

11719  
2



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL  
SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Detección de los genes del operón de Ica, la secuencia de inserción IS256 y la producción de polisacárido de adherencia intercelular (PIA) en cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de pacientes con infecciones asociadas a catéteres.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE  
I N F E C T O L O G O

PRESENTA: DR. JUAN BERNARDO BRUCE DIAMOND HERNÁNDEZ  
TUTOR: DRA. MARÍA GUADALUPE MIRANDA NOVALES.



MÉXICO, D.F.

TESIS CON  
VALIA DE ORIGEN

I. M. S. S. C. M. N.  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
OCT. 3 2003  
DEPTO. DE ENSEÑANZA  
E INVESTIGACION

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| Índice  | 1      |
| Resumen                                       | 2      |
| Abstract                                      | 3      |
| Introducción                                  | 4      |
| Generalidades                                 | 4      |
| Polisacárido de Adherencia Intercelular (PIA) | 5      |
| El Operón de <i>Ica</i>                       | 6      |
| Justificación                                 | 7      |
| Objetivos                                     | 8      |
| Material y Métodos                            | 9      |
| Población                                     | 9      |
| Tamaño de la muestra                          | 10     |
| Microbiología                                 | 10     |
| Detección del operón de <i>Ica</i> y PCR      | 11     |
| Análisis estadístico                          | 11     |
| Resultados                                    | 12     |
| Discusión y conclusiones                      | 21     |
| Bibliografía                                  | 23     |

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En el Hospital de Pediatría se atienden principalmente pacientes en estado crítico o con padecimientos crónicos. En la mayoría de ellos se utilizan dispositivos plásticos. La incidencia para infección relacionada a catéter venoso central (CVC) es de 15% (7-10 x 1000 días / catéter), para los catéteres de diálisis peritoneal (CDP) es de 1-2 episodios por paciente/año y para catéter de derivación ventricular (CDV) es de 20-30%. Frecuentemente se reporta la presencia de infección por microorganismos sensibles a los tratamientos convencionales, que no responden al tratamiento antimicrobiano, requiriendo cambio a diferentes esquemas y eventualmente terminando con el retiro de los dispositivos plásticos. El poder identificar factores asociados a falla terapéutica daría la pauta para proponer alternativas de tratamiento y obtener una mejor respuesta en un menor tiempo. Ante esto el presente estudio pretende establecer si existe una relación entre la presencia del gen de operón de *Ica* en los *Staphylococci* que infectan catéteres, la producción de PIA y la existencia del elemento genético regulador (*IS256*) y la falla terapéutica en los pacientes, con infección por *Staphylococci* asociada a dispositivos plásticos.

**MATERIAL Y METODOS.** Diseño: estudio transversal comparativo. Se incluyeron todas las cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de pacientes con infección relacionada a dispositivos plásticos y que recibieron tratamiento antimicrobiano adecuado. Se determinaron en el laboratorio los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, la producción cualitativa de biofilm con la prueba de rojo congo y la presencia de los genes del operón de *Ica* y del elemento genético regulador *IS256* mediante PCR en cepas de pacientes con y sin falla terapéutica. Los datos para el cálculo fueron tomados de estudios similares realizados en cepas invasivas y de colonización.

**RESULTADOS:** Se obtuvieron 100 cepas de *Staphylococcus* spp. de 82 pacientes que tuvieron infección clínica asociada a catéter. La especie más frecuente fue *S. epidermidis* con 44 casos, en segundo lugar fue *S. aureus* con 39 casos. Las cepas positivas a producción de biofilm fueron un 19% del total. La causa más frecuente para indicar retiro del catéter fue persistencia de cultivos positivos. De las 100 cepas obtenidas solo 72 recibieron tratamiento adecuado, de estas presentaron falla terapéutica en un 45%. La falla terapéutica a pesar de recibir tratamiento antibiótico adecuado y presentar un patrón sensible fue del 34%. Al compararse la presencia de *Ica A/D* y falla terapéutica se encontró un riesgo mayor, pero no alcanzó significancia estadística (OR 1.92, IC 0.73-5.08,  $p=0.14$ ). Sin embargo la ausencia de producción de biofilm demostró tener una relación estadísticamente significativa como factor protector, ante la presencia de falla terapéutica (OR 0.16, IC 0.03-0.82,  $p=0.009$ ).

**CONCLUSIONES:** Aparentemente la presencia de los genes de operón de *Ica A/D* y el elemento genético regulador *IS256* no incrementan el riesgo de falla terapéutica, sin embargo la ausencia en la producción de biofilm al momento del diagnóstico favorece una respuesta satisfactoria al tratamiento. Esto podría reflejar la naturaleza dinámica del proceso que se establece desde la colonización hasta la expresión de la infección.

Patients admitted to the Pediatric Hospital are mainly critically ill patients or with chronic diseases. Most of them require plastic devices for their treatment. The incidence of intravascular catheter-related infections is (CVC) is 15% (rate 7-10 x 1000 days/catheter), for peritoneal dialysis catheters is (PDC) is 1-2 episodes per patient/year and for ventriculoperitoneal shunt devices (VPS) is 20-30%. Frequently, a susceptible microorganism is causing a persisting infection, despite multiple adequate treatment, infection is resolved until the removal of the device. By identifying the risk factors associated to therapeutic failure could lead to propose alternative strategies to achieve a better response in a short time. This study pretends to establish an association between the presence of the genes of the *lca* operon in *Staphylococci* infecting plastic devices, the production of PIA and the existence of the insertion sequence (*IS256*) and the therapeutic failure in patients with infection due to *Staphylococci*.

**MATERIAL AND METHODS:** Design: cross-sectional comparative study. All *Staphylococcus* spp. strains isolated from patients with infection related to plastic devices, who received appropriate antimicrobial treatment were included. Susceptibility profiles were done for all isolates, qualitative production of biofilm with Congo red agar test and detection of operon *lca* genes and insertion sequence *IS256* with PCR. Comparisons were performed between patients with therapeutic failure and those with adequate response to therapy. Sample size was calculated with frequencies reported in similar studies in invasive and colonizing strains.

**RESULTS:** 100 strains of *Staphylococcus* spp. were obtained from 82 patients, with clinical infection due to the plastic device. Most frequent species was *S. epidermidis* 44 cases, and in second *S. aureus* with 39 cases. Strains producing biofilm (Congo red agar positive) were 19%. Most frequent cause of device removal was persistent positive cultures. Only 72 episodes received adequate treatment, of them, 45% failed to response to treatment. Therapeutic failure presented in 34% of the patients receiving specific treatment and with a susceptible strain. When comparing the presence of the *lca AD* genes and therapeutic failure, the risk was higher, but without statistical significance (OR 1.92, IC 0.73-5.08,  $p=0.14$ ). The absence of a Congo red agar positive test had a protective significantly risk against therapeutic failure (OR 0.16, IC 0.03-0.82,  $p=0.009$ ).

**CONCLUSIONS:** Apparently, the presence of the operon *lca* genes *AD* and the insertion sequence *IS256*, was not associated with a higher risk of therapeutic failure, it is noteworthy that the absence of biofilm production at the time of diagnosis is a condition that favors therapeutic response. This could reflect the dynamic nature of the process, beginning with the colonization through the clinical evidence of infection.

## Generalidades

Los *Staphylococci* están entre las primeras bacterias que se reconocieron como patógenas, se describieron por primera vez a principios de 1880; son cocos Gram positivos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se caracterizan por su alto contenido de peptidoglucano y bajo contenido lipídico en su pared celular, generalmente son inocuos en condiciones normales y sus hábitats naturales incluyen la piel y las membranas mucosas de humanos y animales. Sin embargo, al perderse la continuidad de estos sitios, los *Staphylococcus* son capaces de producir infección en cualquier lugar del organismo, que en pacientes con alteraciones inmunológicas o enfermedades debilitantes pueden ser mortales.<sup>1-4</sup>

En las últimas dos décadas los pacientes con enfermedades crónicas han incrementado su esperanza de vida, debido principalmente, a los avances logrados en las diversas especialidades médicas. Como parte de los cuidados de estos pacientes, la aplicación de dispositivos plásticos, se ha hecho más frecuente e incluso indispensable para el tratamiento adecuado. De estos, los catéteres venosos centrales (CVC), los catéteres de diálisis (CDP) y los catéteres de ventriculostomía (CDV), son de los más utilizados.<sup>5-9</sup>

Desafortunadamente al romperse las barreras naturales de defensa del organismo, se favorece la invasión bacteriana y en consecuencia el riesgo para desarrollar infecciones tales como celulitis, bacteriemia, abscesos y/o choque séptico que pueden culminar en la muerte. La incidencia de infecciones relacionadas a CVC en Estados Unidos va de < 1% hasta un 18% en diferentes series, con una frecuencia de bacteriemias de 1 a 13 por 1000 días / catéter, y de hasta un 10% en los CDV y CDP.<sup>1-9</sup>

La infección y colonización de los catéteres obliga a la utilización de tratamiento antibiótico, que en muchas ocasiones no logra la esterilización, haciendo necesario su retiro, ya que de permanecer, pueden poner en riesgo la vida del paciente, aún cuando el manejo sea el específico al germen aislado, a la sensibilidad reportada y la dosificación sea la adecuada.<sup>5-8</sup> El microorganismo más frecuentemente relacionados a infecciones del catéter es el estafilococo, sobre todo los coagulasa negativa, reportando en algunas series hasta un 60 a 70% de las infecciones relacionadas a CVC, hasta un 67% para los CDV y un 36% de las infecciones relacionadas a CDP.

Los *Staphylococci* tienen la capacidad de migrar a través del sitio de inserción del catéter hacia adentro del organismo de forma extraluminal, o como contaminantes intraluminales al momento de la colocación, o infusión de soluciones y menos frecuentemente se colonizan en forma secundaria a una infección hematógena.<sup>1,6</sup>

Una vez que se encuentran en el catéter, los *Staphylococci* tiene una gran habilidad para adherirse a su superficie ayudándose de la producción de hemaglutininas y de slime

(limo) ambas sustancias tienen la capacidad de actuar como pegamento entre la superficie celular y el biomaterial, así como con otras células.<sup>1,4,10</sup>

Muchos de los estudios sobre adherencia bacteriana se han realizado en bacterias que crecen libremente en cultivos líquidos. Sin embargo en la naturaleza muchas de estas bacterias existen en un complejo estructural semejante a colonias conocido como biofilm.<sup>10-12</sup>

### **Polisacárido de Adherencia Intercelular (PIA)**

El biofilm se refiere a una población bacteriana encerrada en una matriz que se adhiere a las superficies, interfases u otras. Las bacterias forman microcolonias semejantes en morfología a las formadas por hongos.<sup>1,2,10-12</sup>

Las microcolonias están rodeadas de canales llenos de agua, y su función es semejante a la de un sistema circulatorio primitivo, permitiendo el acceso de nutrientes, la eliminación de desechos, y la comunicación con otras microcolonias. El biofilm es responsable de la formación de las placas de sarro, de la suciedad de los tanques de almacenamiento, y de atascar las tuberías. El interés que guarda para la medicina es su formación en injertos sintéticos como catéteres, válvulas artificiales, marcapasos, artefactos ortopédicos y lentes de contacto.<sup>1-3,10</sup>

Más aún, el biofilm le confiere a las bacterias una resistencia aumentada a los antibióticos, reportándose incluso en algunos estudios, un aumento hasta en 500 veces de lo normal. El mecanismo de resistencia no es bien conocido, pero se sugiere en algunos estudios que se debe a la presencia de la matriz de exopolisacáridos o slime (limo) que rodea a las bacterias y puede crear una barrera de exclusión para los antibióticos y los fagocitos o que incluso puede interactuar directamente con ellos inactivándolos.<sup>1,4,12,13</sup>

Actualmente se sugiere que el biofilm tiene un papel fundamental en la virulencia de los *Staphylococci*. Este se forma en dos fases: la primera fase de ataque inicial rápido a la superficie polimérica, que tiene una adherencia reversible a la superficie de contacto. Existen varios factores involucrados en esta adherencia inicial, como la hidrofobicidad de la superficie, proteínas de adhesión y polisacáridos capsulares. La segunda fase, de multiplicación celular y producción del polisacárido de adherencia intercelular (PIA) que implica la adhesión entre bacterias, que da como resultado la formación de una microcolonia y la compleja arquitectura del biofilm.<sup>4,12,13</sup>

El PIA es un polímero de  $\beta$ -1,6 - N - acetil-glucosamina. La producción del PIA esta relacionado con la expresión del operón de Ica (del inglés Intercellular cluster adhesin). Después de que las bacterias se han adherido a la superficie, estas se multiplican y forman microcolonias con estructuras altamente organizadas que requieren de adherencia intercelular. Las adhesinas están formadas por polímeros que semejan a la estructura de la celulosa, que predice una forma menos compacta y más flexible. La arquitectura no enlazada puede proporcionar los contactos y las interacciones de largo alcance entre la pared de las bacterias a semejanza de la lectina en la superficie de las células animales.<sup>12-15</sup>

## El Operón de *Ica*

Muchas proteínas superficiales se han identificado como causales de la capacidad de adherencia a las superficies plásticas. Las adhesinas semejantes a fimbrias SSP-1 y SSP-2 han sido descritas como contribuyentes a la adhesión al plástico. Así mismo, el gen *AtfE* ha sido identificado como parte de los primeros pasos en la formación del biofilm. En todos los microorganismos la expresión génica está controlada por una gran variedad de mecanismos. Las células procariotas por lo general regulan la cantidad y la actividad de las enzimas que participan en una vía metabólica específica a través de sustratos inductores o de productos finales represores. Los inductores y represores actúan en genes reguladores, controlando el inicio de la transcripción de un grupo pequeño de genes estructurales que intervienen en una misma vía metabólica. El conjunto de genes estructurales y reguladores constituye un operón. Los genes reguladores están formados por una secuencia que codifica para una proteína represora o represor, cuya función consiste en bloquear la expresión génica cuando se une a un sitio específico en el DNA, que recibe el nombre de operador; además cada operón tiene al menos un promotor, que actúa como sitio de unión de la RNA polimerasa y en consecuencia no se lleva a cabo la transcripción. Los operones pueden tener un control positivo o negativo, dependiendo de la acción de las proteínas reguladoras que pueden actuar como inductores o represores. El operón por lo tanto constituye una unidad genética de transcripción coordinada.<sup>1,3,15,16</sup>

Existen 4 genes que componen el operón de *Ica*, el cual se constituye de un componente operador y un grupo estructural compuesto de 4 genes, *Ica A*, *Ica B*, *Ica C* e *Ica D*. Recientes datos sugieren, sin embargo, que la co-expresión de los genes *A* y *D* es absolutamente necesaria para la producción de PIA y la formación de biofilm. Por lo tanto, la ausencia de uno de estos dos imposibilita a la célula a producir el polisacárido.<sup>4,17-19</sup>

Así el *Ica A* codifica una N-acetil-glucosaminil transferasa que es la enzima clave para la síntesis de PIA, *Ica B* produce secuencias de señales típicas que se secretan al medio e *Ica C* y *D* codifican proteínas que exhiben características de proteínas de membrana. Desafortunadamente las funciones específicas de los *Ica B*, *C* y *D* son aún desconocidas. Diversos estudios han referido una asociación entre la expresión del locus de *Ica* y virulencia, ya que se detecta con mayor frecuencia en *Staphylococci* aislados en catéteres que en cepas que colonizan la piel.<sup>1,3,17-20</sup>

Se ha observado que la expresión fenotípica del operón de *Ica* es la producción de PIA, sin embargo, se ha visto que algunas cepas de *Staphylococci* son fenotípicamente negativas y que posterior a varios pasos de cultivos expresan nuevamente la producción de PIA. Se ha reportado la existencia de un elemento genético activamente móvil que influye en la expresión del gen de *Ica*. Este elemento regulador de la expresión del PIA, es una secuencia de inserción IS256, que tiene la capacidad de insertarse y excluirse en diferentes sitios del operón de *Ica*.<sup>18-21</sup>

La producción de PIA también habilita a los *Staphylococci* para aglutinar eritrocitos. El biofilm que se forma en las superficies de los catéteres intravasculares protege a las bacterias de las células fagocíticas y disminuye en mucho la capacidad de los antibióticos para erradicar las microcolonias.<sup>3,14</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Justificación.

En nuestro Hospital, que es un Centro Médico de Referencia Nacional, de Tercer Nivel, ingresan para tratamiento pacientes en estado crítico o con padecimientos crónicos, requiriendo en la mayoría de los casos, el uso de dispositivos plásticos. La incidencia para infección relacionada a catéter venoso central (CVC) es de 15% (7-10 x 1000 días / catéter), para los CDP es de 1-2 episodios por paciente / año y para CDV es de 20-30%. Hemos observado que frecuentemente se reporta la presencia de infección por microorganismos sensibles a los tratamientos convencionales, pero que no responden al tratamiento antimicrobiano, requiriendo cambio a diferentes esquemas y eventualmente terminando con el retiro de los dispositivos plásticos. Esto conlleva a una elevación en los costos del tratamiento y mayor riesgo del paciente por estancia hospitalaria prolongada y necesidad de nuevas intervenciones. El poder identificar factores asociados a falla terapéutica podría dar la pauta para proponer alternativas de tratamiento y obtener mejor la respuesta. Ante esto el presente estudio pretende establecer si existe una relación entre la presencia de los genes del operón de *Ica* en los *Staphylococci* que infectan catéteres, la producción de PIA y la existencia del elemento genético regulador (*IS256*) y la falla terapéutica en los pacientes, con infección por *Staphylococci* asociada a dispositivos plásticos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar la frecuencia de la expresión de los genes *A* y *D* del operón de *Ica*, la presencia del elemento genético regulador *IS256* y la producción de PIA en los *Staphylococci* causantes de infección asociada a dispositivos plásticos, de pacientes que tuvieron falla terapéutica, en comparación con los pacientes que respondieron a tratamiento antimicrobiano adecuado.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la prueba de Gelosa de Rojo Congo para determinar la producción de PIA.
- Estandarizar las condiciones de la prueba de PCR para demostrar la presencia de los genes *A*, *B*, *C* y *D* del operón de *Ica*, así como para el elemento genético regulador.
- Comparar la presencia de los genes *A* y *D* del Operón de *Ica*, y la producción de PIA en *Staphylococcus* spp. causantes de infección asociada a dispositivos plásticos, de pacientes que tuvieron falla terapéutica, *versus* aquellos que respondieron a tratamiento antimicrobiano adecuado.

## MATERIAL Y METODOS

### Población

El Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social es un hospital de concentración en donde se atiende principalmente a pacientes con alteraciones crónico-degenerativas.

Realizamos una investigación biomédica transversal comparativa en 82 pacientes que presentaron sintomatología infecciosa asociada a un dispositivo plástico en los que se logró recuperar 100 cepas diferentes de *Staphylococcus* spp. El estudio fue aprobado por el Comité Local de Investigación.

El tipo de dispositivo plástico se definió como la presencia de un implemento plástico utilizado principalmente para la infusión de líquidos y medicamentos en caso de catéter venoso central; y según el tiempo de instalado, en temporal (tipo Arrow, Mahurkar, de silastic); y permanente (Quinton, Broviac, Hickman, puertos), los catéteres de diálisis peritoneal fueron tipo Tenckhoff y los catéteres de ventriculostomía de silastic o los sistemas de derivación ventriculoperitoneal o ventriculoatrial.

Las infecciones se clasificaron en Bacteriemia – Sepsis, asociada a catéter venoso central cuando se obtuvo un aislamiento de *Staphylococcus* spp. en hemocultivo central y periférico, pertenecientes a la misma especie, en un paciente con fiebre, hipotermia o distermias, con o sin datos de respuesta inflamatoria sistémica. Peritonitis asociada a catéter de diálisis peritoneal cuando se aisló *Staphylococcus* spp. en cultivo de líquido de diálisis, en pacientes con estudio citológico que reporte 100 o más células/mm<sup>3</sup> y predominio de polimorfonucleares. Ependimitis asociada a catéter de derivación ventriculoperitoneal, ventriculoatrial o de ventriculostomía cuando se desarrolló *Staphylococcus* spp. en cultivos de líquido cefalorraquídeo, independientemente del resultado de citoquímico.

Definimos el tratamiento antimicrobiano adecuado como aquel que incluyó fármacos con espectro antiestafilococo y a los que mostrara sensibilidad *in vitro* según los criterios de la NCCLS. Así, se presentaron éxitos al tratamiento, es decir, curación, y pacientes con falla al tratamiento antimicrobiano adecuado. Estas se presentaron como persistencia de cultivos positivos posterior a 72 h de tratamiento antimicrobiano adecuado, independientemente de los datos clínicos. En pacientes con catéter de diálisis peritoneal la persistencia de cultivos positivos para el mismo microorganismo, o bien citológico de líquido de diálisis con más de 100 células/mm<sup>3</sup> posterior a las 72 h de tratamiento antimicrobiano adecuado. En pacientes con catéter venoso central, en los que se demostró progresión de la infección o falta de mejoría de acuerdo a datos clínicos presentes cuando

se estableció el diagnóstico y/o persistencia de cultivos positivos para el mismo microorganismo posterior a 72 h de tratamiento antimicrobiano adecuado.

Una vez aislado el *Staphylococcus* en medio de Agar Müeller – Hinton, se localizó el expediente clínico de los pacientes para establecer el diagnóstico de infección relacionada a dispositivo plástico, el tratamiento empírico inicial y cuales fueron las conductas que se siguieron al contar con el aislamiento así como la evolución clínica y microbiológica de los pacientes.

### **Tamaño de la muestra**

En este momento no existen estudios previos ya publicados donde se haya abordado esta pregunta de investigación, los datos para el cálculo fueron tomados de estudios similares realizados en cepas invasivas y de colonización. Se realizó un cálculo de tamaño muestral con el programa EPI-INFO v. 2001 tomando en cuenta la prevalencia de la enfermedad (-15% - la más baja), alfa de 95%, y la diferencia del 50% que se esperaba detectar en los pacientes con falla y comparados con los que no tienen falla.

### **Microbiología**

Todas las cepas de *Staphylococci* aisladas en cultivos de gelosa sangre en el laboratorio de microbiología del hospital de productos asociados a dispositivos plásticos se resembraron en Agar de Müeller – Hinton suplementado con NaCl al 4%. Se les practico pruebas de catalasa y coagulasa. Los coagulasa positivos con morfología colonial característica (colonias doradas), se clasificaron como *Staphylococcus aureus*. Las cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa fueron analizadas en el laboratorio de la Unidad de Epidemiología Hospitalaria, donde se realizó identificación de especie por medio del método de API-Staph (Biomerieux Co. Francia).

A la par de la identificación las cepas siguieron su proceso habitual de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana mediante dilución en agar en la sección de Microbiología (para cefalotina, dicloxacilina, norfloxacin, amikacina, y vancomicina). Se clasificaron como sensibles o resistentes de acuerdo a los valores de corte publicados por el NCCLS.  
<sup>23,24</sup>

Una vez identificado el microorganismo se hizo la detección cualitativa de formación de biofilm usando Gelosa de Rojo Congo como lo describió Freeman en 1989.<sup>25</sup> Una colonia fue tomada de un cultivo puro de 24 h de incubación en agar de Müeller-Hinton y sembrada en Gelosa de Rojo Congo, (0.8 g de Rojo Congo y 36 g de sacarosa en un litro de infusión de gelosa cerebro – corazón ) se incubó a 37°C de forma aerobia por 24 h y posteriormente a temperatura ambiente. Los productores de biofilm mostraron una colonia teñida de negro y las negativas fueron de rosas a rojas.<sup>25</sup>

Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Se utilizaron las cepas control ATCC *S. aureus* 29247 y *S. aureus* 25923.

Todas las cepas están conservadas en caldo soya tripticasa y glicerol a -70°C.

## **Detección de los genes del operón de *Ica* y el elemento genético regulador *IS256* mediante PCR**

Para la extracción del ADN utilizamos el kit Genomic Wizard de Promega (Madison, WI, USA.) Una vez extraído el ADN se realizó la amplificación de las secuencias de *Ica A*, *Ica B*, *Ica C*, e *Ica D* por método de PCR. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (acceso para el operón *Ica* U43366) y las publicaciones de Ziebuhr y Arciola<sup>4,37</sup>, utilizando las condiciones mencionadas por dichos autores. La reacción fue realizada en una termocicladora T-personal Whatman (Biometra, Germany). Después de la amplificación se utilizaron 5µl de la mezcla de PCR que se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en trisborato-EDTA. Se utilizó un marcador de peso molecular DNA ladder de 100 pb. Aquellas muestras con amplificación positiva para los fragmentos *A* y *D*, fueron analizadas para detectar la presencia del elemento genético regulador *IS256*.

### **Análisis estadístico.**

Estadística descriptiva: frecuencias simples y porcentajes para características generales. Se determinó estadísticamente si existió independencia entre los porcentajes esperados de los genes buscados y el biofilm entre las dos muestras de pacientes con y sin buena respuesta clínica mediante diferencia de proporciones (chi-cuadrada).

Obtuvimos 100 muestras de *Staphylococcus* spp. de 82 pacientes que tenían infección clínica asociada a un dispositivo plástico. De estos pacientes 44 fueron del sexo masculino y 38 femenino. Con una relación de 1.15:1. Estos pacientes se distribuyeron en periodos de edad pediátrica siendo más frecuentemente afectados los lactantes en número de 26, seguido de los neonatos con 17, adolescentes con 15 y preescolares y escolares con 12 cada uno.

Los diagnósticos relacionados a dispositivos plásticos se agruparon como sepsis en 38 casos, ependimitis en 31 casos, peritonitis 27 casos y empiema en 4 casos. De todos ellos, la especie de *Staphylococcus* que se identificó con más frecuencia fue *S. epidermidis* en 44 casos, seguido de 39 por *S. aureus*, *S. hominis* presentó 7, *S. haemolyticus* 4, *S. lugdonensis* con 2, igual que *S. auricularis*, *S. sciuri* y *S. warnerii* se identificaron en un solo caso cada una.

A todas las cepas se les realizó estudio de gelosa de Rojo Congo buscando su capacidad de producir biofilm, encontrando 19 cepas positivas.

El catéter colocado en cada paciente dependía de las necesidades terapéuticas del caso, así se encontraron que algunos pacientes presentaban 2 catéteres diferentes, los que tenían diálisis peritoneal y catéter largo venoso, o catéter de ventriculostomía y catéter de Silastic colocado por venodisección. El número de catéteres venosos fue de 38; los catéteres de diálisis peritoneal fueron 27. Tuvimos 24 aislamientos de sistemas de derivación ventriculoperitoneal y 7 de ventriculostomía, la cual se colocó para tratamiento de descompresión y que posteriormente se colonizó. La distribución del tipo de catéter se aprecia en el cuadro 1.

**CUADRO 1. Tipo de catéter**

|                  |     |
|------------------|-----|
| Mahurkar         | 2   |
| Tenchkoff        | 27  |
| Arrow            | 1   |
| Ventriculostomía | 7   |
| DVP              | 24  |
| Permanente       | 1   |
| Largo            | 13  |
| Percutáneo       | 1   |
| Silastic         | 19  |
| Punta            | 1   |
| Sonda pleural    | 4   |
| Total            | 100 |

Para los fines de nuestro estudio sólo analizamos a los pacientes que recibieron un tratamiento adecuado, dirigido al microorganismo identificado en cultivo, de los 100 iniciales sólo 72 contaron con tratamiento adecuado contra *Staphylococcus* (uso de dicloxacilina, vancomicina, casafotina, rifampicina más trimetoprim con sulfametoxazol solos o asociados a amikacina). En 18 de los 28 casos restantes se administraron otros medicamentos que no se utilizan de primera elección contra especies de *Staphylococcus*, pero que pueden tener actividad sobre ellos (Clindamicina, Imipenem). Diez pacientes no recibieron tratamiento, en 6 casos se identificó *Staphylococcus* coagulasa negativa en líquido peritoneal, pero los pacientes no desarrollaron peritonitis y en cuatro pacientes en los que se identificó en la punta de la sonda pleural al ser retirada, se consideró como colonización.

En 51 casos se indicó el retiro del catéter, la causa más frecuente fue la persistencia de cultivos positivos ( a pesar del tratamiento adecuado y de reportarse sensibilidad *in vitro*) y en segundo lugar la progresión de los signos clínicos de infección. Algunos pacientes que respondieron conservaron el catéter hasta el egreso hospitalario (8). El total de pacientes que curaron sin retirar el catéter fueron 45. Otras causas de retiro fueron el accidental, una infección polimicrobiana, y disfunción. (cuadro 2)

**CUADRO 2. Desenlace del dispositivo plástico.**

|   |            |
|---|------------|
| Retiro por persistencia de cultivos positivos   | 22         |
| Persistencia de celularidad > 100 en líquido diálisis   | 3          |
| Persistencia de signos clínicos de infección como fiebre, hipotermia, alteraciones de hemograma, etc. | 15         |
| Alta  | 8          |
| Curación sin retirar el catéter   | 45         |
| Defunción   | 2          |
| Interiorización de DVP o DVA  | 1          |
| Retiro por infección polimicrobiana   | 1          |
| Accidental  | 1          |
| Disfunción  | 2          |
| <b>Total</b>  | <b>100</b> |

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El tratamiento empírico se inició ante la presencia de sintomatología infecciosa, de sepsis, peritonitis asociada a diálisis y ependimitis. La vía de administración dependía del diagnóstico clínico, pudiendo ser intravenoso, intraabdominal e intraventricular, encontrando en 14 casos tratamiento mixto. Los medicamentos de primera elección más frecuentemente utilizados fueron dicloxacilina más amikacina y cefalotina más amikacina, otros fármacos se indicaron de acuerdo a los antecedentes y condiciones subyacentes, por lo cual se observó gran variabilidad. (cuadro 3).

**CUADRO 3. Frecuencia de los antibióticos indicados empíricamente.**

|   |     |
|---|-----|
| Dicloxacilina IV <sup>1</sup>                     | 19  |
| Amikacina IV                                      | 57  |
| Amikacina Ivn <sup>2</sup>                        | 15  |
| TMP+SMZ <sup>3</sup> +Rifampicina VO <sup>5</sup> | 4   |
| Cefalotina IV                                     | 21  |
| Ciprofloxacino IV                                 | 1   |
| Vancomicina IV                                    | 6   |
| Claritromicina IV                                 | 1   |
| Imipenem IV                                       | 6   |
| Cefotaxima IV                                     | 4   |
| Dicloxacilina IP <sup>3</sup>                     | 18  |
| Amikacina IP                                      | 18  |
| Vancomicina Ivn                                   | 6   |
| Cefuroxima IV                                     | 1   |
| Ceftazidima IV                                    | 2   |
| Ampicilina IV                                     | 4   |
| Vancomicina IP                                    | 1   |
| Nada  | 4   |
| Total   | 188 |

- 1 Intravenoso
- 2 Intraventricular
- 3 Intraperitoneal
- 4 Trimetoprim Sulfametoxazol
- 5 Vía oral

Una vez reportado el cultivo y la sensibilidad a los antibióticos, se realizó cambio de tratamiento al específico en un 30% de los casos. En el cuadro 4 se muestra como varió la frecuencia del tratamiento una vez obtenido el aislamiento. Resalta el incremento en la frecuencia en el uso de vancomicina al contar con el aislamiento.

Analizamos también, las frecuencias del uso de antibiótico como monoterapia, en esquema doble e incluso triple, en manejo empírico y específico. En el cuadro 5 se observa que el tratamiento empírico generalmente incluía triple esquema, mientras que cuando se contaba con el aislamiento se hacía cambio principalmente a esquema doble. La

TESTS CON  
FALLA DE ORIGEN

monoterapia también se incrementa, enfatizando que la vancomicina como tratamiento específico y único se utilizó en 19 ocasiones. (50% de la monoterapia)

**CUADRO 4. Frecuencia de los antibióticos indicados para tratamiento específico.**

|   |            |
|---|------------|
| Dicloxacilina IV <sup>1</sup>                     | 14         |
| Amikacina IV                                      | 50         |
| Amikacina Ivn <sup>2</sup>                        | 11         |
| TMP + SMZ <sup>4</sup> + Rifampicina <sup>5</sup> | 5          |
| Cefalotina IV                                     | 17         |
| Ciprofloxacino IV                                 | 1          |
| <b>Vancomicina IV</b>                             | <b>16</b>  |
| Claritromicina IV                                 | 1          |
| Imipenem IV                                       | 6          |
| Cefotaxima IV                                     | 2          |
| Dicloxacilina IP <sup>3</sup>                     | 12         |
| Amikacina IP                                      | 12         |
| <b>Vancomicina IVn</b>                            | <b>18</b>  |
| Cefuroxima IV                                     | 0          |
| Ceftazidima IV                                    | 0          |
| Ampicilina IV                                     | 1          |
| <b>Vancomicina IP</b>                             | <b>5</b>   |
| Nada  | 6          |
| <b>Total</b>                                      | <b>177</b> |

- 1 Intravenoso
- 2 Intraventricular
- 3 Intraperitoneal
- 4 Trimetoprim Sulfametoxazol
- 5 Vía oral

**CUADRO 5. Diferencia entre el tratamiento empírico y específico**

| Empírico        |            | Específico      |            |
|-----------------|------------|-----------------|------------|
| Monoterapia     | 15         | Monoterapia     | 25         |
| Doble esquema   | 15         | Doble esquema   | 61         |
| Triple esquema  | 66         | Triple esquema  | 8          |
| Sin tratamiento | 4          | Sin tratamiento | 6          |
| <b>Total</b>    | <b>100</b> | <b>Total</b>    | <b>100</b> |

La resistencia antimicrobiana a los fármacos habitualmente utilizados en el hospital para el tratamiento de estas infecciones fue superior al 20% para dicloxacilina y amikacina, pero mucho menor a lo registrado para aislamientos nosocomiales en el año 2000<sup>28</sup>. La resistencia a norfloxacino es elevada, a cefalotina menor al 20% y todas las cepas susceptibles a vancomicina. (cuadro 6.)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**CUADRO 6. Concentraciones mínimas inhibitorias y % de resistencia en 100 cepas de *Staphylococcus* spp.**

**Dicloxacilina**

|             | >16 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | <4 µg/ml | % resistencia | Total |
|-------------|-----------|---------|---------|----------|---------------|-------|
| Bacteriemia | 17        | 1       | 1       | 18       | 46            | 37    |
| Ependimitis | 12        | 1       | 0       | 19       | 38            | 32    |
| Peritonitis | 1         | 1       | 1       | 24       | 4             | 27    |
| Empiema     | 3         | 0       | 0       | 1        | 75            | 4     |
| Total       | 33        | 3       | 2       | 62       | 33            | 100   |

**Amikacina**

|             | >64 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | <8 µg/ml | % resistencia | Total |
|-------------|-----------|----------|----------|---------|----------|---------------|-------|
| Bacteriemia | 14        | 2        | 4        | 0       | 17       | 43            | 37    |
| Ependimitis | 3         | 6        | 5        | 1       | 17       | 28            | 32    |
| Peritonitis | 4         | 0        | 1        | 0       | 22       | 15            | 27    |
| Empiema     | 2         | 0        | 1        | 0       | 1        | 50            | 4     |
| Total       | 23        | 8        | 11       | 1       | 57       | 31            | 100   |

**Norfloxacino**

|             | >64 µg/ml | 64 µg/ml | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | % resistencia | Total |
|-------------|-----------|----------|---------|---------|---------|---------------|-------|
| Bacteriemia | 2         | 6        | 0       | 0       | 29      | 22            | 37    |
| Ependimitis | 3         | 11       | 0       | 3       | 15      | 44            | 32    |
| Peritonitis | 0         | 1        | 0       | 0       | 26      | 4             | 27    |
| Empiema     | 2         | 1        | 0       | 0       | 1       | 75            | 4     |
| Total       | 7         | 19       | 0       | 3       | 71      | 26            | 100   |

**Vancomicina**

|             | 8 µg/ml | 4 µg/ml | 2 µg/ml | % resistencia | Total |
|-------------|---------|---------|---------|---------------|-------|
| Bacteriemia | 0       | 0       | 37      | 0             | 37    |
| Ependimitis | 0       | 0       | 33      | 0             | 33    |
| Peritonitis | 0       | 0       | 26      | 0             | 26    |
| Empiema     | 0       | 0       | 4       | 0             | 4     |
| Total       | 0       | 0       | 100     | 0             | 100   |

**Cefalotina**

|             | >32 µg/ml | 32 µg/ml | 16 µg/ml | 8 µg/ml | <8 µg/ml | % resistencia | Total |
|-------------|-----------|----------|----------|---------|----------|---------------|-------|
| Bacteriemia | 6         | 1        | 0        | 2       | 28       | 19            | 37    |
| Ependimitis | 3         | 0        | 2        | 2       | 25       | 9             | 32    |
| Peritonitis | 1         | 0        | 1        | 1       | 24       | 4             | 27    |
| Empiema     | 2         | 0        | 1        | 0       | 1        | 50            | 4     |
| Total       | 12        | 1        | 4        | 5       | 78       | 13            | 100   |

El área sombreada corresponde al valor de la C.M.I a partir del cual se considera como resistencia, de acuerdo a las recomendaciones de la NCT.SS.<sup>26</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

De los 72 pacientes que fueron evaluables para respuesta terapéutica (cuadro 7), 33 (45%) presentaron falla, de estos, 2 fallecieron por complicaciones secundarias al proceso infeccioso (letalidad asociada 2.7%). Un 34% de los pacientes que tenían tratamiento adecuado y una bacteria sensible *in vitro* tuvieron falla terapéutica. El porcentaje de falla fue mayor para pacientes en el grupo de bacteriemias 15/28 (53.5%), y en el grupo de ependimitis 12/24 (50%) y menor para pacientes con peritonitis asociada a catéter de diálisis 5/20 (25%).

**CUADRO 7. Relación entre tratamiento adecuado, susceptibilidad y falla al manejo.**

|              | Adecuado | Inadecuado | Total | Falla de acuerdo a susceptibilidad <i>in vitro</i> |            |
|--------------|----------|------------|-------|--|------------|
|              |          |            |       | sensible   | resistente |
| Bacteriemias | 28       | 10         | 38    | 12 (42%)   | 3 (11%)    |
| Ependimitis  | 24       | 7          | 31    | 8 (34%)  | 4 (17%)    |
| Peritonitis  | 20       | 7          | 27    | 3 (15%)  | 2 (10%)    |
| Total        | 72       | 28         | 100   | 24 (34%)   | 9 (12%)    |

Con respecto a la producción de biofilm y curación encontramos que las especies no productoras de biofilm el porcentaje de fallas fue más elevado, si consideramos todos los diagnósticos se incrementa hasta un 42%. A diferencia de lo que sucede en las cepas productoras de biofilm y falla en donde solo se presenta en un 9% del total de cepas. (cuadro 8).

**CUADRO 8 . Relación entre la expresión de biofilm (rojo congo) y el desenlace.**

|             | Curación  | Falla     | Curación  | Falla     | Total |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
|             | Congo (+) | Congo (+) | Congo (-) | Congo (-) |       |
| Bacteriemia | 4         | 4         | 13        | 17        | 38    |
|             | 2.6%      | 2.6%      | 34.2%     | 44.7%     |       |
| Peritonitis | 3         | 0         | 8         | 15        | 31    |
|             | 9.6%      | 0         | 25.8%     | 48.3%     |       |
| Ependimitis | 3         | 5         | 16        | 8         | 27    |
|             | 11.1%     | 18.5%     | 59.2%     | 29.6%     |       |

La detección de los genes del operón de *ica A/D* fue mayor en cepas de la especie *epidermidis*, sin embargo, el elemento de inserción en A y D solo se encontró en un 36% de los casos. Es decir, sólo una tercera parte de los *S. epidermidis* que tenían la información genética para la producción de biofilm, contaba con el elemento genético regulador en la posición D, que le permitía la expresión fenotípica. 13 de las 14 cepas en las cuales se detectó la producción de biofilm mediante la prueba de rojo Congo tuvieron esta característica. (cuadro 9). Sin embargo, cepas de otras especies no lo expresaron, y llama la atención la prueba positiva en 4 cepas de *S. aureus*, de las cuales solamente 2 tenían los genes *A/D*, pero ninguna de ellas el elemento genético regulador. (Gráfica 1)

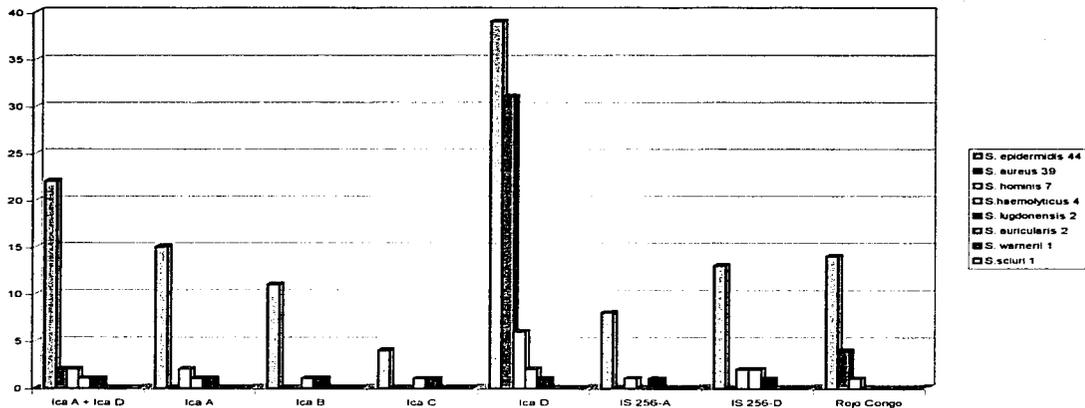
**CUADRO 9. Presencia del operón de *Ica*, elemento de inserción y producción cualitativa de biofilm.**

| Microorganismo           | ICA A/ D | ICA A | ICA B | ICA C | ICA D | IS 256-A | IS 256-D | Rojo Congo |
|--------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|------------|
| <i>S. epidermidis</i> 44 | 22       | 15    | 11    | 4     | 39    | 8        | 13       | 14         |
| <i>S. aureus</i> 39      | 2        | 0     | 0     | 0     | 31    | 0        | 0        | 4          |
| <i>S. hominis</i> 7      | 2        | 2     | 0     | 0     | 6     | 1        | 2        | 1          |
| <i>S. haemolyticus</i> 4 | 1        | 1     | 1     | 1     | 2     | 0        | 2        | 0          |
| <i>S. lugdonensis</i> 2  | 1        | 1     | 1     | 1     | 1     | 1        | 1        | 0          |
| <i>S. auricularis</i> 2  | 0        | 0     | 0     | 0     | 0     | 0        | 0        | 0          |
| <i>S. warnerii</i> 1     | 0        | 0     | 0     | 0     | 0     | 0        | 0        | 0          |
| <i>S. sciuri</i> 1       | 0        | 0     | 0     | 0     | 0     | 0        | 0        | 0          |

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## GRAFICA 1.

Presencia de operón de ICA por especie.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

La falla terapéutica se presentó más frecuentemente en las cepas de *S. epidermidis* que en las de *S. aureus*, diferencia que no fue estadísticamente significativa (OR 1.92, IC 0.73-5.08,  $p < 0.14$ ). Apparently the presence of the genes of the operon of *Ica* and the genetic regulatory elements, are not related to the failure of treatment in patients with infections related to catheters. On the other hand, the absence in the expression of phenotypic biofilm was found as a protective factor against therapeutic failure, a situation contrary to what was expected. This difference in percentages when compared by a chi-square test ( $X^2$ ) gave a statistically significant result (OR 0.16, IC 0.03-0.82,  $p < 0.009$ ).

**CUADRO 10. Relación entre presencia de los genes *Ica A* y *D*, expresión de biofilm y falla terapéutica.**

| Microorganismo<br>(n° cepas)  | Ica A + Ica D | IS 256-A | IS 256-D | Rojo Congo | Falla terapéutica | Porcentaje de la falla |
|-------------------------------|---------------|----------|----------|------------|-------------------|------------------------|
| <i>S. epidermidis</i><br>(44) | 22            | 8        | 13       | 14         | 24                | 54%                    |
| <i>S. aureus</i><br>(39)      | 2             | 0        | 0        | 4          | 15                | 38%                    |
| <i>S. hominis</i><br>(7)      | 2             | 1        | 2        | 1          | 4                 | -                      |
| <i>S. haemolyticus</i><br>(4) | 1             | 0        | 2        | 0          | 3                 | -                      |
| <i>S. lugdonensis</i><br>(2)  | 1             | 1        | 1        | 0          | 1                 | -                      |
| <i>S. auricularis</i><br>(2)  | 0             | 0        | 0        | 0          | 1                 | -                      |
| <i>S. warnerii</i><br>(1)     | 0             | 0        | 0        | 0          | 1                 | -                      |
| <i>S. sciuri</i><br>(1)       | 0             | 0        | 0        | 0          | 1                 | -                      |

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En años recientes ha sido posible la detección de gran número de genes que funcionan como operones, y que supuestamente son los responsables de la expresión de una gran variedad de mecanismos de patogenicidad y virulencia en diferentes géneros bacterianos.<sup>15</sup> En especial para ciertos microorganismos oportunistas; se ha tratado de explicar el inicio y persistencia de algunas infecciones mediante la presencia de estos determinantes que codifican para la expresión de sustancias que le confieren a la bacteria capacidades especiales, y que le permitirían a este microorganismo, esencialmente no patógeno, ocasionar aún infecciones graves en hospederos inmunocomprometidos o que requieren el uso prolongado de dispositivos plásticos<sup>4,6</sup>.

La expresión de biofilm por *Staphylococcus epidermidis* y otras cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa es un excelente ejemplo del estudio de estos genes.<sup>7,12,13</sup> La producción de biofilm ha sido indudablemente relacionada con las infecciones asociadas a cuerpos extraños desde la década de los 80's. En algunos estudios se trató de relacionar al biofilm con la pobre respuesta al tratamiento antimicrobiano, ya que se había demostrado, en ensayos *in vivo* con animales de experimentación e *in vitro*, que este material impedía la penetración adecuada del antimicrobiano y que las concentraciones requeridas por las cepas productoras de biofilm eran superiores a las requeridas por cepas sin producción de biofilm.<sup>11,26,27</sup> Con estas evidencias y algunos otros estudios más recientes<sup>29</sup> se propuso el presente estudio exploratorio, con la finalidad de probar la hipótesis de la asociación entre la presencia del operón de *Ica*, la expresión de biofilm y un elevado número de fallas terapéuticas, aún en pacientes que reciben tratamiento antimicrobiano adecuado para una infección asociada a un dispositivo plástico.

En este estudio el porcentaje de falla terapéutica es muy elevado, comparando las fallas esperadas para el número de cepas que cumplirían con los "requisitos de información genética" (trece) y en los que además, se detectó la expresión de biofilm, y las fallas que se presentaron en el grupo de pacientes que recibieron un tratamiento antimicrobiano adecuado 33/72 (45.8%). Más aún, diez pacientes que demostraron la expresión de biofilm tuvieron una respuesta adecuada al tratamiento. Parece claro que además de la presencia de los genes del operón de *Ica*, y la expresión fenotípica de biofilm, existen varios mecanismos complejos interrelacionados que intervienen en el establecimiento y persistencia de las infecciones relacionadas a dispositivos plásticos. Vandecasteele y colaboradores<sup>29</sup> recién describieron la participación de 5 genes además de los del operón de *Ica* en un modelo *in vitro* que pretende contestar estas inquietudes.

El último fin de todos estos estudios es definir la mejor recomendación terapéutica para el paciente. En los pacientes incluidos en este estudio la frecuencia de fracaso al primer esquema es muy elevada para pacientes con bacteriemia asociada a catéter y pacientes con ependimitis asociada a sistema de derivación VP, y aceptable únicamente para pacientes con peritonitis asociada a catéter de diálisis peritoneal. Esto indicaría que éstos últimos se curan gracias a las elevadas concentraciones de antimicrobianos que se administran en forma local, sin embargo para pacientes con catéter intravascular parece imperativo el retiro del mismo para mejorar la tasa de respuesta, y para pacientes con ependimitis que inicialmente reciben tratamiento intraventricular, deberá considerarse el tratamiento sistémico concomitante.

El haber encontrado un resultado diferente a lo esperado (un menor riesgo de falla para aquellos pacientes que no expresan la producción de biofilm) nos lleva a cuestionar las implicaciones que podría tener para el clínico el reporte positivo o negativo de la producción de biofilm. En el sentido biológico la decisión podría ser errónea, al suponer que la bacteria causante de esa infección, si carece de la expresión del biofilm, responderá con mayor facilidad al tratamiento antimicrobiano, incluso sin retirar el dispositivo colonizado. Sin embargo, ante estos resultados, y la evidencia creciente de que el proceso de colonización-infección es mucho más dinámico, se requieren de más estudios con modelos *in vivo* para establecer realmente si la detección de los genes involucrados en la producción de biofilm, y la expresión fenotípica de esta capacidad, pueden ser útiles para recomendaciones terapéuticas que lleven a la curación en un menor tiempo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BIBLIOGRAFIA

1. Mandell G, Bennett J, Dolin R. *Staphylococcus* en Principles and practice of infectious diseases. 5ª edición. Ed Panamericana EUA.2000.pp.2096
2. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, et al. *Staphylococcus* en Diagnóstico microbiológico. 4ª edición. Ed. Panamericana Argentina 2000. pp
3. Lowy F. *Staphylococcus aureus* infections New Engl J Med. 1998;339:520-532.
4. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Loner I, Gotz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. Molecular Microbiology 1999;32:345-356.
5. Finkelstein E, Jekel J, Troidle L, Gorban-Brennan N, Finkelstein F, et al. Patterns of infection in patients maintained on long-term peritoneal dialysis therapy with multiple episodes of peritonitis. Am J Kidney Dis 2002;39: 377-385.
6. Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs. Clin Microbiol Infect 2002;8:256-64.
7. von Eiff C, Heilmann C, Peters G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:843-6.
8. Elliott. T. Can antimicrobial central venous catheters prevent associated infection? Br J Haematol 1999;107:235-241.
9. Treatment of cerebrospinal fluid shunt infections: a decision analysis. Pediatr Infect Dis J 2002;21:632-6.
10. Arciola C, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. J Clin Microb 2001; 39: 2151-2156 .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

11. Rupp M, Fey P, Heilmann C, Gotz F, Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis* 2001;183:1038-42.
12. Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43:1367-78.
13. O'Gara J, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal of Medical Microbiology* 2001;50:582-587.
14. Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *J Biol Chem* 1998;273: 18586-18593.
15. Lappin-Scott H, Bass C. Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *Am J Infect Control* 2001; 29:250-251.
16. Cramton S, Gerke C, Schnell N, Nichols W, Götz F. The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun* 1999;67:5427-5433.
17. Ziebuhr W, Heilmann F, Gotz P, Meyer K, et.al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* 1997;65:890-896.
18. de Silva G, Kantzanou M, Justice A, Massey R, Wilkinson A, Day N, Peacock S. The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Microb* 2002;40: 2382-388.
19. Cramton S, Ulrich M, Götz F, Döring G. Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001;69: 4079-4085.
20. Dietrich M, Holger Re, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch J, et al. Identification of Three Essential Regulatory Gene Loci Governing Expression of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin and Biofilm Formation. *Infect Immun* 2000; 68: 3799-3807.
21. McKenney D, Hübner J, Muller E, Wang Y, Goldmann D, Pier G. The *ica* Locus of *Staphylococcus epidermidis* Encodes Production of the Capsular polysaccharide/Adhesin. *Infect Immun* 1998; 66:4711-4720.
22. Conlon K, Humphreys H, O'Gara J. IcaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 2002;184:4400-8.

23. NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 9<sup>th</sup> ed. Vol 17. No 1 Approved standard M2-A9. National Committee for Clinical Laboratory standards, Wayne, Pa. 1999.
24. Tenover F, Jones R, Swenson J, Zimmer B, McAllister S, Jorgensen J. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. The NCCLS Staphylococcus Working Group. J Clin Microbiol 1999;37:4051-8.
25. Freeman J, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. J Clin Pathol 1989;42:872-4.
26. Christensen G, Simson J, Younger L, Baddour F, Barrett D, Melton D, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985;22:996-1006.
27. Arciola CR, Collimati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR method for detection fo slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. Diagn Mol Pathol 2001;10:130-137.
28. Epidemiología molecular de *Staphylococcus spp.*, en un hospital Pediátrico de tercer nivel". Alumno: Mariano Vilchis Pérez. Especialidad: Infectología Pediátrica. 2001
29. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Eldere J. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and I vivo foreign body infections. J Infect Dis 2003;188:730-7.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN