2)	45.0(0.3)	74.2(0.5)	77.0(0.4)

Tabla 18: Efecto de la ½ CMI de kanamicina sobre la adhesión de *S.aureus*

4. ADHERENCIA DE *S. epidermidis* A CATETERES DE TEFLON Y VIALON

La tabla 19 presenta la adherencia de *S. epidermidis* ATCC 12228 y aislado clínico a los catéteres de teflón y vialón.

Los resultados nos muestran que las proteínas, tanto la fibronectina como otras proteínas plasmáticas, no proporcionan una diferencia de adhesión con respecto al catéter incubado con PBS. Tampoco se observó diferencias significativas de adherencia entre ambos tipos de materiales. La cepa ATCC 12228 presenta prácticamente la misma adhesión al catéter de teflón que al catéter de vialón (PBS: 23.8% y 22.1%). El aislado clínico presentó un ligero aumento de adhesión con el catéter de vialón respecto al de teflón. Con respecto a la cepa ATCC 25923, el aislado clínico presentó una mayor adhesión a ambos tipos de catéteres.

%(SD) DE AHDESION DE <i>S. epidermidis</i> A DOS TIPOS DE CATETERES INCUBADOS CON:						
	V I A L O N			T E F L O N		
	PBS	FN	PLASMA	PBS	FN	PLASMA
ATCC 25923	22.1 (0.3)	20.8 (0.2)	21.9 (0.6)	23.8 (0.4)	22.9 (0.3)	23.5 (0.3)
Aislado Clínico	40.1 (0.8)	40.0 (0.4)	39.2 (0.8)	35.1 (0.7)	34.9 (0.6)	36.0 (0.2)

Tabla 19: Adherencia de *S. epidermidis* a catéteres de vialón y de teflón.

5.EFECTO DE CONCENTRACIONES SUB-INHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA ADHESION DE *S.epidermidis* AL CATETER DE TEFLON Y VIALON

Las tablas 20-27 recogen los porcentajes de adhesión de *S.epidermidis* (ATCC 12228 y aislado clínico) crecido en presencia de las ½ CMI de los antimicrobianos.

Al igual que *S.aureus*, este microorganismo presentó diferencias de adhesión según el tipo de antimicrobiano empleado, aunque los efectos no siempre coinciden con aquellos observados con *S.aureus*:

-Los antimicrobianos que aumentaron la adhesión correspondieron a aquellos que actúan sobre la pared bacteriana como cefotaxima, ampicilina y teicoplanina. Presentando la mayor adhesión con la cefotaxima (34.3%) y la menor con la teicoplanina .

-Dentro de los antimicrobianos que disminuyeron la adhesión de *S.epidermidis* se encuentran los siguientes: tetraciclina, clindamicina, norfloxacino y azitromicina (a diferencia de *S.aureus* que con este antimicrobiano presentó un aumento en la adhesión). La mayor inhibición de la adhesión se observó con la clindamicina, seguida de la tetraciclina.

-La kanamicina no afectó la adhesión, obtniendose resultados similares a los encontrados con *S.aureus*.

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.epidermidis</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE AMPICILINA:			
		VIALON	TEFLON
ATCC 12228	Control	20.9 (0.2)	22.7 (0.5)
	Ampicilina	37.2 (0.5)	31.5 (0.4)
AISLADO CLINICO	Control	36.5 (0.4)	29.5 (0.2)
	Ampicilina	45.4 (0.4)	49.3 (0.8)

Tabla 20: Efecto de la ½ CMI de ampicilina en la adhesión de *S.epidermidis*

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.epidermidis</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE CEFOTAXIMA:			
		VIALON	TEFLON
ATCC 12228	Control	20.9 (0.4)	22.7 (0.4)
	Cefotaxima	45.5 (0.2)	57.0 (0.6)
AISLADO CLINICO	Control	36.5 (0.4)	29.5 (0.3)
	Cefotaxima	56.4 (0.6)	68.0 (0.5)

Tabla 21: Efecto de la ½ CMI de cefotaxima en la adhesión de *S.epidermidis*

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.epidermidis</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE AZITROMICINA:			
		VIALON	TEFLON
ATCC	Control	20.9 (0.2)	22.7 (0.7)
12228	Azitromicina	17.0 (0.4)	19.1 (0.6)
AISLADO	Control	36.5 (0.6)	29.5 (0.4)
CLINICO	Azitromicina	30.8 (0.2)	25.1 (0.3)

Tabla 22: Efecto de la ½ CMI de azitromicina en la adhesión de *S.epidermidis*

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.epidermidis</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE TEICOPLANINA:			
		VIALON	TEFLON
ATCC	Control	20.9 (0.3)	22.7 (0.3)
12228	Teicoplanina	23.3 (0.5)	26.5 (0.5)
AISLADO	Control	36.5 (0.6)	29.5 (0.5)
CLINICO	Teicoplanina	40.9 (0.2)	31.3 (0.4)

Tabla 23: Efecto de la ½ CMI de teicoplanina en la adhesión de *S.epidermidis*

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.epidermidis</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE NORFLOXACINO:			
		VIALON	TEFLON
ATCC	Control	20.9 (0.6)	22.7 (0.2)
12228	Norfloxacino	18.0 (0.4)	16.3 (0.6)
AISLADO	Control	36.5 (0.3)	29.5 (0.6)
CLINICO	Norfloxacino	19.8 (0.4)	13.2 (0.7)

Tabla 24: Efecto de la ½ CMI de norfloxacino en la adhesión de *S.epidermidis*

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.epidermidis</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE TETRACICLINA:			
		VIALON	TEFLON
ATCC	Control	20.9 (0.7)	22.7 (0.2)
12228	Tetraciclina	14.0 (0.2)	11.7 (0.4)
AISLADO	Control	36.5 (0.3)	29.5 (0.6)
CLINICO	Tetraciclina	22.5 (0.4)	18.5 (0.5)

Tabla 25: Efecto de la ½ CMI de tetraciclina en la adhesión de *S.epidermidis*

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.epidermidis</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE CLINDAMICINA:			
		VIALON	TEFLON
ATCC	Control	20.9 (0.2)	22.7 (0.3)
12228	Clindamicina	13.9 (0.3)	8.12 (0.5)
AISLADO	Control	36.5 (0.5)	29.5 (0.6)
CLINICO	Clindamicina	5.9 (0.8)	5.7 (0.4)

Tabla 26: Efecto de la ½ CMI de clindamicina en la adhesión de *S.epidermidis*

% (SD) DE ADHESION AL CATETER DE <i>S.epidermidis</i> CRECIDO EN PRESENCIA DE ½ CMI DE KANAMICINA:			
		VIALON	TEFLON
ATCC	Control	20.9 (0.3)	22.7 (0.3)
12228	Kanamicina	22.0 (0.6)	21.6 (0.6)
AISLADO	Control	36.5 (0.8)	29.5 (0.4)
CLINICO	Kanamicina	35.7 (0.2)	27.2 (0.5)

Tabla 27: Efecto de la ½ CMI de kanamicina en la adhesión de *S.epidermidis*

CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS

CMIs ($\mu\text{g/ml}$):				
Antimicrobianos	<i>S.aureus</i>		<i>S.epidermidis</i>	
	ATCC 25923	Aislado Clínico	ATCC 12228	Aislado Clínico
Ampicilina	1	16	64	0.5
Cefotaxima	2	2	1	1
Teicoplanina	0.5	0.25	8	1
Clindamicina	0.12	0.25	0.25	0.12
Azitromicina	2	1	2	32
Kanamicina	1	2	2	2
Tetraciclina	0.25	0.25	64	1
Norfloxacino	1	1	1	0.25

Tabla 28: Concentraciones mínimas inhibitorias frente a las cuatro cepas de *S.aureus* y de *S.epidermidis*

Efecto de plasma y suero sobre la adherencia de S.aureus a catéteres de vialón

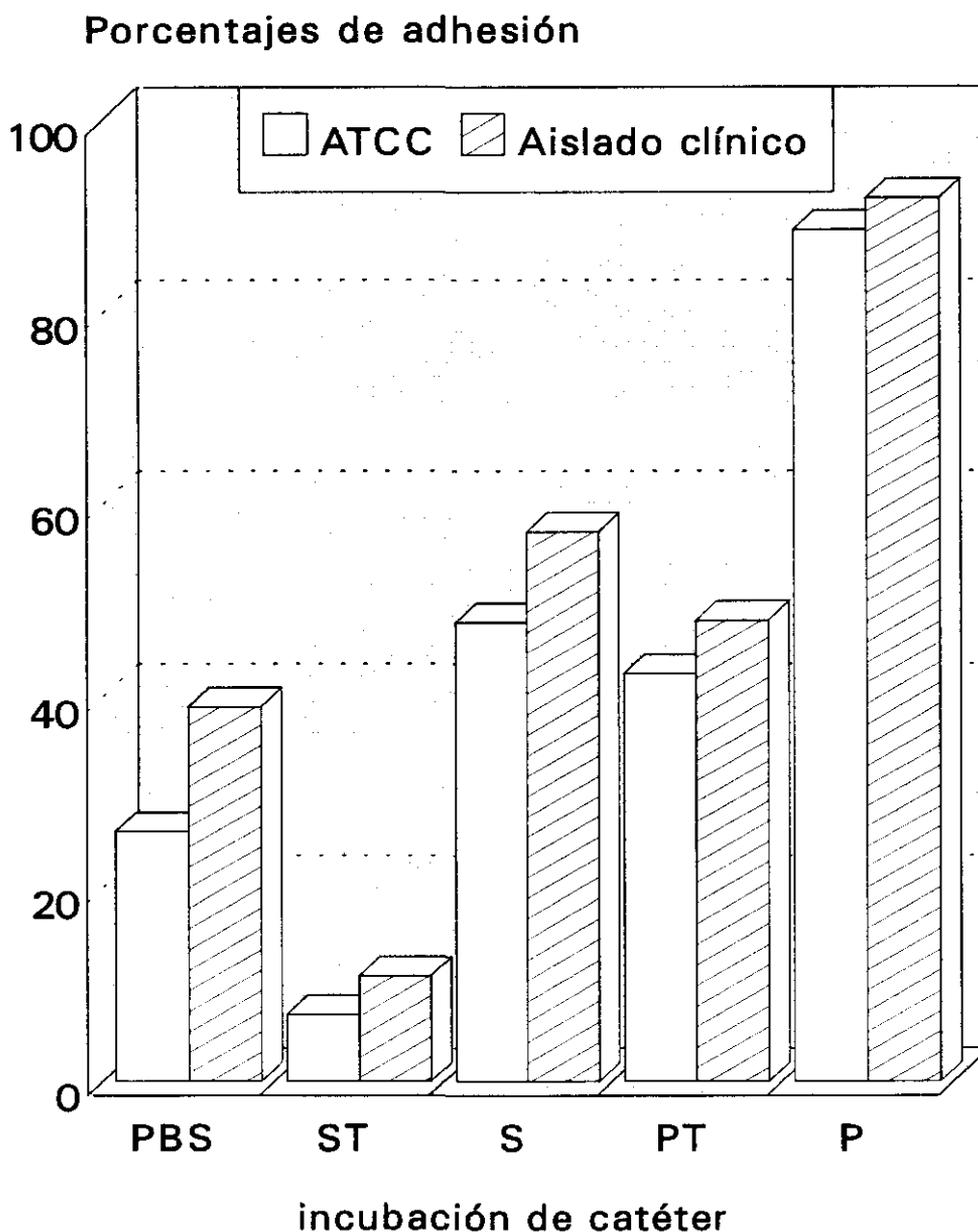


Figura 1. Plasma(P), Suero(S), Plasma Tratado(PT), Suero Tratado(ST)

Efecto de la fibronectina en la adherencia de S.aureus a catéteres de vialón

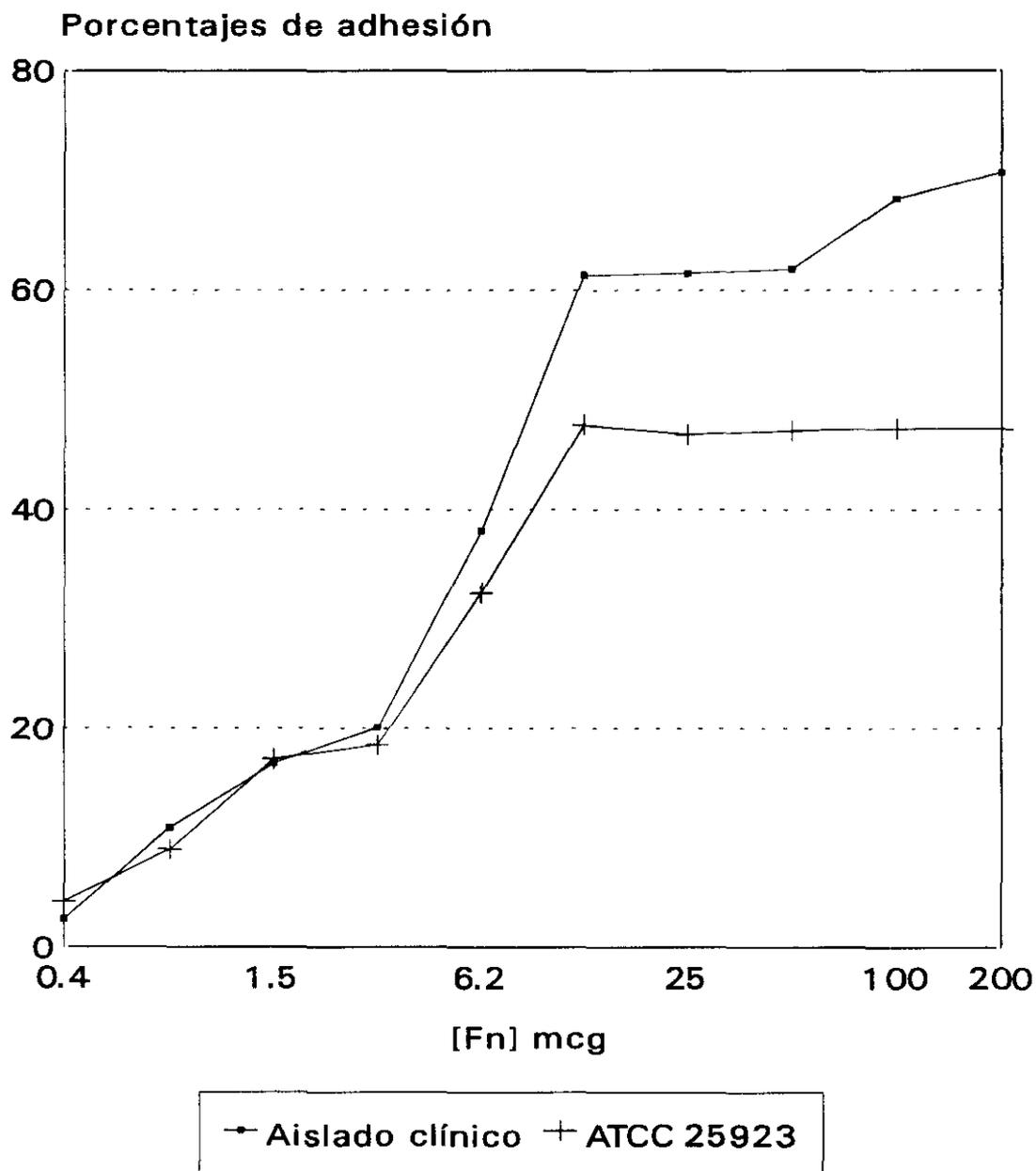
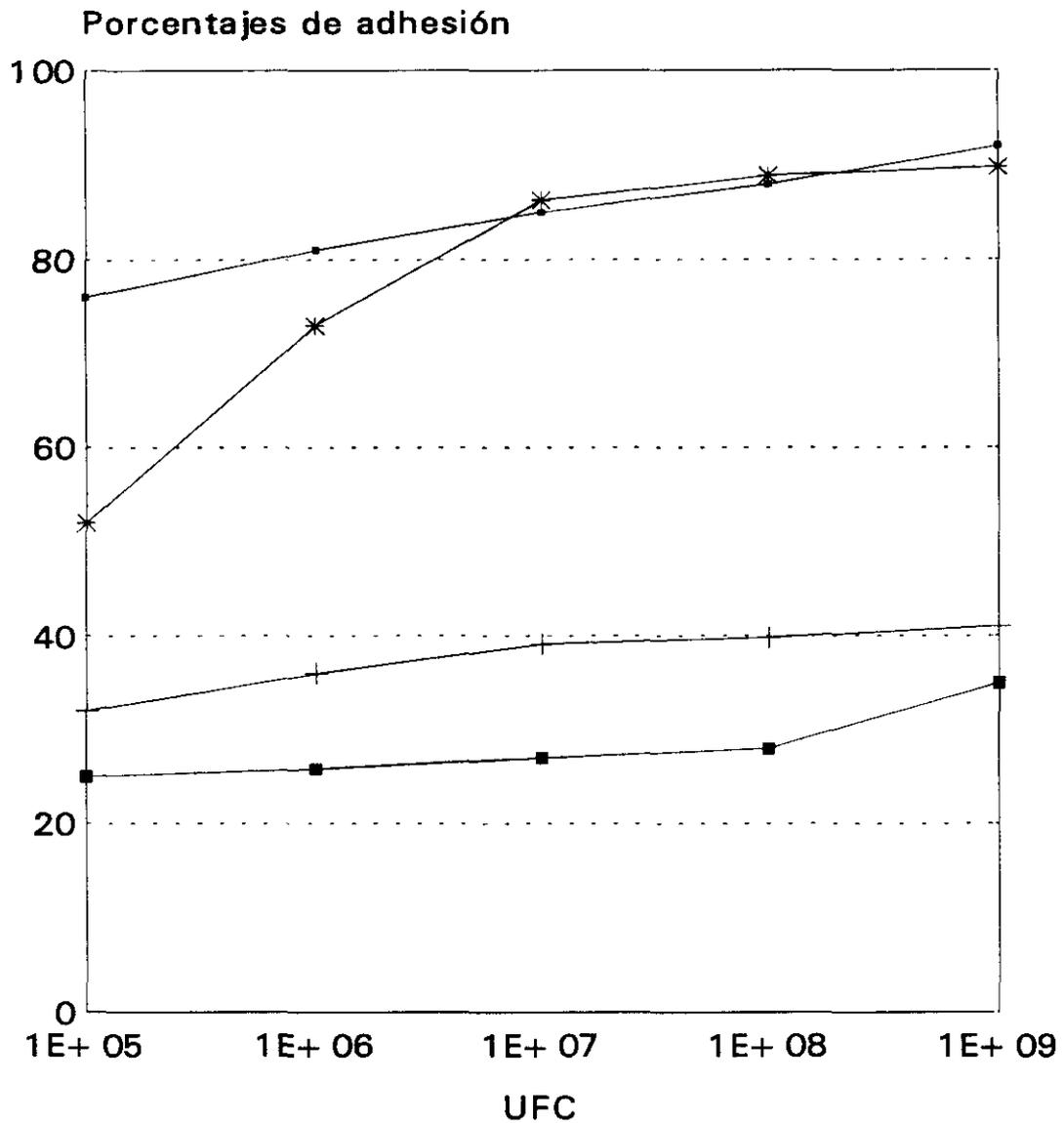


Figura 2.

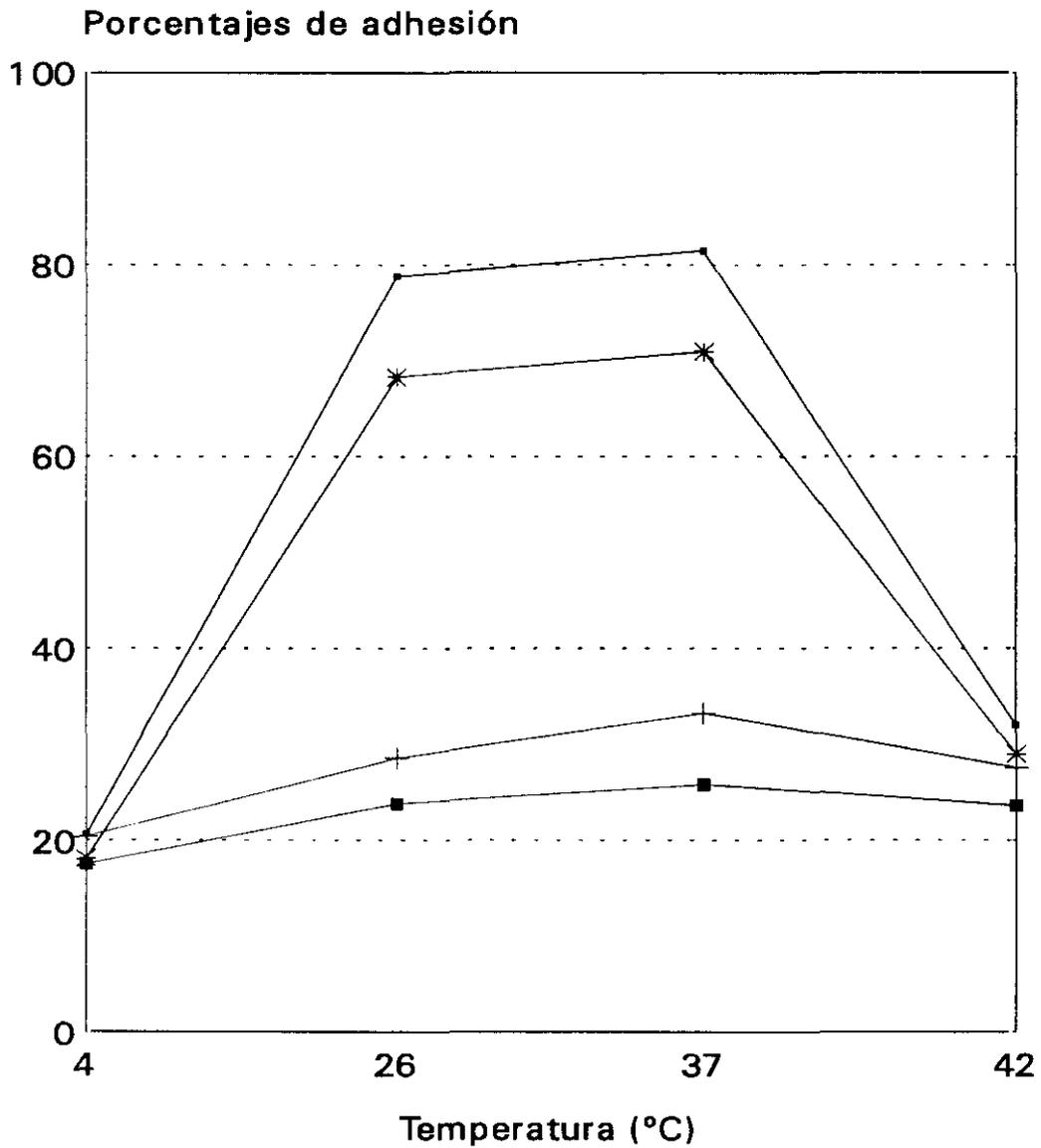
Efecto del inóculo sobre la adherencia de S.aureus a catéteres incubados con plasma o PBS



→ A.C./plasma + A.C./PBS * ATCC/plasma ■ ATCC/PBS

Figura 3.

Efecto de la temperatura sobre la adherencia de *S.aureus* a catéteres incubados con plasma o PBS



— A.C./plasma + A.C./PBS * ATCC/plasma ■ ATCC/PBS

Figura 4.

Efecto del tiempo sobre la adherencia de *S.aureus* a catéteres incubados con plasma o PBS

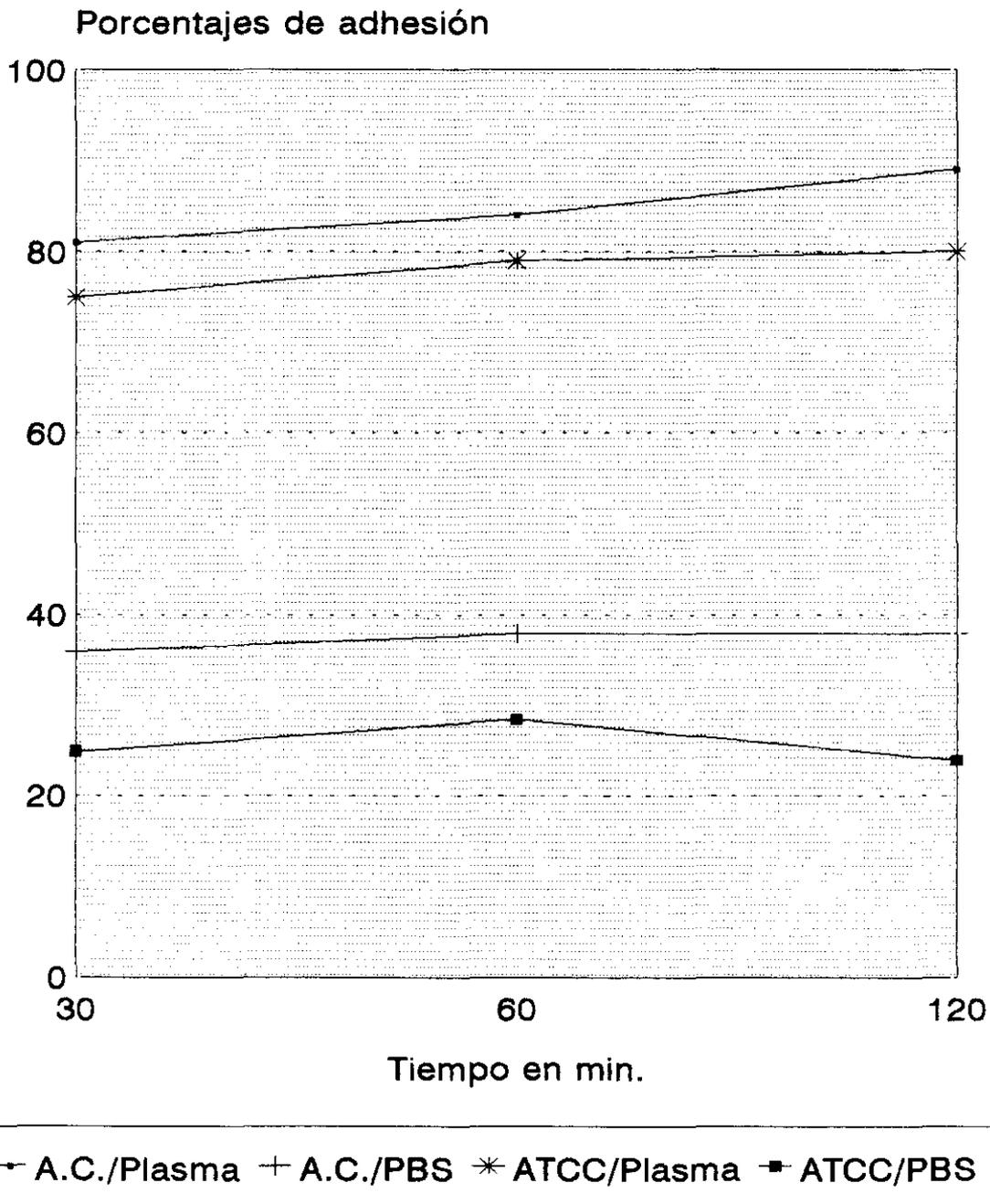


Figura 5. Tiempo de incubación con Plasma

Efecto del tiempo sobre la adherencia de S.aureus a catéteres incubados con Plasma o PBS

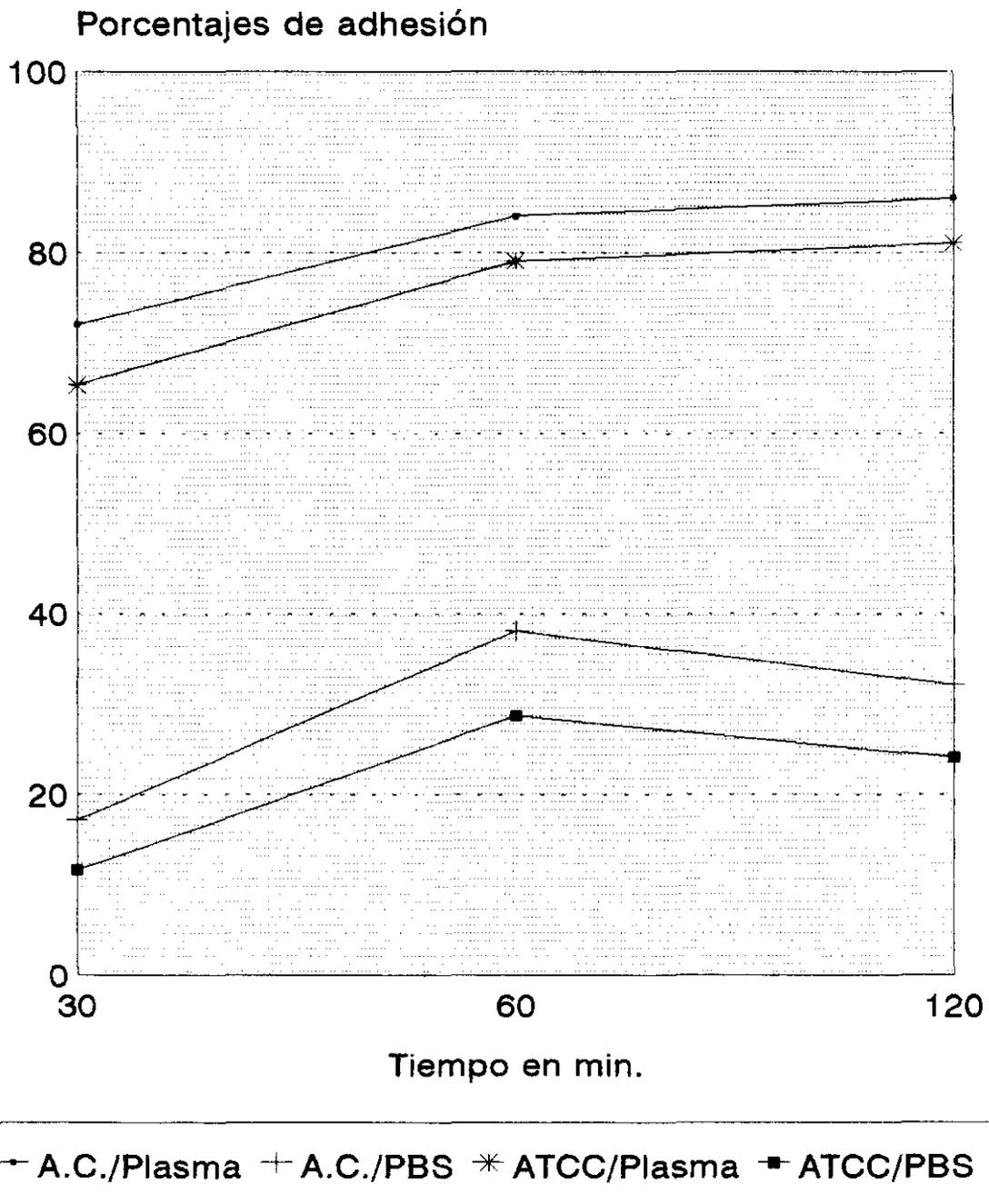
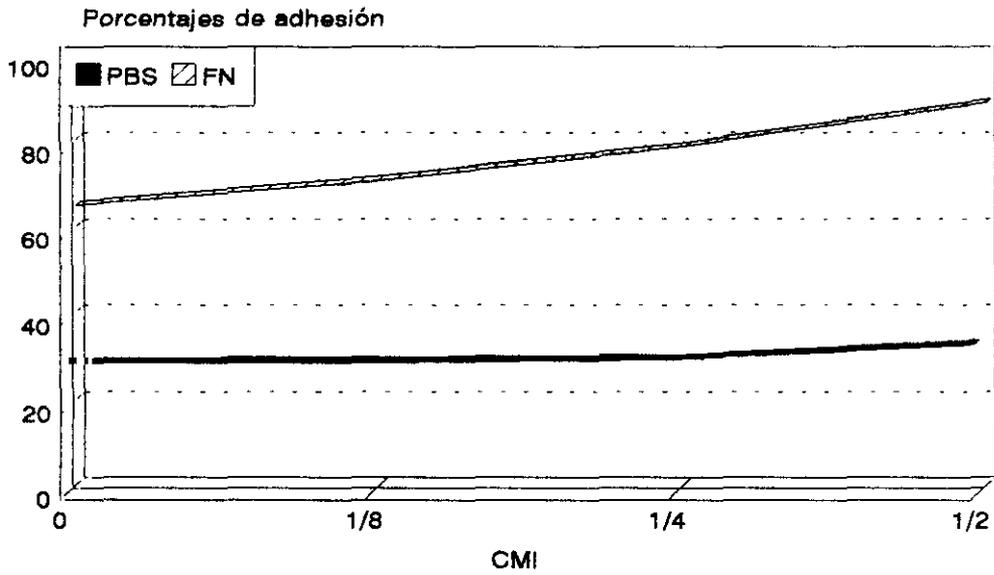


Figura 6. Tiempo de incubación con bacterias

Ampicilina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(ATCC) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn



Ampicilina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(A.Clín) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn

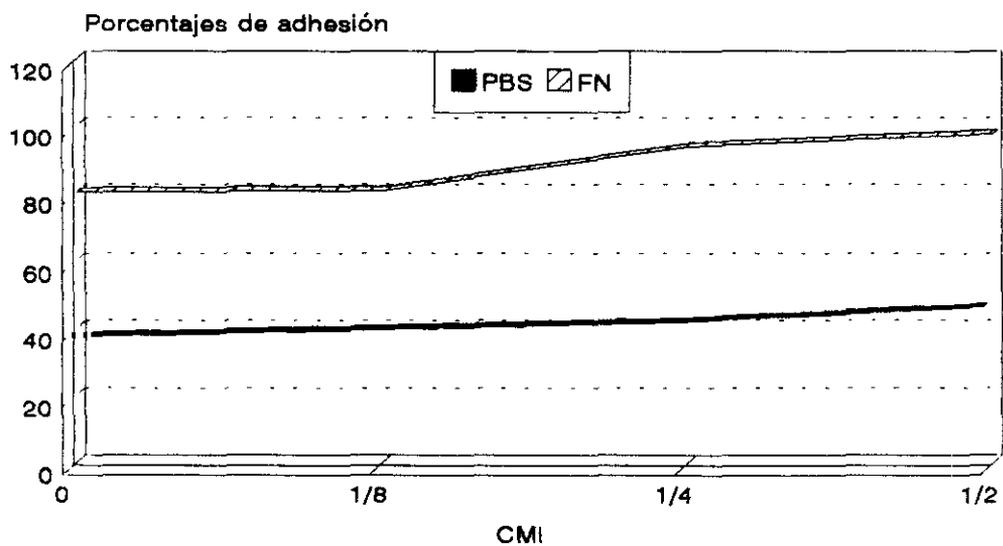
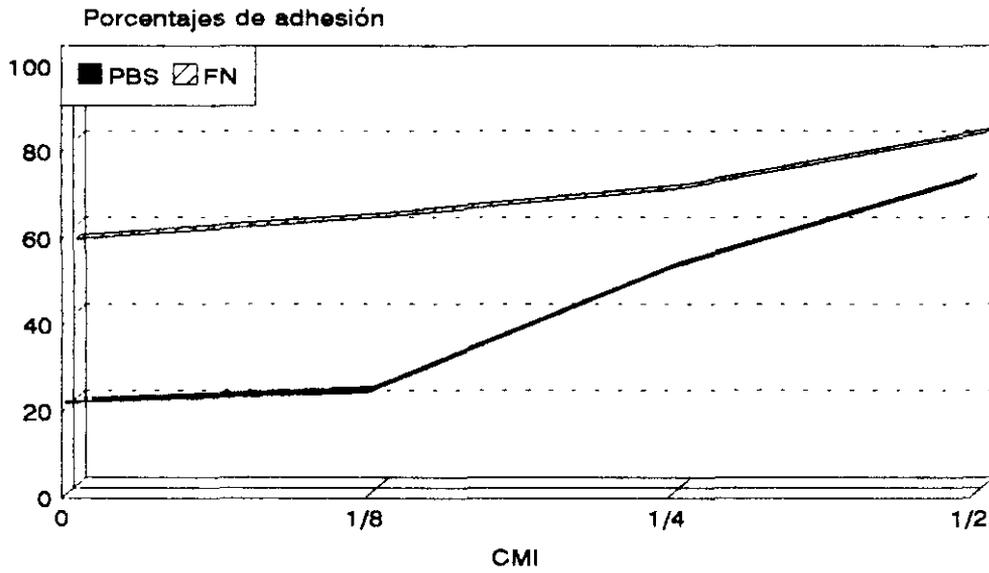


Figura 7.

Cefotaxima: efecto sobre la adherencia de S.aureus(ATCC) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn



Cefotaxima: efecto sobre la adherencia de S.aureus(A. Clín) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn

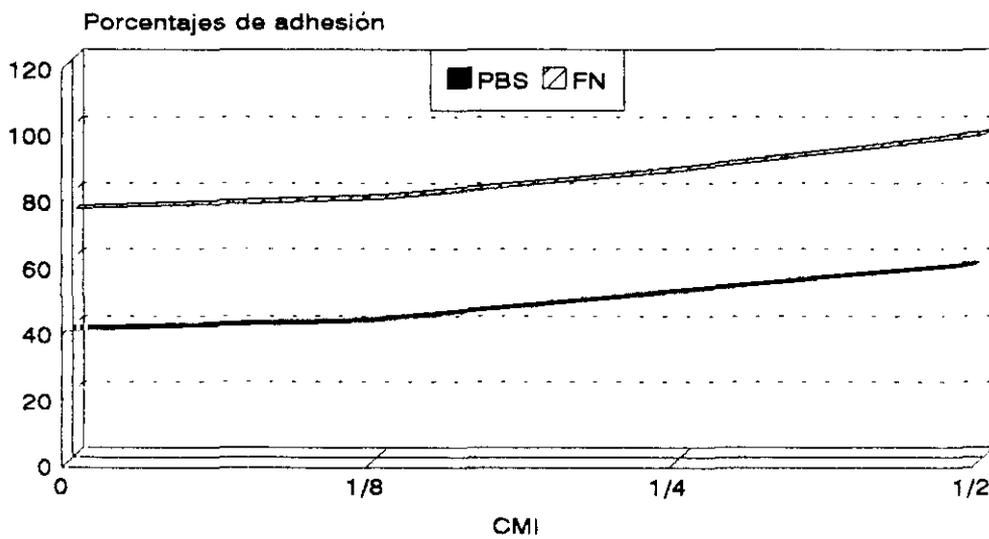
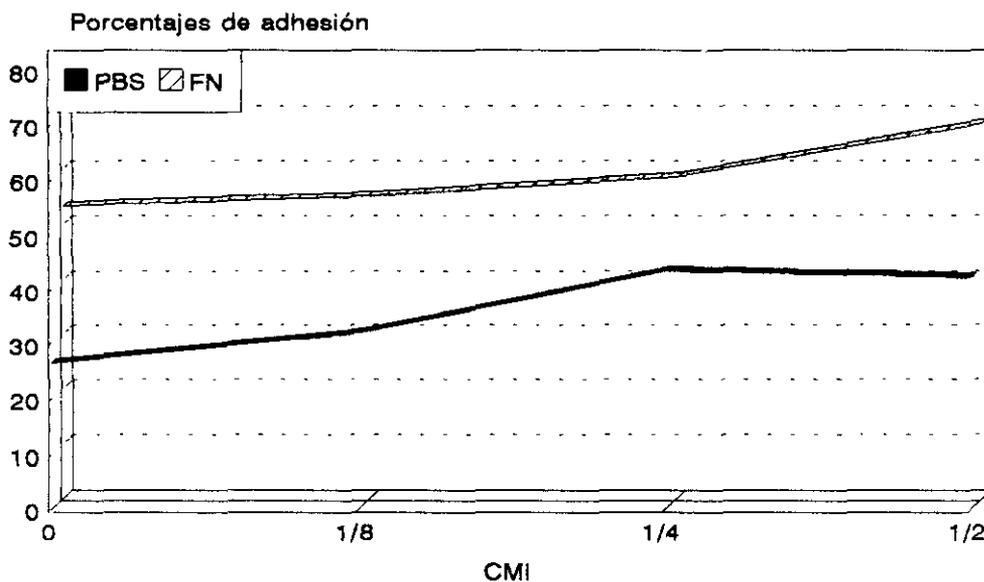


Figura 8.

Azitromicina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(ATCC) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn



Azitromicina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(A.Clín) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn

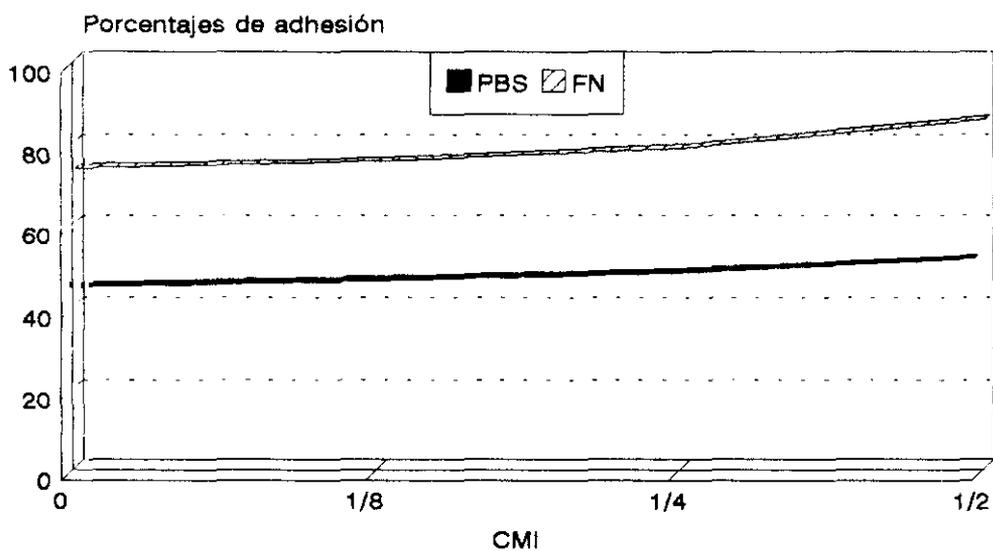
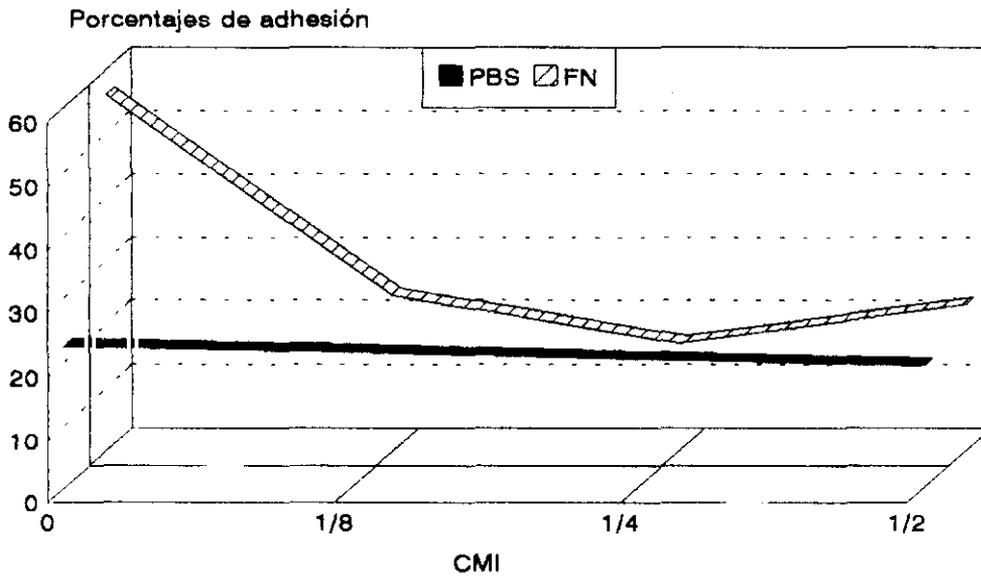


Figura 9.

Teicoplanina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(ATCC) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn



Teicoplanina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(A.Clín) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn

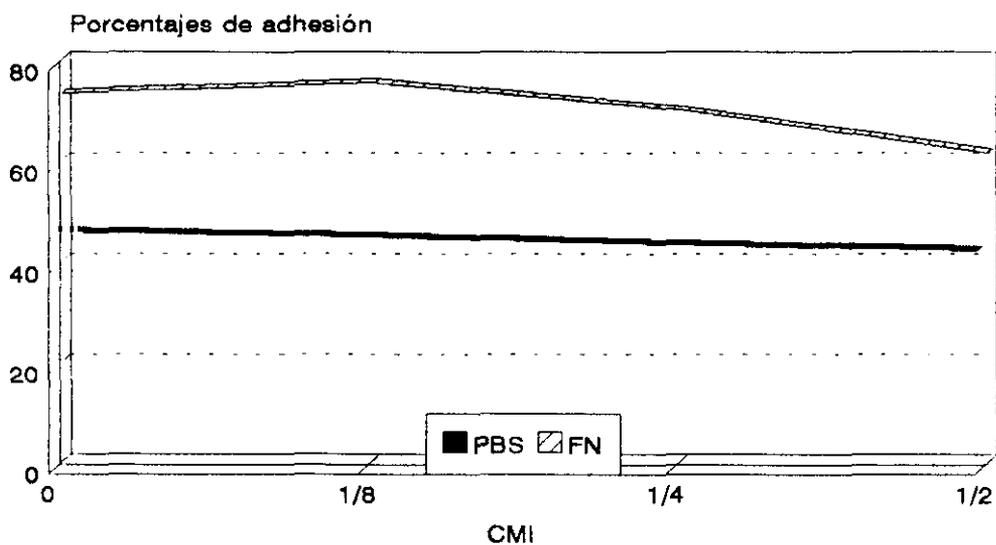
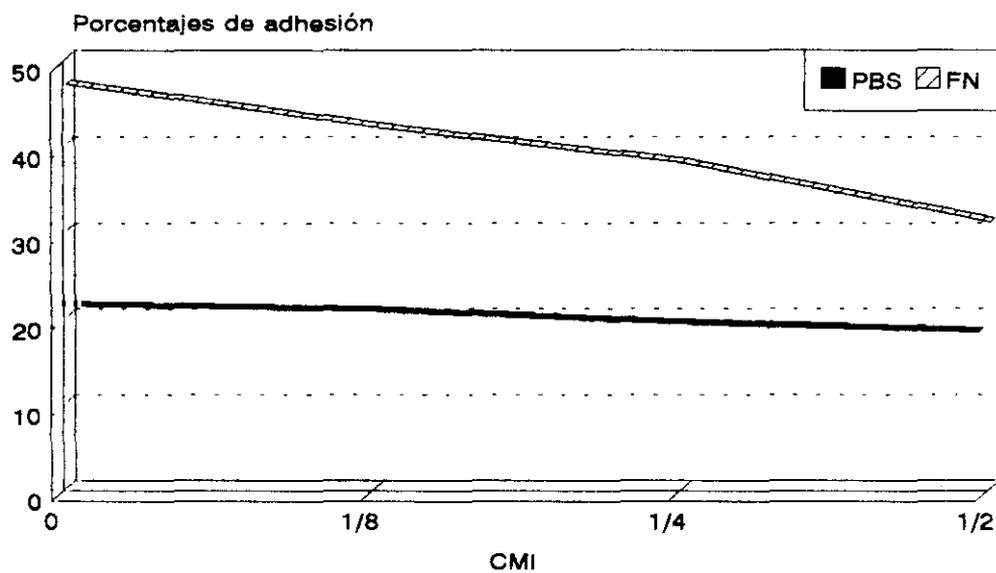


Figura 10.

Norfloxacino: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(ATCC) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn



Norfloxacino: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(A.Clín) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn

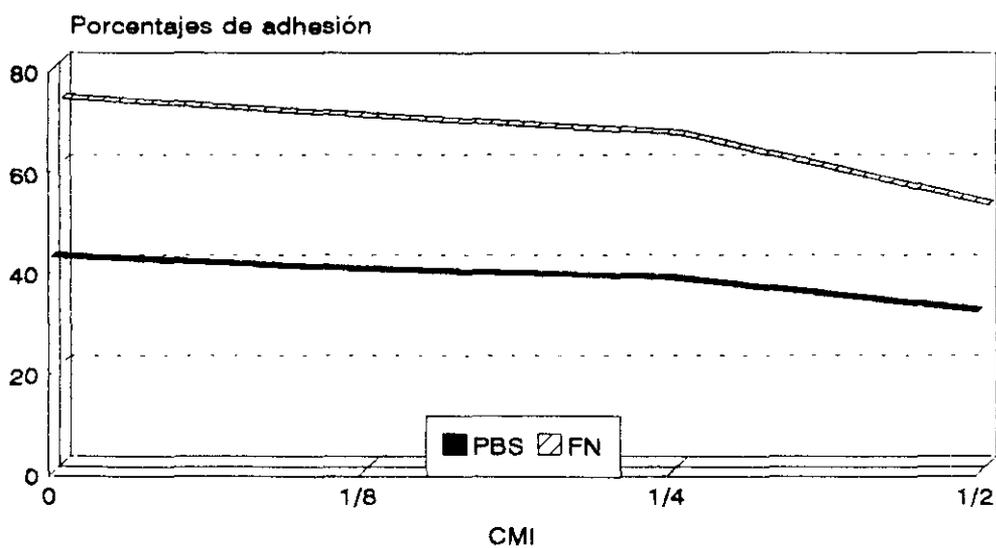
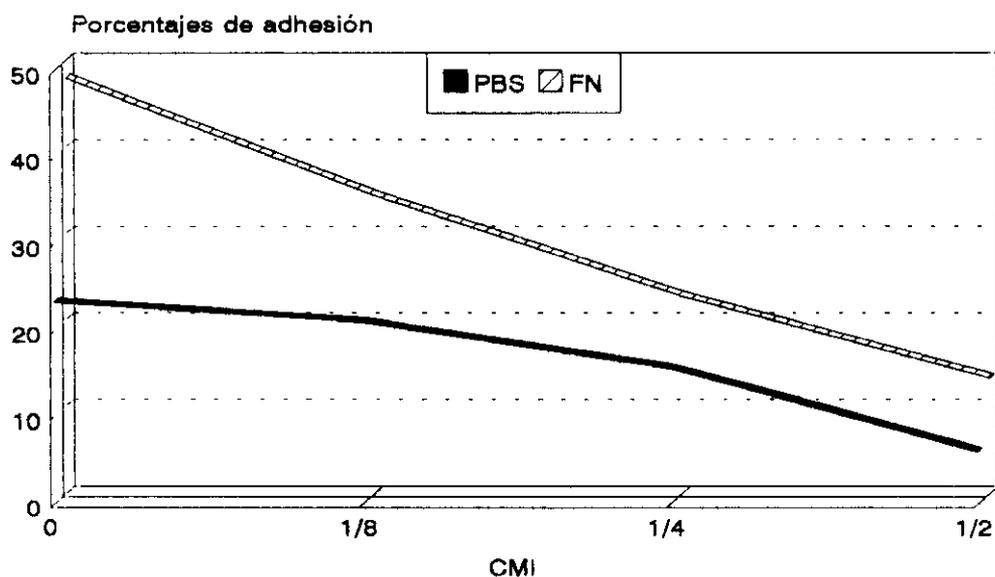


Figura 11.

Tetraciclina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(ATCC) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn



Tetraciclina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(A.Clín) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn

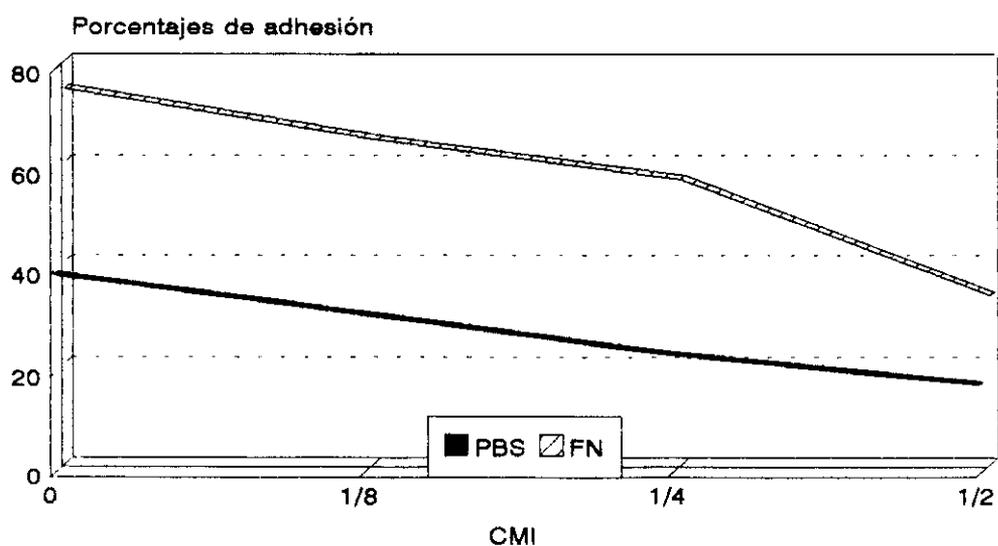
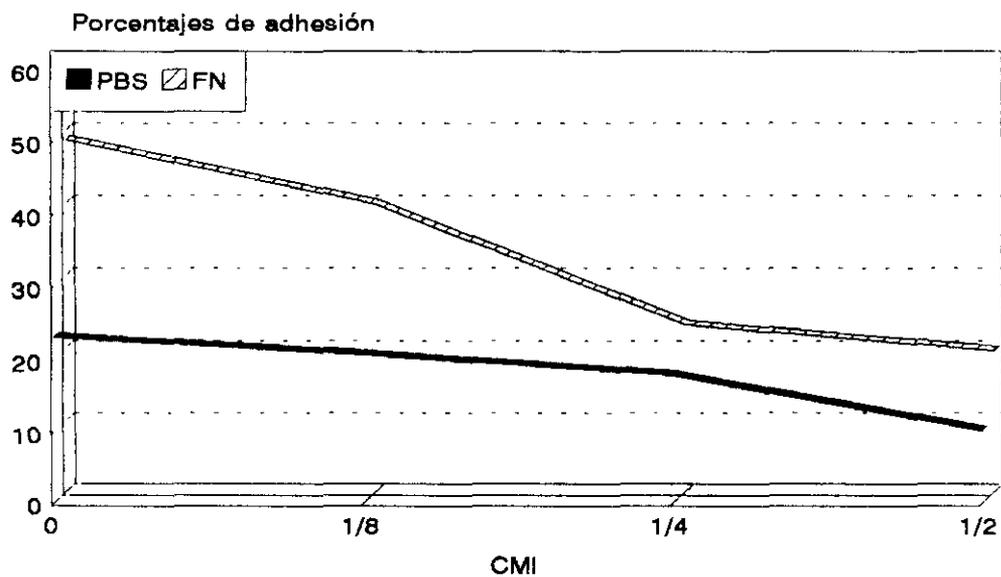


Figura 12.

Clindamicina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(ATCC) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn



Clindamicina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(A.Clín) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn

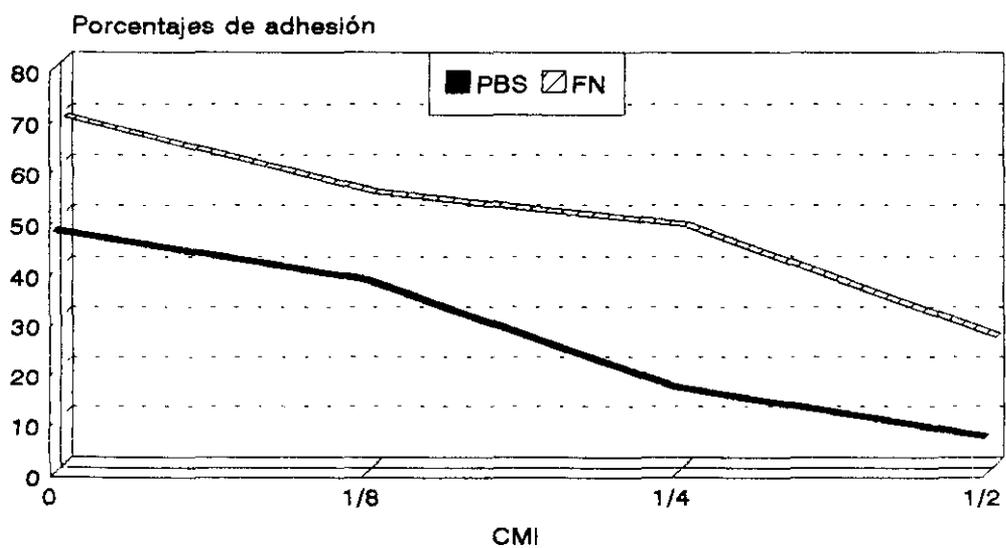
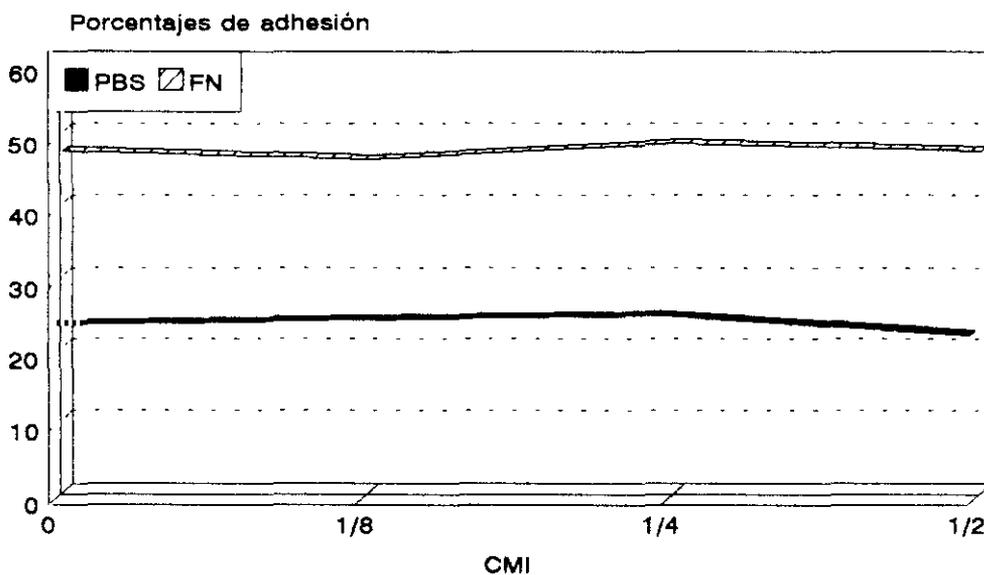


Figura 13.

Kanamicina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(ATCC) a cat. de vialón incubados con PBS o Fn



Kanamicina: efecto sobre la adherencia de *S.aureus*(A.Clín) cat. de vialón incubados con PBS o Fn

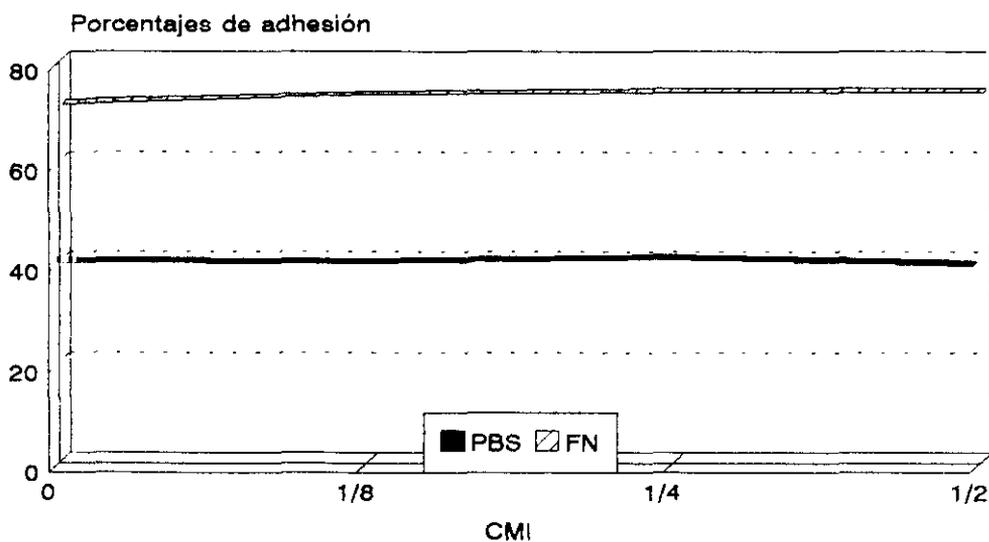


Figura 14.

Efecto de 1/2 CMI de antimicrobianos sobre la adherencia de S.aureus a catéteres de vialón

Porcentajes de adhesión

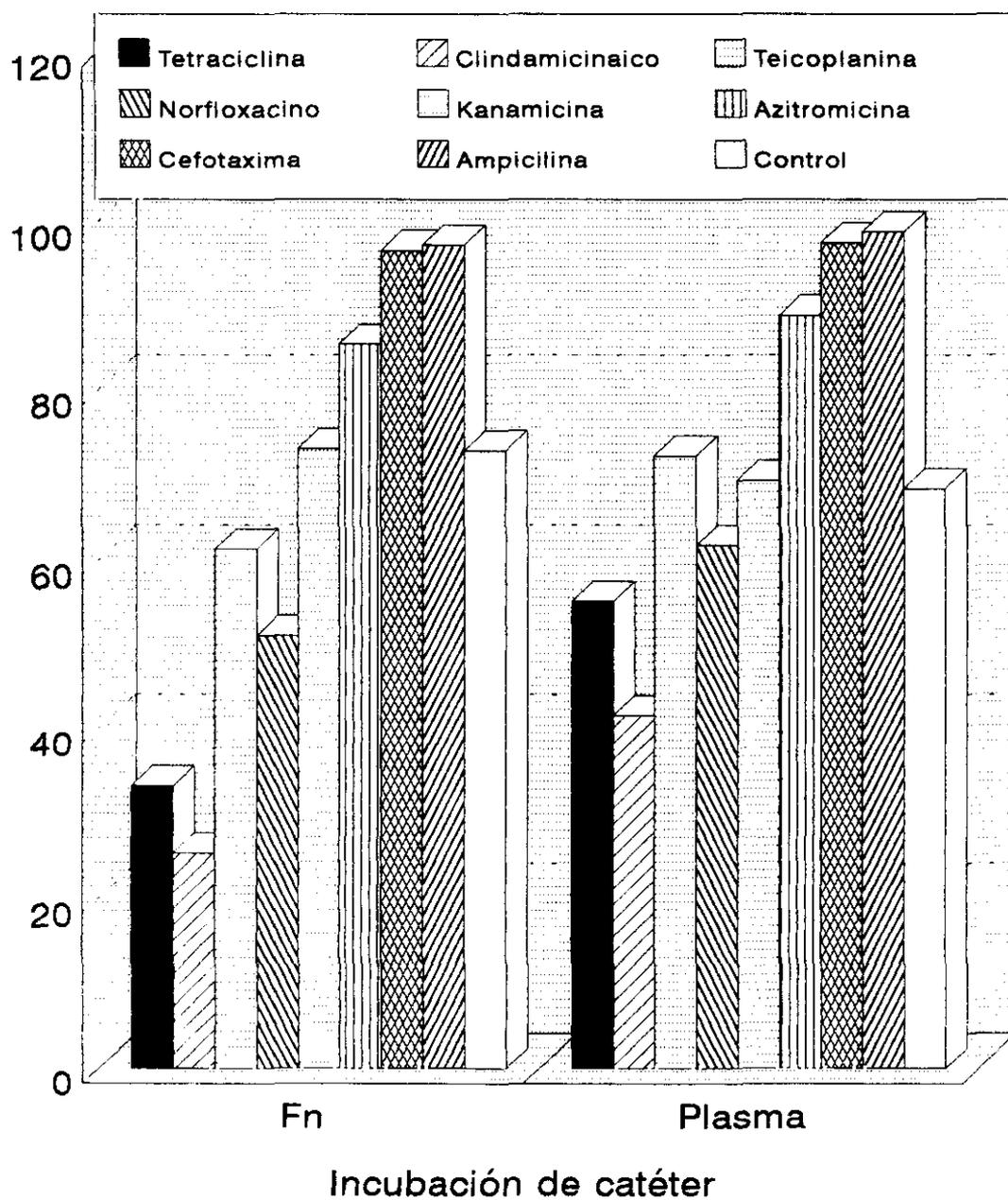


Figura 15. S.aureus Aislado Clínico

Efecto de 1/2 CMI de antimicrobianos sobre la adherencia de S.aureus a catéteres de vialón

Porcentajes de adhesión

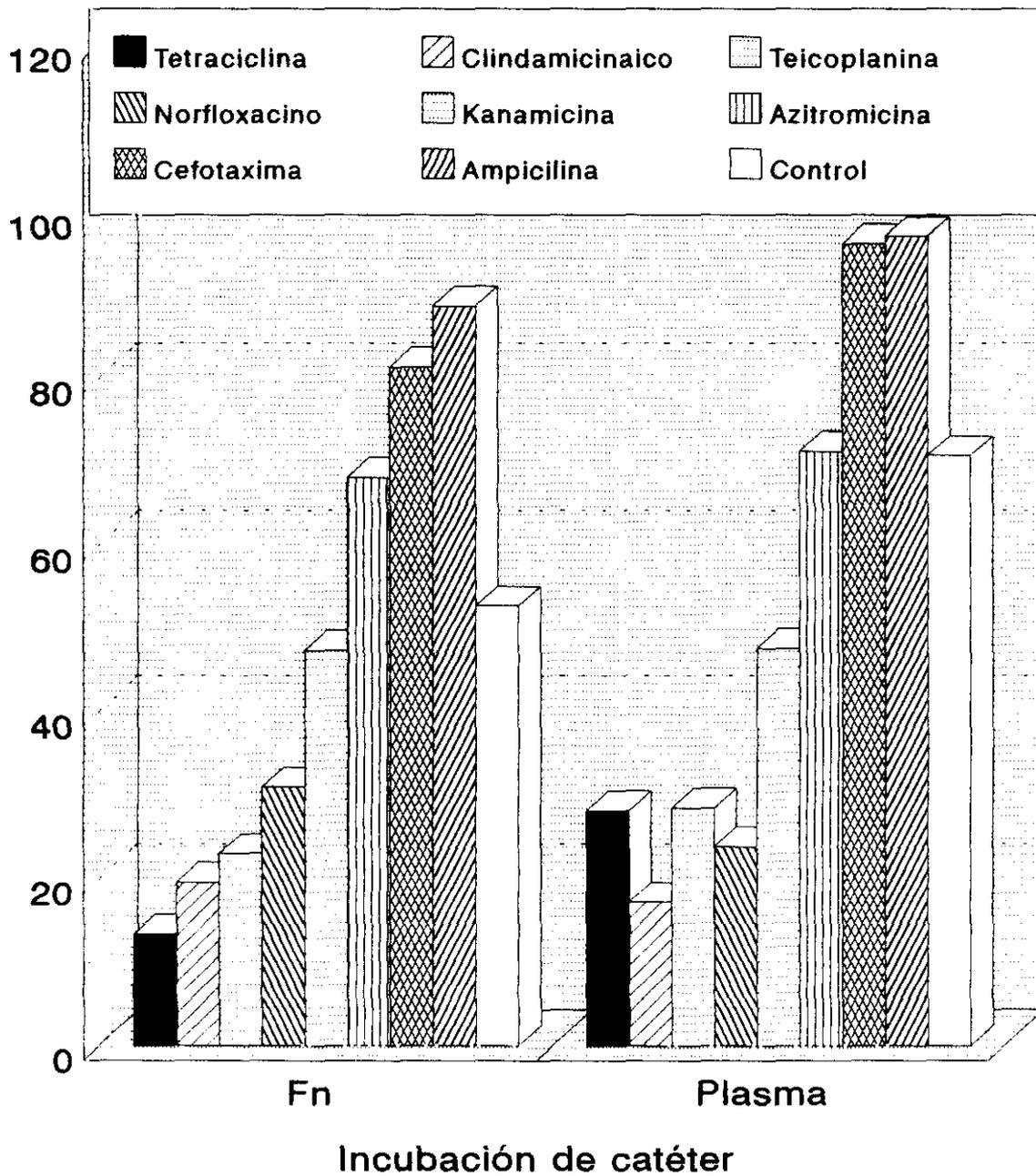


Figura 16. S.aureus ATCC 25023

V. DISCUSSION

1. VALORACION METODOLOGICA

1.1. TIPOS DE CATETERES

Para nuestro estudio hemos utilizado dos tipos de catéteres de distinto material: Cánula de teflón (Terumo) de 25 x 0.8 milímetros y cánula de vialón de medidas idénticas. Son múltiples los estudios que han sido realizados con catéteres de distinta composición, entre los materiales más frecuentemente estudiados se encuentran el teflón, material plástico ampliamente distribuido en el medio hospitalario (125,126). También, en trabajos más recientes aparece el vialón (127) considerando que es un material recientemente introducido exclusivamente para uso médico por sus propiedades de flexibilidad.

Teniendo en cuenta que generalmente son los catéteres centrales los que pueden ocasionar complicaciones más o menos graves (128-130), en este trabajo hemos utilizado catéteres periféricos como representativos del tipo de material.

1.2. RECUENTO DE COLONIAS

La determinación de la adherencia bacteriana al catéter ha sido realizada por recuento de colonias en placa petri; técnica que ha sido seguida por diversos trabajos de investigación (131,132) ya que presenta la ventaja de ser una técnica económica, conservando un margen aceptable de fiabilidad, aunque podemos destacar la menor sensibilidad que supone con respecto al uso de contadores de centelleo que permiten el recuento de bacterias marcadas radiactivamente (49,133).

1.3. PLASMA Y FIBRONECTINA HUMANA PURIFICADA

Las infecciones asociadas a dispositivos intravasculares son una importante fuente de complicaciones nosocomiales (134-137). El mecanismo por el cual la colonización y subsecuentemente la infección del catéter se desarrolla no se conoce exactamente, aunque sí se sabe que las proteínas que se encuentran en el torrente sanguíneo intervienen en este proceso.

Al igual que en nuestro trabajo, otros estudios han utilizado el plasma (138,49), procedente de un "pool" de sangre de voluntarios sanos, para valorar el efecto de las proteínas en su conjunto sobre la adhesión al catéter de diversos microorganismos.

Como proteína específica que puede intervenir en esta adhesión hemos trabajado con la fibronectina humana purificada proporcionada por Sigma, también utilizada por otros autores (44,49,138) previamente obtenida por afinidad cromatográfica en gelatina-sefarosa.

1.4. ELIMINACION DE LA FIBRONECTINA POR ANTICUERPOS

La eliminación de la fibronectina del plasma o del suero se puede realizar mediante cromatografía en gelatina-sefarosa, basándose en la afinidad que presenta dicha molécula por la gelatina, técnica empleada en diversos estudios (50,133,139).

En nuestro trabajo nos hemos basado en una reacción inmunoquímica con anticuerpos específicos de origen animal elaborados mediante inmunización para eliminar la fibronectina. Consideramos que la ventaja de este método frente a otros es la alta especificidad que proporciona la interacción antígeno-anticuerpo.

1.5. CRECIMIENTO BACTERIANO CON SUB- CMI_s DE ANTIMICROBIANOS

El crecimiento bacteriano en presencia de concentraciones subinhibitorias de los distintos antimicrobianos se llevó a cabo en agitaciones de 150 rpm, lo cual implicó un incremento de la velocidad de crecimiento con respecto a las determinaciones de las CMI_s llevadas a cabo sin agitaciones, con un periodo de incubación de 18 a 24 horas (“overnight”), ésta diferencia no ocasionó un cambio en los valores de las CMI_s.

Por otro lado, considerando que distintos antimicrobianos a concentraciones bajas pueden provocar cambios morfológicos en las bacterias (103,107-109, 140) (elongaciones, mala separación del septo...) y que esto puede conllevar a errores en el recuento bacteriano, se comparó, partiendo de una misma turbidez, el recuento de las bacterias tratadas con antimicrobianos y las bacterias control (sin antimicrobianos) y se comprobó que en ambos casos fuera idéntico.

La turbidez medida por espectrofotometría guardó relación directa con el crecimiento bacteriano y con el número de bacterias (141). En las figuras 16 y 17 se puede apreciar como el crecimiento bacteriano con sub- CMI_s sufrió un retraso con respecto al control y este hecho se aprecia de forma más marcada con la ½ CMI.

2. ADHERENCIA A CATETERES DE TEFLON Y VIALON

En 1963 Gristina y Rovere realizaron una serie de experimentos “in vitro” que mostraron la propagación y el aumento del crecimiento bacteriano a lo largo de las superficies de biomateriales (142). Gristina propuso que el biomaterial proporcionaba un sustrato inerte favorable para el crecimiento bacteriano (143).

En 1978 hipotetizó que sus encuentros in vitro del aumento del crecimiento de patógenos en las superficies de biomateriales, tanto como la colonización del biomaterial “in situ” por bacterias de origen hemático o quirúrgico puede ser explicado en términos de adherencia bacteriana (144).

Teniendo en cuenta que las infecciones relacionadas con catéteres intravenosos, intraarteriales e intraperitoneales han llegado a ser importantes infecciones adquiridas en el hospital y que son los estafilococos, predominantemente coagulasa negativos (145), pero también *S.aureus* (146,147), los principales causantes de estas infecciones, es importante considerar que unos de los primeros pasos para que se establezca dicha infección podría ser la adherencia de las bacterias al material, generalmente plástico, que presentan los catéteres.

La adherencia de los estafilococos coagulasa negativos a distintos dispositivos médico-quirúrgicos han sido ampliamente estudiada, diseñándose incluso métodos para valorarla (79-83).

Para que se establezca una colonización microbiana es necesario la instauración de cuatro pasos previos:

Transporte de las bacterias hasta la superficie que se ha de colonizar, adherencia inicial o adhesión, fijación del microorganismo y finalmente colonización, donde una vez adheridas las bacterias comienzan a dividirse llegando a formar microcolonias.

En estos cuatro procesos intervienen numerosos elementos que pueden influir en el proceso de colonización del biomaterial.

Locci, Peters y Pulverer (148) proponen tras estudiar por microscopia electrónica

la superficie de diferentes catéteres y detectar frecuentes irregularidades en la superficie de las muestras examinadas que éstas podrían actuar como lugares potencialmente favorecedores de la adhesión bacteriana en un primer momento. Posteriormente, trabajando con inóculos de bacterias altos o con perfusiones durante largos periodos de tiempo de bacterias sobre el catéter a estudiar se observó que también se puede llegar a colonizar las partes lisas del catéter (149).

Diversos estudios planteaban una estrecha relación entre la hidrofobicidad bacteriana y la adherencia (48,150-152), ya que tanto los materiales plásticos como la superficie bacteriana presentan diverso grado de hidrofobicidad. Pero parece ser que estudios más recientes se plantean la inexistencia de tal relación (153,154).

El slime es una sustancia polimérica extracelular amorfa y poco compacta, estructuralmente compuesta por distintos elementos como pueden ser hidratos de carbono, proteínas, glicerol, fosfatos y otros compuestos no identificados (155-158). Está producido por diversas bacterias, entre ellas, *S.aureus* y *S.epidermidis* donde se ha estudiado ampliamente (154,155-158).

Este compuesto ha sido asociado con una tendencia a causar infecciones en pacientes con dispositivos protésicos (159-165), puesto que facilita la adherencia, aunque existen divergencias sobre este respecto y en algunos trabajos como el llevado a cabo por Falcieri se encontró que la temprana producción de exopolímeros de las bacterias no influyó en su adhesión al biomaterial (166), también favorece la persistencia bacteriana, protege a las bacterias de las defensas del huésped y de la acción de los antimicrobianos (155,167,168).

La presencia del slime ha sido constatada por diversos trabajos (159,169,170) y observaron que los estafilococos coagulasa negativos adheridos a catéteres, sobre todo en las irregularidades de la superficie del plástico, estaban rodeados de un material

difuso y amorfo que cubría toda la superficie del plástico.

Por otro lado, no solo es importante tener en cuenta en el proceso de adhesión factores que correspondan a la bacteria y al biomaterial como sustrato sobre el cual se van adherir los microorganismos, es preciso considerar el medio en el cual el dispositivo intravascular se encuentra suspendido una vez colocado en el paciente, de este modo las proteínas del huésped pueden desempeñar un importante papel en la adhesión.

Una vez introducido en el torrente sanguíneo el catéter, éste se recubre casi inmediatamente de una capa acondicionadora formada por distintas proteínas, especialmente por fibrina y fibronectina (44,171). Estas glicoproteínas pueden intervenir en el proceso de adhesión al dispositivo (44,47).

En nuestro estudio de adhesión a catéteres de vialón y teflón con las distintas cepas ensayadas hemos observado diferencias en cuanto a un tipo de catéter o a otro se refiere, presentando siempre un mayor efecto del aislado clínico respecto a la cepa ATCC.

Cuando los catéteres fueron incubados en PBS comprobamos una menor adhesión en el catéter de teflón que en el de vialón tanto para *S.epidermidis* como para *S.aureus*, solo el aislado clínico de *S.aureus* presentó menor adhesión con el catéter de vialón. López-López y cols.(127) estudiaron la cinética de adhesión de un aislamiento de *S.aureus* y de *S.epidermidis* entre otras bacterias a catéteres de diferentes materiales plásticos . En su estudio observaron una menor adherencia de *S.epidermidis* al catéter de teflón con respecto al de vialón, mientras que con *S.aureus* la menor adhesión fue obtenida con el catéter de vialón. Al igual que López-López, en nuestro estudio *S.epidermidis* presentó menor adhesión al teflón.

Por otro lado, también sus hallazgos coinciden con respecto a *S.aureus* en el caso

del aislado clínico que presenta menor adhesión al vialón que al teflón tanto en su estudio como en el nuestro, en cambio con la cepa ATCC 25923 obtenemos una adherencia mayor al vialón que al teflón. Esta diferencia que obtenemos entre las dos cepas probablemente sea explicada por posibles diferencias de hidrofobicidad en la superficie celular bacteriana, ya que las fuerzas hidrófobas que se establecen entre la superficie del catéter y de la bacteria pueden favorecer la unión inespecífica entre ambas (172,173).

Según nuestros datos y a la vista de los trabajos revisados podemos constatar que el tipo de material utilizado en la fabricación del dispositivo intravascular es importante en la adherencia de las bacterias y que junto a las mejoras que supone la búsqueda de materiales menos flebitogénicos o más flexibles (ventaja que presenta el vialón frente al teflón) sería necesario evaluar la capacidad de adhesión de los microorganismos a estos materiales y evitar en lo posible que se produzca tal circunstancia.

La adherencia de las bacterias a catéteres incubados en PBS supone una simplificación de los acontecimientos que ocurren "in vivo", puesto que los catéteres una vez colocados en el paciente son rápidamente recubiertos por diferentes proteínas, fluidos y células. Por esta circunstancia los catéteres también fueron incubados con plasma para valorar el efecto de las proteínas plasmáticas sobre la adhesión a los dos tipos de catéteres y con fibronectina para comprobar en que medida afecta a la adhesión de los microorganismos, pues se sabe que esta glicoproteína, junto a otras, es depositada en la superficie de los dispositivos vasculares y que además la molécula presenta receptores para *S.aureus* (43) y por otro lado también se ha comprobado que constituye un factor importante en la adhesión (45,44).

Cuando se valoró la adherencia de *S.aureus* al catéter incubado con fibronectina o plasma fue mayor que la obtenida con PBS en ambos tipos de catéteres, por el contrario con *S.epidermidis* no se observó una diferencia en la adhesión.

Los datos correspondientes a *S.epidermidis* nos sugieren que el conjunto de las proteínas plasmáticas incluida la fibronectina no promueven la adhesión de este microorganismo al biomaterial estudiado. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Eugene Muller y cols. (175) que estudiaron la adherencia de distintos aislados de estafilococos coagulasa negativos a catéteres incubados con proteínas de la sangre “in vitro” e “in vivo” tras su inserción en voluntarios o pacientes hospitalizados.

Ellos detectaron que el depósito “in vitro” de componentes de la sangre en biomateriales plásticos no promovieron significativamente la adherencia, incluso en algunos experimentos se redujo la adhesión cuando los catéteres estaban recubiertos de las proteínas.

La explicación por la cual en nuestros resultados no hemos encontrado diferencias de adhesión entre los catéteres incubados con PBS y los expuestos a plasma y fibronectina puede basarse sobre la estrecha relación que existe entre la hidrofobicidad y la adherencia de los estafilococos cuagulasa negativos (48, 138) . Es posible que al recubrirse con proteínas la superficie del catéter queden cubiertos los grupos hidrofóbicos del material, pero este hecho puede estar compensado con la presencia de las proteínas también hidrofóbicas del plasma que sirvan de puente de unión entre la superficie del catéter y la bacteria en el paso inicial de la adhesión. Un mecanismo similar ocurriría con la fibronectina.

Con respecto a los datos obtenidos con *S.aureus* donde la fibronectina y principalmente el plasma favorecen la adhesión al catéter ha sido observada por numerosos estudios (44,138,176).

El plasma aumentó la adherencia en mayor grado que la fibronectina en ambos tipos de catéteres. Ya que ciertas proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, la fibronectina y la laminina (44,45,138) entre otras, son depositadas en la superficie de

derivados protésicos y tienen la capacidad de fijar bacterias como *S.aureus*, es lógico pensar que el plasma que contiene gran número de estas glicoproteínas (especialmente fibrinógeno) ofrezca más posibilidades de adhesión a las bacterias que cada proteína por separado.

La fibronectina según nuestros datos favorece considerablemente la adherencia de *S.aureus* al catéter. Sobre a este respecto existen trabajos contradictorios, el llevado a cabo por Ambrose (138) en el que estudia diversos factores implicados en la adherencia de *S.aureus* a varios materiales de catéteres encuentra que, tras incubar fragmentos de catéteres de 6.5 cm con 4 ml de una solución de fibronectina de 25 μ g /ml durante 15 minutos e incubar con bacterias, la fibronectina apenas afecta la adherencia , por otro lado Vaudaux (176) que realizó un estudio con el fin de definir el papel del fibrinógeno/fibrina y de la fibronectina en la adherencia de *S.aureus* a catéteres venosos centrales, además de estudiar la cantidad, integridad química, y actividad biológica de estas proteínas adsorbidas en los dispositivos insertados, muestra que la fibronectina como molécula intacta o bien fragmentos de ella a pesar de estar presente en cantidades más bajas que la fibrina/fibrinógeno promueve activamente la adhesión de *S.aureus*. Vaudaux explica un bajo efecto adhesivo del fibrinógeno en cánulas insertadas relacionándolo con una ruptura proteolítica de esta glicoproteína detectada por SDS-PAGE e “immunoblots” con anticuerpos antifibrinógeno y posteriormente confirmada por estudios in vitro con fragmentos purificados de la proteína (176).

En general podemos concluir considerando que en la patogénesis de la infección en dispositivos intravasculares por estafilococos es importante el estudio de las características del catéter, en cuanto a su composición se refiere, ya que puede influir tanto en la adherencia directa del microorganismo, como en la adsorción de las proteínas del plasma, las cuales, a su vez podrían favorecer o no la adherencia de las bacterias de forma inespecífica o específica por unión de moléculas localizadas en la superficie bacteriana.

3. FACTORES QUE AFECTAN LA ADHERENCIA DE *S.aureus* AL CATETER

3.1. INCUBACION CON PLASMA, PLASMA TRATADO, SUERO Y SUERO TRATADO

Como ya se ha comentado las proteínas plasmáticas depositadas en el catéter juegan un significativo papel en la adherencia estafilocócica, principalmente en *S.aureus* (176). Distintas proteínas como fibronectina, fibrinógeno, colágeno, laminina o vitronectina promueven la adherencia de forma individual cuando son adsorbidas “in vitro” en superficies poliméricas (44,45,176).

En este trabajo se ha pretendido valorar el efecto de la fibronectina en la adherencia de *S.aureus* al catéter aproximandonos lo más posible a una situación “in vivo” donde el catéter está en contacto con todas las proteínas plasmáticas en su conjunto y es posible que en esta situación las proteínas por interacciones o situaciones de competitividad puedan influir en la adherencia de distinta manera.

Para ello incubamos los catéteres con plasma y con plasma sin fibronectina mediante tratamiento con anticuerpos específicos antifibronectina. Encontramos que la adhesión debida a la fibronectina fue del 46.2% en la cepa ATCC 25923 y del 44.0% para el aislado clínico.

También incubamos catéteres con suero donde la concentración de fibronectina ha disminuido entre un 20% y un 50% con respecto al plasma (177,178) y en ensayos paralelos utilizamos suero libre de fibronectina, por previa eliminación con anticuerpos, obteniendo un 44.8% para la cepa ATCC 25923 y un 46.2% para el aislado clínico, resultados que son similares al caso anterior, donde empleamos plasma.

Estos datos sugieren que la fibronectina supone un factor importante en la adherencia de *S.aureus* al catéter, influyendo en aproximadamente un 45% en la adhesión de este microorganismo al catéter, además la bajada de fibronectina en el suero con respecto al plasma entre un 20% y un 50% no supone un descenso de la adherencia de *S.aureus* al catéter y por último la presencia de fibrinógeno se puede considerar que no afecta la adherencia de *S.aureus* debida a la fibronectina.

3.2. DISTINTAS CONCENTRACIONES DE FIBRONECTINA

Hemos estudiado como afecta las distintas concentraciones de fibronectina en la adherencia de *S.aureus* con el fin de utilizar en nuestros ensayos aquella concentración que nos proporcionará la mejor adherencia.

Los resultados obtenidos nos muestran que la adherencia no varía entre 200 $\mu\text{g/ml}$ y 12.5 $\mu\text{g/ml}$, a partir de la cual, la adhesión comienza a disminuir conforme bajamos la concentración de fibronectina, estos datos nos hacen considerar la adsorción de la fibronectina un proceso saturable y dosis-dependiente que tras adsorberse una determinada cantidad se satura la superficie expuesta y como resultado no es posible una mayor adhesión de las bacterias. Vaudaux y cols. (52) encontraron una situación similar al estudiar la adsorción de la fibronectina en polimetilmetacrilato.

El aislado clínico presentó más adherencia que la cepa ATCC 25923 hasta llegar a valores bajos de fibronectina, donde apenas apareció diferencias entre ambas cepas. Esto puede explicarse si consideramos que la cantidad de fibronectina adsorbida es lo suficientemente baja como para que la presencia de un número mayor de receptores en el aislado clínico, para ciertas proteínas plasmáticas, permitan una mayor adhesión (43).

Para los posteriores ensayos realizados con fibronectina purificada hemos utilizado una concentración de 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, ya que según este estudio nos asegura una

óptima adherencia bacteriana mediada por la fibronectina. Otros trabajos utilizaron concentraciones inferiores de 50 $\mu\text{g/ml}$ (133) y de 25 $\mu\text{g/ml}$ (52), visto la diferencia de metodología.

3.3. INOCULO

En nuestro estudio hemos comprobado que la adhesión aumenta ligeramente conforme aumentamos el inóculo de partida, principalmente cuando el catéter ha sido previamente incubado con plasma.

El inóculo es un factor importante a la hora de establecer modelos animales de infección. Se define la ID^{90} como la dosis infecciosa necesaria para infectar al 90% de los animales (179,180). Navamar y cols. usó inóculos de 10^6 a 10^8 UFC para infectar ratones neonatales intracerebralmente y establecer el 50% de la dosis letal de las cepas utilizadas (181).

La presencia de cepas más o menos virulentas también implican una variación del inóculo para producir la infección, así, Lowy y cols. (182) emplearon un inóculo de 3.5×10^9 UFC por vía intraperitoneal para producir peritonitis en ratones. Por otro lado Ichiman y Yoshida (183) encontraron 14 cepas de 380 aislados clínicos que produjeron peritonitis con un inóculo de 10^9 .

La presencia de dispositivos intravasculares permite que se establezca una infección con un inóculo más bajo al que sería necesario en ausencia del material protésico (134), este fenómeno puede ser debido a las posibles interferencias que presenta el cuerpo extraño en la eliminación del microorganismo por las defensas del hospedador.

Siempre es importante tener en cuenta que los inóculos utilizados en trabajos “in vivo” que van a ser inyectados en el torrente circulatorio nunca van a coincidir con

el número de bacterias reales que circulan en sangre (184-186) y por tanto el número de microorganismos encontrado en el lugar de la infección será mucho menor debido al fenómeno pasivo de hemodilución y a otro activo de aclaramiento por el sistema retículo endotelial.

3.4. TEMPERATURA

En el cuerpo humano la temperatura se mantiene constante en unos 37°C aproximadamente. Solo en situaciones patológicas como fiebre o en zonas de inflamación se produce un aumento de la temperatura, también pueden surgir situaciones de hipotermia donde la temperatura se encuentra disminuida (31,185,186). Por todas estas circunstancias la temperatura es un factor importante en el estudio de la adherencia.

Hemos observado que la temperatura afectó la adherencia de *S. aureus* al catéter. La máxima adhesión se presentó a los 37°C y la mínima a los 4°C. Con temperaturas de 42°C y 26°C la adhesión fue similar cuando el catéter fue incubado en PBS, en cambio, cuando se incubó con plasma, la adhesión a 42°C disminuyó marcadamente con respecto a la observada con 26°C.

Según estos datos obtenidos se puede establecer que las interacciones de las proteínas plasmáticas con las bacterias se ven afectadas a temperaturas de 42°C y 4°C (estudio de condiciones experimentales) disminuyéndose la adherencia. La baja adhesión que se observa a 4°C, tanto cuando el catéter es incubado con PBS, como con plasma se puede explicar por un descenso de la actividad bacteriana a temperaturas de refrigeración.

3.5. TIEMPO

El depósito de las proteínas plasmáticas sobre las superficies de los catéteres ocurre poco después de la inserción del biomaterial (138). La influencia del tiempo en la adhesión de microorganismos al catéter ha sido estudiada por diversos autores (138,169,149). También ha sido confirmada la estrecha relación que existe entre la colonización del catéter con una duración elevada del tiempo de cateterización (149,169).

Según nuestros datos vemos que la adherencia de las bacterias aumenta considerablemente en un periodo de 60 minutos, en cambio en la segunda hora de incubación apenas hay aumento. También hemos podido comprobar que cuando incubamos con plasma, en un periodo de una hora hay mayor adhesión de las bacterias con respecto a los 30 minutos de exposición. Esto nos lleva a suponer que con 60 minutos se ha producido un mayor depósito de proteínas sobre el catéter facilitando de este modo la existencia de un mayor número de bacterias adheridas.

Estudios hechos con *S.epidermidis* observaron cinéticas distintas de adherencia al biomaterial, Georg Peters y cols (169) determina que después de una hora la superficie polimérica ha sido saturada, en cambio Pascual y cols. (48) que estudió la cinética de dos cepas, una hidrofóbica y otra hidrofílica observó que la adhesión seguía aumentando después de una hora, situación que también encuentra Ambrose y cols. (138) cuando estudió la adherencia de *S.aureus* a catéteres de uretano.

4. EFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS EN LA ADHESION AL CATETER

La adhesión de los microorganismos a superficies constituye un importante acontecimiento iniciador en la patogénesis de la infección bacteriana, antes de la colonización y posterior invasión de estas superficies. Es sabido que la selectividad con la cual las bacterias se unen a superficies celulares, sugiere la existencia de receptores específicos, tanto en la bacteria como en la célula del hospedador, que median la adhesión.

La capacidad de los microorganismos de adherirse no solo es dependiente de la posibilidad de sintetizar la adhesina sino también de expresarla en una configuración accesible en la superficie. También existen otros componentes en la superficie que pueden influir en las propiedades adhesivas de la bacteria por afectar a la hidrofobicidad del microorganismo o por enmascarar las adhesinas.

La relación entre adherencia y antimicrobianos en los estafilococos generalmente coagulasa negativos tiene dos vertientes. Por un lado, algunos antimicrobianos a concentraciones subinhibitorias pueden modificar las propiedades adherentes de estos microorganismos, evitando así una posterior infección y por otro lado como consecuencia de la adherencia bacteriana se forman biocapas (biofilms) en las que quedan incluidos estos gérmenes siendo mucho más difícil su erradicación.

Las sub-CMIs de algunos antimicrobianos ocasionan alteraciones en las superficies bacterianas, dando lugar a cambios en sus propiedades patógenas. En estas bacterias se produce una inhibición de la expresión de adhesinas o la formación de adhesinas aberrantes o la pérdida de su funcionalidad. Estas modificaciones de la superficie de la bacteria casi siempre puede evidenciarse por microscopia electrónica

(187,188).

Se ha sugerido que el mecanismo responsable de estos hechos reside en que se originan alteraciones del metabolismo bacteriano. Tampoco debe descartarse la posibilidad de que el propio antimicrobiano lleve a cabo una desorganización directa de las estructuras superficiales. Cualquiera que sea el mecanismo, el resultado final es la modificación de la capacidad de adherencia de los microorganismos, tanto a células como a superficies inertes.

También se ha intentado relacionar la influencia de las sub- CMI's en la adherencia y en la hidrofobicidad bacteriana. Es decir, comprobar si cuando se producen cambios en la adherencia se modifica de forma paralela la hidrofobicidad bacteriana. Los resultados no han sido uniformes, algunos estudios han constatado que cuando baja la adherencia también disminuye la hidrofobicidad y viceversa (189). Por el contrario otros trabajos no han establecido relación alguna entre estos dos parámetros (153,154,190).

Las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos inducen varios cambios en las capacidades bacterianas tanto "in vitro" como "in vivo", incluyendo cambios morfológicos y ultraestructurales e inhibición o estimulación de la producción de enzimas y toxinas (102,191,192). El estudio de estas concentraciones sobre las interacciones de las bacterias con sus receptores en células del huésped es importante por muchas razones:

-Durante la terapia con antimicrobianos, concentraciones bajas de éstos alcanzan las superficies de células epiteliales y llegan a interferir con la capacidad del microorganismo de colonizar las células del tejido.

-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.

-Durante una profilaxis, la elección del antimicrobiano es importante debido a las interacciones que pueden tener lugar entre bacterias y receptores a concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano.

Los catéteres constituyen una de las causas más frecuentes de infecciones nosocomiales. Según esto parece posible que los antimicrobianos puedan tener un efecto preventivo utilizando dosificaciones adecuadas que permitan conseguir en el interior del organismo sub-CMIs modificadoras de la adherencia. No obstante como siempre existe un cierto riesgo de aparición de microorganismos resistentes (193) en la práctica médica habitual no se ha llevado a cabo.

Las investigaciones sobre este tema se han realizado tanto con estafilococos coagulasa negativos como con otras bacterias, pero los resultados no siempre han sido uniformes. Probablemente las discrepancias entre algunas publicaciones se deban a diferencias metodológicas y a que existen variaciones individuales de las cepas.

La influencia de las sub-CMIs de antimicrobianos en la adherencia a materiales inertes, iguales o similares a los que tienen los dispositivos médicos o quirúrgicos, se han realizado casi siempre con estafilococos, principalmente coagulasa negativos, aunque la mayor parte de las veces se han valorado pocas cepas en cada trabajo. Se trata de un tema interesante sobre el que no existen muchos estudios y donde es frecuente encontrar en la bibliografía resultados diferentes. Además los resultados obtenidos dependen muchas veces de la sub-CMI evaluada.

Trabajos recientes indican que las bacterias una vez colonizan el biomaterial resisten el tratamiento antimicrobiano al que normalmente no son resistentes. En la actualidad se está pensando utilizar la actividad antibacteriana de varios

antimicrobianos en la prevención de la colonización de catéteres. En la actualidad se está pensando utilizar la actividad antibacteriana de los antimicrobianos en la prevención de la colonización de catéteres, incluso se ha desarrollado técnicas donde se utiliza modelos "in vitro" de colonización del catéter para posteriormente valorar la actividad antibacteriana (194).

Al introducir un catéter en el espacio intravascular, rápidamente y de una manera tiempo dependiente se forma una vaina o película de proteínas plasmáticas formada especialmente por fibrina y fibronectina que a su vez sirven de base para la adherencia microbiana y posterior colonización del biomaterial. Como señalamos en la introducción se ha comprobado que la fibronectina es un factor importante que interviene en la colonización de catéteres y otros biomateriales. De hecho las infecciones a partir de catéteres suelen ser causadas por cocos gram positivos, bacterias a las que la fibronectina tiene mayor afinidad. La promoción de la adherencia estafilocócica se muestra especialmente notable en presencia de fibronectina, la cual interactúa con las bacterias a través de puntos de enlace específicos.

La adherencia a catéteres intravasculares no infectados retirados de pacientes aumenta en un grado importante (44), ésto hace pensar que la adhesión mediada por la fibronectina reviste importancia clínica. En cuanto al uso profiláctico de antimicrobianos frente a estas infecciones, en los últimos años asistimos a un gran número de investigaciones en este campo mostrando un interés cada vez mayor. Uno de los primeros trabajos evalúa el uso profiláctico de antimicrobianos sistémicos en la prevención de sepsis relacionada con catéteres de triple lumen en pacientes inmunodeprimidos (131). Este trabajo concluye que el tratamiento con oxacilina disminuye la incidencia de dicha infección.

Se ha demostrado que la impregnación del catéter con rifampicina en combinación con minociclina previene completamente la colonización del biomaterial por *S.epidermidis* y *S.aureus*. Esta combinación fue generalmente más eficaz que otras

combinaciones con rifampicina como por ejemplo vancomicina, clindamicina o novobiocina (194).

Considerando que las concentraciones del antimicrobiano en sangre coinciden en un momento dado con concentraciones subinhibitorias, además que son estas concentraciones las que suelen alcanzar tejidos de difícil acceso y la posible utilización en el futuro de antimicrobianos para prevenir estas infecciones hospitalarias o nosocomiales, cada vez más frecuentes, hacen interesante estudiar el efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la adherencia al biomaterial.

Shibl y cols (195) manifiestan la eficacia de concentraciones subinhibitorias de clindamicina en inhibir la formación del "slime", la producción de hemolisina y la adherencia a catéteres de teflón. En nuestro trabajo nos hemos encontrado que en algunos casos el efecto del antimicrobiano sobre la adherencia de las dos cepas de *S.epidermidis* y *S.aureus* a los dos tipos de catéteres, teflón y vialón, está en relación con el mecanismo de acción de los antimicrobianos.

Por otro lado, el efecto fue independiente de la presencia o no de plasma y fibronectina, de manera que aquellos antimicrobianos que aumentaron la adhesión al catéter incubado con PBS produjeron el mismo efecto sobre el catéter incubado con fibronectina o plasma, aunque con distintos porcentajes de adhesión. También ocurrió lo mismo con aquellos antibacterianos que disminuyeron la adhesión.

Los trabajos realizados sugieren que el efecto del antimicrobiano se ejerce sobre la exposición de las adhesinas bacterianas, sin descartar la posibilidad de que dichos antimicrobianos actúen sobre la hidrofobicidad bacteriana. Lo que nos lleva a suponer que el efecto de las concentraciones subinhibitorias puede extenderse a estos dos parámetros.

Ampicilina y cefotaxima son antimicrobianos que a concentraciones bajas alteran la morfología bacteriana actuando sobre la pared celular, estos cambios ocasionan diferencias topográficas de la superficie (107) que pueden favorecer la expresión de receptores de fibronectina entre otros. Los trabajos de Proctor muestran que concentraciones subinhibitorias aumentan significativamente la adherencia de fibronectina plasmática a distintas cepas de *s.aureus* (196).

Aunque los trabajos de caracterización de receptores de fibronectina en *s.aureus* dan resultados a veces conflictivos queda clara la existencia de una correlación entre el número de receptores expresados en la superficie bacteriana y la fijación de fibronectina (10), por lo que junto al mecanismo de acción de los β -lactámicos pensamos que la ampicilina y cefotaxima produjeron una reorganización a nivel de la pared que aumentó los porcentajes de adhesión.

Un estudio realizado por Charbonneau y cols (197) donde evalúa la teicoplanina en infecciones por estafilococos coagulasa negativos sugiere que la teicoplanina y vancomicina presentan una eficacia similar en el tratamiento de estas infecciones y una incidencia de efectos adversos también similar, aunque un estudio multicéntrico (198) observó que la teicoplanina combinada con la netilmicina ocasionó una menor nefrotoxicidad que la asociación de la vancomicina y la netilmicina. Estos estudios nos muestran la gran importancia clínica y bacteriológica frente a estafilocos de este antimicrobiano.

Romano y cols (199) comprobó que segmentos de 1cm de un catéter intravenoso central recubiertos de teicoplanina prevenían la formación de abscesos de *S.aureus*. En nuestro estudio, este antimicrobiano presentó un comportamiento variable incluso dentro de la misma especie bacteriana estudiada. Cuando *S.aureus* ATCC se trató con sub-CMIs de teicoplanina se observó un descenso de adhesión, con el aislamiento clínico se vió un aumento cuando el catéter fue tratado previamente con plasma o con fibronectina,

en el caso de *S.epidermidis* se pudo apreciar un aumento tanto con el aislado clínico como con la cepa de colección. A la vista de estos resultados se necesitaría un estudio más amplio, con más cepas de colección y más aislados clínicos. También sería interesante ver este efecto con otro glicopéptido como la vancomicina.

Concentraciones subinhibitorias de azitromicina provocó en *S.aureus* un aumento de adhesión, a diferencia que en *S.epidermidis* que la disminuyó, para poder valorar si este efecto es específico de este antimicrobiano o por el contrario es propio del grupo sería interesante el estudio de este efecto en eritromicina u otro macrólido, considerando que la azitromicina es el primer representante del grupo de los azálidos.

En cambio tetracilina, clindamicina y norfloxacino son antimicrobianos que actúan interfiriendo la replicación bacteriana al bloquear la DNA-girasa o bien inhibiendo la síntesis de proteínas entre las que se pueden encontrar receptores de fibronectina. Doran y Rissin (141) muestran que concentraciones subinhibitorias de clindamicina y otros antibacterianos que afectan la síntesis proteica inhiben las interacciones de la fibronectina libre con *s.aureus*. A estas concentraciones los efectos de los antimicrobianos se manifiestan con la desaparición de proteínas de superficie debido a la falta de producción o exposición. Pascual y cols (200) presentan datos que demuestran que clindamicina produce un descenso de la adhesión de *S.epidermidis* a catéteres de teflón del 30%-80% según la sub-CMI .

Concentraciones subinhibitorias de antibacterianos son eficaces no solamente en infecciones por catéteres sino también impidiendo la adhesión de bacterias a huesos comprometidos y prótesis. Según Gemmelle (108) la interferencia con la adherencia al material protésico está condicionada por alteraciones en la expresión de adhesinas. En otro modelo experimental donde el efecto de antimicrobianos en la prevención de la colonización microbiana de catéteres se realizó a concentraciones superiores a la CMI de rifampicina, clindamicina y minociclina se observó una bajada en la capacidad

adhesiva de *S.aureus* (194).

En cambio kanamicina induce efectos pleotrópicos en la célula bacteriana incluyendo inhibición de la formación de la membrana plasmática, de la replicación del DNA o de la función ribosómica por unión a uno o más lugares del ribosoma bacteriano provocando un bloqueo de la síntesis proteica o bien una producción de proteínas extrañas por errores en la traducción del m-RNA. En nuestro estudio este antimicrobiano no afectó a la adhesión de ninguna de las cepas de *S.epidermidis* y *S.aureus* ensayadas. La explicación podría basarse en una inhibición selectiva de un mecanismo de acción independiente de la actuación ribosómica. Un trabajo mostró que los aminoglucósidos a concentraciones subinhibitorias aumentan ligeramente la adhesión de *s.aureus* a fibronectina fija (201), aunque con menos grado que la bencilpenicilina, además es posible que las fuerzas fisico-químicas como las interacciones hidrofóbicas y la interacción electroestática puedan desempeñar algún papel en los efectos observados.

Podemos considerar que la sepsis relacionada con catéteres ha sido una fuente importante de morbilidad en pacientes con catéteres intravasculares centrales, oscilando los rangos de infección en catéteres multilúmenes entre un 3.1% y un 19% (68,69). Son muchos los factores implicados en estas infecciones, entre ellos la contaminación del lugar de inserción, la migración de microorganismos de la piel a lo largo del catéter, contaminación del extremo del catéter, contaminación de los líquidos de infección, entre otros. Muchos métodos para determinar la infección han sido analizados, se han descrito métodos estandares de inserción y cuidado de los catéteres.

El uso de antimicrobianos tópicos en el sitio de inserción del catéter ha demostrado una capacidad de protección marginal frente a infecciones relacionadas con catéteres. Sobre los años 90 se pensó en el uso de antimicrobianos sistémicos para prevenir este tipo de infecciones. Uno de los trabajos hechos por Bock y cols en 1990

evalúa el uso de antibacterianos como medida profiláctica (131). Michel y cols (202) examinó los efectos de distintas variables sobre la contaminación de catéteres y la sepsis y no encontró diferencias entre pacientes que recibieron antimicrobianos sistémicos y los que no. Damen y cols (203) observaron una disminución en la incidencia de la contaminación de catéteres en pacientes que recibieron profilaxis con cefalotina durante su hospitalización por operación a corazón abierto.

Son muy pocos los trabajos que estudian el efecto de sub-CMIs sobre la adhesión de *S.epidermidis* y *s.aureus* a catéteres o biomateriales. En los trabajos de Guggenbichler y cols (132) se observó que los β -lactámicos producían un descenso del número de microorganismos adheridos al catéter, lo que supone una contradicción con nuestros resultados, habría que tener en cuenta que los métodos utilizados son distintos, mientras ellos tratan el catéter ya infectado con concentraciones superiores a la CMI en nuestro trabajo se crecen las bacterias con sub-CMIs antes de entrar en contacto con el catéter. Nuestros resultados sugieren que los estafilococos en presencia de sub-CMI de antimicrobianos tienen la capacidad de adherirse alterada, de manera que se encuentra aumentada con sub-CMI de β -lactámicos, disminuída con tetraciclina, norfloxacino, clindamicina y no se ve afectada con kanamicina.

VI. CONCLUSIONES

1- La adherencia de *S.aureus* a catéteres de vialón y teflón depende directamente del tipo de material y de la incubación o no con plasma o fibronectina purificada.

2- La adherencia de *S.epidermidis* no se ve afectada por la incubación del cáteter con plasma o fibronectina purificada.

3- La eliminación de la fibronectina del plasma o del suero disminuye la adherencia de *S.aureus* al catéter. Este descenso presenta una media de 45,3%.

4- La incubación previa del catéter con fibronectina purificada favorece significativamente la adherencia de *S.aureus*.

5- La fibronectina promueve la adherencia estafilocócica a los catéteres con una relación dosis dependiente y saturable a partir de 12.5 $\mu\text{g/ml}$.

6- El inóculo bacteriano influye ligeramente sobre adherencia estafilocócica al catéter, aumentándose ésta conforme aumenta el inóculo. La temperatura también afecta los porcentajes de adhesión apreciándose el máximo a los 37°C.

7-El tiempo de exposición del catéter a proteínas plasmáticas y a bacterias influye positivamente sobre la adherencia de *S.aureus*.

8- Concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos intervienen sobre la adherencia de *S.aureus* y *S.epidermidis* a los catéteres de vialón y teflón. Algunos como los β -lactámicos aumentan dicha adherencia, otros como clindamicina y norfloxacino la disminuyen, mientras que kanamicina no la modifica.

VII. BILIOGRAGIA

1. **Morrison PR, Edsall JT, Miller SG.** Preparation and properties of serum and plasma proteins XVII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J Am Chem Soc* 1948; 70: 3103.
2. **Wolff I, Timpl R, Pecker I, Steffen C.** A two-component system of human serum agglutinating gelatin-coated erythrocytes. *Vox Sanguinis* 1967; 12: 443.
3. **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.
4. **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.
5. **Keski-Ojal J.** Polimerization of a major surface-associated glycoprotein, fibronectin in cultured fibroblast. *Febs Letters* 1976; 71: 325.
6. **Mosher DF.** Physiology of fibronectin. *Annu Rev Med* 1984; 35: 561-75.
7. **Hynes R.** Molecular biology of fibronectin. *Annual Review Cell of Biology* 1985; 1: 67-90.
8. **Vartio T.** Disulfide bonded polymerization of plasma fibronectin in the presence of metal ions. *J Biol Chem* 1986; 261: 9433-7.
9. **Simpson WA, Courtney HS, Ofek I.** Interactions of fibronectin with streptococci: the role of fibronectin as a receptor for *Streptococcus pyogenes*. *Rev Infect Dis* 1987; 9 (Suppl 4): S351-S359.
10. **Proctor RA.** The sataphylococcal fibronectin receptor: Evidence for its importance

in invasive infections. Rev of Infect Dis 1987; 9 (Suppl 4): S335-S340.

11. Skerl KG, Calderone RA, Segal E, Sreevalsan T, Scheld WM. In vitro binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. Can J Microbiol 1984; 30: 221-227.

12. Ouaisi MA, Carnette JC, Caprow A. *Tripanosoma cruzi*: modulation of parasite-cell. interaction by plasma fibronectin. Eur J Immunol 1985.

13. Wyler DJ. Fibronectin in parasitic diseases. Rev Infect Dis 1987; 9 (Suppl 4): S391-S399.

14. Kornblihtt AR, Vibe-Pederson K, Baralle FE. Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structure domain. EMBO J 1984; 3: 221-6.

15. 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.

16. Hynes R. Molecular biology of fibronectin. Ann Rev Cell Biol 1985; 1: 67-90.

17. 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.

18. Mosher DF, William EM. Fibronectin concentration is decreasee in plasma of severly ill patients with disseminated intravascular coagulation. J Lab Clin Med 1978; 91: 729-35.

19. Scott DL, Wainwright AC, Walton WK, Williamson N. Significance of fibronectin in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Ann Rheum Dis 1981; 40: 142.

20. Mosher DF. Fibronectin. Prog Hemost Thromb 1980; 5: 111-51.

- 21. Akiyama SK, Yamada RM, Hayashi M.** The structure of fibronectin and its role in cellular adhesion. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry* 1981; 16: 345-58.
- 22. Grinnel F.** Fibronectin and wound healing. *J Cell Biol* 1984; 26: 107-16.
- 23. 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.
- 24. Pumarola A.** Staphylococcus. In: Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García Rodríguez JA, Piédrola Angulo G (eds), *Microbiología y Parasitología Médica*. 2ª edición. Salvat editores S.A. pp 333-52.
- 25. Goldmann DA, Pier G.** Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 176-192.
- 26. Rupp ME, Archer GL.** Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 231-245.
- 27. Kloos WE, Bannerman TL.** Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 117-140.
- 28. Kloos W, Lambe DW.** Staphylococcus. In: Balows A, Hausler Jr W, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy JH (eds). *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology. 5th edition, Washington, D.C pp 222-37.
- 29. Arbuthnott JP.** Staphylococcus. Skin and wound infections; abscess; osteomyelitis; food poisoning. In: *Medical Microbiology*. 40th edition, ed. Greenwood D, Slack R, Penzance J. Churchill Livingstone. pp: 203-10.
- 30. Sheagren JN.** *Staphylococcus aureus* the persistent pathogen. *New Engl J Med*

1984; 310: 1437-12.

31. Waldvogel F. New insights into septic and toxic diseases produced by *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1995; 8(Suppl 1): S3-S6.

32. Espersen F, Clemmensen I, Barkholt V. Isolation of *Staphylococcus aureus* clumping factor. *Infect Immun* 1985; 49: 700-8.

33. Mosher DF, Proctor RA. Binding and factor XIIIa mediated cross-linking of a 27 kilodaltons fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*. *Science* 1980; 209: 927-9.

34. Aly R, Levit S. Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. *Rev Infect Dis* 1987; 9: (SUPPL 4) S341-50.

35. Proctor RA, Christman G, Mosher DF. Fibronectin-induced agglutination of *Staphylococcus aureus* correlates with invasiveness. *J Lab Clin Med* 1984; 104: 455-69.

36. Proctor RA, Mosher DF, Olbrantz PJ. Fibronectin binding to *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1982; 257: 14788-94

37. Espersen F, Clemmensen I. Clumping of *Staphylococcus aureus* by human fibronectin. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1981; 89: 317-21.

38. Kuusela P. Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature* 1978; 276: 718-20.

39. Minhas T, Ludlam HA, Wilks M and Tabaqchali S. Detection by PCR and analysis of the distribution of a fibronectin-binding protein gene (*fbn*) among staphylococcal isolates. *J Med Microbiol* 1995; 42: 96-101.

40. Maxe I, Rydén C, Wadström T, Rubin K. Specific attachment of *Staphylococcus aureus* to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 1986; 54: 695-704.

- 41. 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.
- 42. Vann JM, Proctor RA, Mosher DF.** Morphological studies of fibronectin binding to *Staphylococcus aureus*. In: Program and Abstract of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, DC 1984.
- 43. Proctor RA.** The staphylococcal fibronectin receptor: Evidence for its importance in invasive infections. *Rev Infect Dis* 1987; 9: (SUPPL 4) S335-40.
- 44. Vaudaux P, Pittet D, Haerberli A, Huggler E, Nydegger UE, Lew DP and Waldvogel A.** Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis* 1989; 5: 865-875.
- 45. Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdreau F, Peters G and Waldvogel FA.** Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 1988; 4: 693-701.
- 46. Vaudaux PE, Lew DP and Waldvogel FA.** Host factors predisposing to foreign body infections. In : Bisno AL and Waldvogel FA (eds), *Infections associated with indwelling medical devices*. American Society for Microbiology, Washington DC 1989; 3-26.
- 47. Russell PB, Kline J, Teder MC and Polin RA.** Staphylococcal adherence to polyvinylchloride and heparin bonded polyurethane catheters is species dependent and enhanced by fibronectin. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1083-1087.
- 48. Pascual A, Fleer A, Westardal NAC, Verhoef J.** Modulation of adherence of coagulase negative staphylococci to teflon catheters in vitro. *Eur J Clin Microbiol* 1986;

5: 518-522.

49. Espersen F, Wilkinson BJ, Gahrn-Hansen B, Rosdahl VT and Clemmensen I. Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *APMIS* 1990; 98: 471-478.

50. Vaudaux PE, Waldvogel FA, Morgenthaller JJ and Nydegger UE. Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *Staphylococcus aureus* adherence. *Infect Immun* 1984; 45: 768-774.

51. Maki DG. Infections associated with intravascular lines. In Remington JS and Swartz MN (eds), *Current clinical topics in infectious diseases*. McGraw-Hill Books Co., New York 1982: 309-363.

52. Vaudaux PE, Waldvogel FA, Morgenthaller JJ and Nydegger UE. Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *Staphylococcus aureus* adherence. *Infect Immun* 1984; 45: 768-774.

53. Grinnell F and Feld MK. Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity. *J Biomed Mater Res* 1981; 15: 363-381.

54. Grinnell F and Feld MK. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem* 1982; 257: 4888-4893.

55. Klebe RJ, Bentley KL and Schoen RC. Adhesive substrates for fibronectin. *J Cell Biol* 1981; 109: 481-488.

56. Hedman D, Johansson S Vartio T, Kjellen L, Vaheri A and Höök M. Structure of the extracellular matrix: association of heparan and chondroitin sulfates with fibronectin-procollagen fibers. *Cell* 1983; 28: 663-671.

57. Bernard RW, Stahl WM. Subclavian vein catheterization: a prospective study I.

Non infectious complications. *Ann Surg* 1971; 173: 184-190.

58. Christenson KH, Nerstrom B, Baden N. Complications of percutaneous catheterization of the subclavian vein in 129 cases. *Acta Chir Scand* 1967; 133: 615-620.

59. Feliciano DV, Mattox KL, Graham JM. Mayor complications of percutaneous subclavian vein catheters. *Am J Sug* 1979; 138: 869-874.

60. Merk EA, Rush BF. Emergency subclavian vein catheterization and intravenous alimentation. *Am J Surg* 1975; 129: 266-268.

61. Mogil Ra, De Laurentis DA, Rosemond GP. The infraclavicular venipuncture. *Arch Surg* 1967; 95: 320-324.

62. Press OW, Ramsey PG, Larson EB, Fefer A. Hickman catheter infections in patients with malignancies. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63: 189-200.

63. León Gil C y Castro de la Nuez P. Infección relacionda con catéteres y otros dispositivos intravasculares. *Rev Clin Esp* 1994; 4: 853-859.

64. Pruitt BA, McManus WF, Kim SH. Diagnosis and treatment of cannula-related intravenous sepsis in burn patients. *Ann Surg* 1980; 191: 546-553.

65. Band JD, Maki Dg. Steel needles used for intravenous therapy. Morbidity in patients with haematologic malignancy. *Arch Intern Med* 1980; 140: 31-34.

66. Michel L, McMichan JC, Bachy JL. Microbial colonization of indwelling central venous catheters: statistical evaluation of potential contaminating factors. *Am J Surg* 1979; 137:745-748.

67. Lindblad B, Woff T. Infectious complications of percutaneously inserted central

venous catheters. *Acta Anaesthesiol Scand* 1985; 29: 587-589.

68. Kelly Cs, Ligas JR, Smith CA. Sepsis due to triple lumen central venous catheters. *Surg Gynecol obstet* 1986; 163: 14-16.

69. McCarthy MC, Shives JK, Robison RJ. Prospective evaluation of single and triple lumen catheters in total parenteral nutrition. *JPEN* 1987; 11 259- 262.

70. Gil RT, Kruse JA, Thill-BAharozian MC, Carlson RW. Triple-vs single-lumen central venous catheters. A prospective study in a critically ill population. *Arch Intern Med* 1989; 149: 1139-1143.

71. Maki DG, Wheeler SJ, Stolz SM, Mermel LA. Clinical trial of a novel antiseptic central venous catheter (Abs 1624). In: Program and abstracts of the 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, DC 1991.

72. Clemence MA, Jernigan JA, Titus MA. A study of an antiseptic impregnated central venous catheter for prevention of blood-stream infection (Abs 1624). In: Program and abstracts of the 33 rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology Washington DC 1993.

73. Bach A, Geiss M, Geiss HK, Sonntag HG. Prevention of catheter-related colonization by silver-sulfadiazine-chlorhexidine bondign: results of a pilot study in critical care patients (Abs 1621). In: Program and abstracts of the 33 rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology Washington DC 1993.

74. Greenfeld J, Sampath L, Baradarian R. Intravascular placement of silver sultadiazine-chlorhexidine impregnated catheters in swine: evaluation of biofilm formation and bacterial adherence (Abs 1620). In: Program and abstracts of the 33 rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society

for Microbiology Washington DC 1993.

75. Mermel LA, McCormick RD, Springman SR, Maki DG. The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary artery Swan-Ganz catheteres: a prospective study utilizing molecular sbtyping. *Am J Med* 1991; 91(Suppl 3B): 197-205.

76. Mermel LA. Prevención de infecciones asociadas a catéteres intravasculares. *Infect Dis Clin Pract Ed Esp* 1995; 1: 53-60.

77. Raad II, Umphrey J, Khan A, Truett LJ, Bodey GP. The duration of placement as a predictor of peripheral and pulmonary arterial catheter infections. *J Hosp Infect* 1992; 23: 17-26.

78. Coob DK, High Kp, Sawyer RG, Sable CA, Adams RB, Lindley DA. A controlled trial of scheduled replacement of central venous and pulmonary-artery catheters. *N Engl J Med* 1992; 327: 1062-1068.

79. Cleri DJ, Corrado ML, Deligman SJ. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *J Infec Dis* 1980; 141: 781-786.

80. Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med* 1987; 146: 837-877.

81. Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J, Pérez JL, Martín R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study using quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol* 1985; 21:357-360.

82. Spencer RC, Kristinsson KG. Failure to diagnose intravascular associated infection by direct Gram-staining of catheter segments. *J Hosp Infec* 1986; 7: 305-306.

- 83. Raad II, Baba M and Bodey GP.** Diagnosis of catheter-related infections: The role of surveillance and targeted quantitative skin cultures. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 593-597.
- 84. LR117-Basille BA, Easley KA, Hall Gs, Washington JA.** Comparison and revised isolator blood culture tubes. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2221-2222.
- 85. Hoyle BD.** The biofilm Glycocalix as a resistance factor. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 1-6.
- 86. Passerini L, Lam K, Costerton JW, King EG.** Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit Care Med* 1992; 20: 665-673.
- 87. Jarvis WR.** Nosocomial outbreaks: the centers for Disease control's hospital infections program experience, 1980-1990. *Am J Med* 1991; 91(Suppl B): 101S-106S.
- 88. Graham M.** Frequency and duration of handwashing in an intensive care unit. *Am J Infect control* 1990; 18: 77-81.
- 89. Maki DG.** Infections due to infusion therapy. In: Bennett JV and Brachman PS (eds), *Hospital infections*, 3rd Ed. Little, Brown and Co, Boston 1992; 849-898.
- 90. Maki DG.** Infections associated with intravascular lines. In: Remington JS, Swartz MN (eds) *Current clinical topics in infectious diseases*. Vol 3 MacGraw Hill Co Nueva York 1982; 309-363.
- 91. Hamory BH.** Nosocomial bloodstream and intravascular device-related infections, en Wenzel RP (ed), *prevention and control of nosocomial infections*. Williams and Wilkins. Baltimore 1987; 283-319.
- 92. Powell DA, Hayes J, Durrell DE, Miller M, Marco M.** *Malassezia furfur* skin colonization of infants hospitalized in intensive care units. *J Pediatr* 1987; 111: 217-220.

93. **Allo MD, Miller J, Townsend T, Tan C.** Primary cutaneous aspergillosis associated with Hickman intravenous catheters. *N Engl J Med* 1987; 317: 1105-1108.
94. **Riebel W, Frantz N, Adelstein D, Spagnuolo PJ.** *Corynebacterium JK*: a cause of nosocomial device-related infection. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 42-49.
95. **Cabone XM, Heinrich MC, Quinn TC.** Thrombophlebitis and cellulitis due to *Campylobacter fetus ssp fetus*. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64: 244-250.
96. **Annaissie E, Fainstein V, Miller P.** *Speudomonas putida*. Newly recognized pathogen in patients with cancer. *Am J Med* 1987; 82: 1191-1194.
97. **Flynn PM, Van Hooser, Gigliotti F.** Atypical mucobacterial infections of Hickman catheter exit sites. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 510-513.
98. **Kiehn TE, Nelson PE, Bernard EM, Edwards FF, Koziner D, Armstrong D.** Catheter-associated fungemia caused by *Fusarium chlamydosporum* in a patient with lymphocytic lymphoma. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 501-504.
99. **Schwartz C, Henrickson KJ, Roghmann K, Powell K.** Prevention of bacteremia attributed to luminal colonization of tunneled central venous catheters with vancomycin-susceptible organisms. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1591-1597.
100. **Henrickson KJ, Dunne WM.** Modification of central venous catheter flush solution improves in vitro antimicrobial activity. *J Infect Dis* 1992; 166: 944-946.
101. **Neu HC.** The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 1992; 257: 1064-1072.
102. **Levy SB.** Confronting multidrug resistance. A role for each of us. *JAMA* 1993; 269:1840-1842.

103. Lorian V, Gemmel CG. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses. In: Lorian V, Williams and Wilkins (eds), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edition, Baltimore. pp. 493-555.

104. 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.

105. Van Den Broek PJ. Antimicrobial drugs, microorganisms, and phagocytes. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 213-39.

106. Lorian V, et al. Weight and morphology of bacteria exposed to antibiotics. In: Giliissen G, Hahn H and Obferkuch W (eds), *The influence of antibiotics on the host-parasite relationship*. Springer-Verlag, Berlin 1985; 65-72.

107. Lorian V. In vitro stimulation of in vivo conditions, physical state of the culture medium. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2403-7.

108. Gemmell CG. Antibiotics and the expression of staphylococcal virulence. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 283-291.

109. Lorian V. Antibiotiques a concentrations subinhibitrices: effect sur la morphologie et la croissance. *Pathol Biol* 1977; 25: 291-8.

110. Lorian V. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Curr Chemother* 1978; 1: 72-8.

111. Lorian V. Phagocytosis of staphylococci after exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16: 129-33.

112. Lorian V and Atkinson B. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on cross-wells of cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9: 1043-55.

- 113. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A.** Farmacología humana. Tomo II. 1988; 893-912.
- 114. 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.
- 115. Velasco A, Lorenzo P, Serrano JS, Andrés-Trelles F.** Velazquez Farmacología. 16 edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill 1993; 957-962.
- 116. Simons C, Stille W, Perea AJ.** Tetraciclina. In: Manual de terapeutica antimicrobiana. 1ed. Salvat. pp 162-70.
- 117. Velasco A, Lorenzo P, Serrano JS, Andrés-Trelles F.** Velazquez Farmacología. 16 edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill 1993; 976-983.
- 118. Velasco A, Lorenzo P, Serrano JS, Andrés-Trelles F.** Velazquez Farmacología. 16 edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill 1993; 987-991.
- 119. Simons C, Stille W, Perea AJ.** Kanamicina. In: Manual de terapeutica antimicrobiana. 1ed. Salvat. pp 188,189.
- 120. Velasco A, Lorenzo P, Serrano JS, Andrés-Trelles F.** Velazquez Farmacología. 16 edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill 1993; 966-974.
- 121. Golstein EJC.** Nprfloxacin, a fluoroquiniloneantibacterial agent: classification, mechanism of action, and in vitro activity. *Am J Med* 1987; 82 (6B): 3-17.
- 122. 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.

123. Davey PG, Williams AH. Teicoplanin monotherapy of serious infections caused by gram-positive bacteria: a reevaluation of patients with endocarditis or *Staphylococcus aureus* bacteraemia from an european open trial. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27(Suppl B): 43-50.

124. Simons C, Stille W, Perea AJ. Clindamicina. In: *Manual de terapeutica antimicrobiana*. 1ed. Salvat. pp 217-9.

125. Maki DG. Risk of infection with peripheral iv catheters made of polyuretane vs teflon .(Abs 267) 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Los Angeles 1988.

126. Tully JL, Friedland GH, Baldini MA, Goldman DA. Complications of intravenous therapy with needles and teflon catheters. *Am J Med* 1981; 70: 702-706.

127. López-López G, Pascual A y Perea EJ. Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *J Med Microbiol* 1991; 34: 349-353.

128. Maki DG, Goldman DA, Rhame FS. Infection control in intravenous therapy. *Ann Inter Med* 1973; 79: 867- 887.

129. Elliot TSJ. Intravascular-device Infections. *J Med Microbiol* 1988; 27: 161-167.

130. Hampton AA, Sherertz RJ. Vascular-Access Infections in hospitalized patients. *Surg Clin North Am* 1988; 68: 57-71.

131. Bock SN, Lee RE, Fisher B, Rubin JT, Schwartzentruber DJ, Wei JP, Callender DPE, Yang JC, Lotze MT, Pizzo PA and Rosenberg SA. A prostective randomized trial evaluating Prophylactic antibiotics to prevent triple-lumen catheter-related sepsis in patients treated with immunotherapy. *J clin Oncol* 1990; 1: 161-169.

- 132. Guggenbichler JP, Berchtold D, Allerberger F, Bonatti H, Hager J, Pfaller W, Dierich MP.** In vitro and in vivo effect of antibiotics on catheters colonized by staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 5: 408-415.
- 133. Velazco MI, Waldvogel FA.** Monosaccharide Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to human solid-phase fibronectin. *J Infect Dis* 1987; 5: 1069-1071.
- 134. Martínez E, Rello J, Coll P y Verger G.** Infecciones asociadas a catéteres intravasculares. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 6: 361-374.
- 135. Grace ET and Robert PG.** An Overview of Nosocomial Infections, Including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993; 4: 428-442.
- 136. Arnow PM, Quimosing EM and Beach M.** *Clin Infect Dis* 1993; 16: 778-784.
- 137. Maradona JA, López Alonso J, Carton JA, Pérez Gonzalez F, García velasco G y Arribas JM.** Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en adultos relacionada con el empleo de catéteres o dispositivos intravasculares. *Rev Clín Esp* 1987; 3: 147-150.
- 138. Ambrose L, Cheung and Fischetti VA.** The role of fibrinogen in staphylococcal adherence to catheters in vitro. *J Infect Dis* 1990; 161: 1177-1185.
- 139. Toy PTC, Lai LW, Drake TA, Sande MA.** Effect of fibronectin on adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrin thrombi in vitro. *Infect Immun* 1985; 48: 83-6.
- 140. Shibl AM.** Effect of antibiotics on adherence of microorganisms to epithelial cell surfaces. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 51-65.
- 141. Doran JE, Rissing JP.** Influence of clindamycin on fibronectin-staphylococcal interactions. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12 (Suppl, C): 75-83.

- 142. Gristina AG and Rovere GD.** An in vitro Study of the effects of metals used in internal fixation on bacterial growth and dissemination. *J Bone Joint Surg* 1963; 45A: 128-134.
- 143. Gristina AG, Rovere GD, Shoji H.** An invitro study of bacterial response to inert and reactive metals and to methyl metacrylate. *J Biomed Mater Res* 1976; 10: 273-281.
- 144. Gristina AG, Costerton JW, Leake E.** Bacterial colonization of biomaterials: Clinical and laboratory studies. (Abst) *Orthop Trans* 1980; 4: 405
- 145. Rupp ME, Archer GL.** Coagulase-negative Staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 231-345.
- 146. Richet H, Gubert B, Nitemberg G.** Prospective multicenter study of vascular-catheter-related complications and risk factors for positive central-catheter cultures in intensive care unit patients. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2520-2525.
- 147. Raad II, Sabbagh MF.** Optimal duration of therapy for catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteriemia a study of 55 cases and review. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 75-82.
- 148. Locci R, Peters G and Pulverer.** Microbial colonization of Prosthetic devices. I Microtopographical characteristics of intravenous catheters as detected by Scanning Electron Microscopy. *Zbl Bakt Hyg* 1981; (I. Abt. Oring B) 173: 285-292.
- 149. Locci R, Peters G and Pulverer.** Microbial colonization of Prosthetic devices. III Adhesion of staphylococci to lumina of intravenous catheters perfused with bacterial suspensions. *Zbl Bakt Hyg* 1981; (I. Abt. Oring B) 173: 300-307.
- 150. Hogt AH, Dankert J, De Vries JA, Feijen J.** Adhesión of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *J Gen Microbiol* 1983; 129: 2959-2968.

- 151. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE.** Factors governing adherence to candida species to plastic surfaces. *Infect Immun* 1985; 50: 97-101.
- 152. Ludwicka A, Jansen B, Wadstrom T, Pulverer G.** Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. *Zentralb Bakteriell Hyg* 1984; A 256: 479-489.
- 153. Martínez-Martínez L, Pascual A, Giglio G, Perea EJ.** Efecto de concentraciones subinhibitorias de betalactámicos en la producción de slime, la hidrofobicidad de superficie y la adherencia de *Staphylococcus epidermidis*. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 1991; 9: 543-546.
- 154. Sánchez G, Pascual A, Martínez-Martínez L.** Evaluación de dos métodos de estudio de la producción de slime por cepas de estafilococo coagulasa negativo. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1989; 7: 252-254.
- 155. Dewry DT, Galbraith L, Wilkinson BJ, Wildinson SG.** Staphylococcal slime: a cautionary tale. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1292-1296.
- 156. Hussain M, Hastings JGM, White PJ.** Isolation and composition of the extracellular slime made by coagulase-negative staphylococci in a chemical defined medium. *J Infect Dis* 1991; 16: 534-541.
- 157. Martínez-Martínez L, Pascual A.** Producción de slime por *S. epidermidis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; 9: 519-522.
- 158. Quie PG, Belani KK.** Coagulase-negative staphylococcal adherence and persistence. *J Infect Dis* 1987; 156: 543-572.
- 159. Christensen GD, Baddour LM, Simpson WA.** Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. *Infect Immun* 1987; 55: 2870-2877.

- 160. Christensen GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA, Beachey EH.** Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1983a; 18: 258-269.
- 161. Davenport DS, Massanari RM, Pfaller MA, Bale MJ, Streed SA, Hierholzer WJ.** Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative *Staphylococcus*. *J Infect Dis* 1986; 153: 332-339.
- 162. Diaz-Mitona F, Harding GKM, Hoban DJ, Roberts RS, Lw DE.** Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 1987; 156: 555-560.
- 163. Dunne WM Jr, Nelson DB, Chusid MJ.** Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 1031-1035.
- 164. Ishak MA, Groschel DHM, Mandell GL, Wenzel RP.** Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 1025-1029.
- 165. Martínez-Martínez L, Pascual A.** Producción de slime por *Staphylococcus epidermidis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; 9: 519-522.
- 166. Falcieri, Vaudaux P, Huggler E, Lew D and Waldsvogel F.** Role of bacterial exopolymers and host factors on adherence and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in foreign body infection. *J Infect Dis* 1987; 155: 524-531.
- 167. Johnson GM, Lee DA, Regelman WE, Gray ED, Peters G, Quie PG.** Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. *Infect Immun* 1986; 54: 13-20.

- 168. Peters G.** New considerations in the pathogenesis of coagulase-negative staphylococcal foreign body infections. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21 (Supl. C): 139-148.
- 169. Peters G and Pulverer.** Pathogenesis and management of *Staphylococcus epidermidis* "plastic" foreign body infections. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14 (Supl. D): 67-71.
- 170. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL and Beachey EH.** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 1: 318-326.
- 171. Hoshal VL, Ause FG and Hoskins PA.** Fibrin sleeve formation on indwelling subclavian central venous catheters. *Arch Surg* 1971; 102: 353-358.
- 172. Baddour LM, Christensen GK, Simpson WA, Beachey EH.** Microbial adherence. In: Mandell GL, Douglas Rjr, Bennett JE, (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, Churchill Livingstone, 1990; 9-25.
- 173. Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJB.** Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev* 1990; 54: 75-87.
- 174. Flock JI, Froman G, Guss B, Signas C, Nilsson B, Raucci G, Hook M, Waldston T and Lindberg M.** Cloning and expression of the gene for fibronectin-binding from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* 1987; 6: 2351-2357.
- 175. Muller E, Takeda S, Goldmann DA and Pier GB.** Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect Immun* 1991; 9: 3323-3326.
- 176. Vaudaux P, Pittet D, Haerberli A, Lerch PG, Morgenthaler JJ, Proctor RA, Waldvogel FA and Lew DP.** Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J Infect Dis* 1993; 167: 633-641.

- 186. Eykyn SJ, Gransden WR, Phillips I.** The causative organisms of septicaemia and their epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25 (Suppl C): 41-58.
- 187. Loubeyre C, Desnottes JF, Moreau N.** Influence of sub-inhibitory concentrations of antibacterials on the surface properties and adhesion of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 37-45.
- 188. Reid G, Sharma S, Advikolanu K, Tieszer C, Martín RA, Bruce AW.** Effects of ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin on in vitro adhesion and survival of *Pseudomonas aeruginosa* AK1 on urinary catheters. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1490-1495.
- 189. Schadow KH, Simpson WA, Christensen GD.** Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *J Infect Dis* 1988; 157: 71-7.
- 190. Carbonero MJ, Pascual A, Martínez-Martínez L, Perea EJ.** Capacidad de adherencia y características de superficie de *Staphylococcus epidermidis* y *S.saprofiticus*. *Enf Infecc Microbiol Clín* 1989; 7: 20-4.
- 191. 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.
- 192. 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.
- 193. Zhanel GG, Nicolle LE.** Effect of subinhibitory concentrations (Sub-MICs) on in-vitro bacterial adherence to uroepithelial cells. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 617-27.

- 194. Raad I, Darouiche R, Hachem R, Sacilowski M and Bodey GP.** Antibiotic and prevention of microbial colonization of catheters. *Antimicrob Agents and Chemother* 1995; 11: 2397-2400.
- 195. Shibl AM, Ramadan MA, Tawfik AF.** Differential inhibition by clindamycin on slime formation, adherence to teflon catheters and hemolysin production by *Staphylococcus epidermidis*. *J Chemother* 1994; 2: 107-110.
- 196. Proctor RS, Olbrantz PJ, Mosher DF.** Subinhibitory concentrations of antibiotics alter fibronectin binding to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24: 823-26.
- 197. Charbonneau P and Garaud JJ.** Overview of infections due to coagulase-negative staphylococci and evaluation of teicoplanin in their management. Phillips I ed. Focus on coagulase-negative staphylococci. International Congress and Symposium 1989 series 151.
- 198. Charbonneau P, Garaud JJ, Aubertin J, Bazin C, Brunet F, Domart Y.** Efficacy and safety of teicoplanin plus netilmicin compared to vancomycin plus netilmicin in the treatment of sever infections. Proceedings of the 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, DC 1987.
- 199. Romano G, Berti M, Goldstein BP, Borghi A.** Efficacy of a central venous catheter (Hydrocath) loaded with teicoplanin in preventing subcutaneous staphylococcal infection in the mouse. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993; 3: 426-433.
- 200. Pascual A, Fler A, Westerdaal NA, Verhoef J.** Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters in vitro. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5: 518-522.

- 201. Miyake Y, Kohada A, Fujii I, Sugai M, Suginaka H.** Aminoglicosides enhance the adherence of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells. J Antimicrob Chemother 1989; 23: 79-86.
- 202. Michel L, McMichan JC, Bachy JL.** Microbial colonization of indwelling central venous catheters: Statistical evaluation of potential contaminating factors. Am J Surg 1979; 137: 745-758.
- 203. Damen J, Verhoef J, Bolton DT.** Microbiologic risk of invasive hemodynamic monitoring in patients undergoing open-heart operations. Crit Care Med 1985; 13: 548-555.