

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
SALUD Y LA PRODUCCION ANIMAL

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO
DE OSTEOMIELITIS
ESTAFILOCÓCICA EN RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta :

MARTHA BEATRIZ HERNANDEZ ARELLANO

TUTORA

REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

COMITÉ TUTORAL

GABRIEL GUÍZAR SAHAGÚN
GILBERTO CHÁVEZ GRIS

MEXICO, D.F.

2005

m 345665



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.

COMITÉ TUTORAL

Dra. Rebecca E. Franco y Bourland

Servicio de Bioquímica-Ortopedia, Centro Nacional de Rehabilitación, SSA, México, D.F.

Dr. Gabriel Guízar Sahagún

Proyecto Camina, AC. México, D.F.

Dr. Gilberto Chávez Gris

Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D.F.

JURADO

Dr. Carlos E. Santoscoy Mejía

Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, DF.

Dr. Gilberto Chávez Gris

Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D.F.

Dr. Gabriel Guízar Sahagún

Proyecto Camina, AC. México, D.F.

Dr. Rafael Hernández González

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Dr. Salvador Zubirán”, SSA. México, D.F.

Dra. Rebecca E. Franco y Bourland

Servicio de Bioquímica- Ortopedia, Centro Nacional de Rehabilitación, SSA. México, D.F.

Dedico ésta tesis

a mis padres Horacio y Sabi, gracias por estar conmigo todavía

a mis hermanos Horacio, Carlos e Isabel

a mis 4 bebes (Fernanda, Fabricio, Martha Isabella, Emiliano)

a mi mejor amiga la Dra. Martha Patricia Izquierdo, por su apoyo y estímulo constante

a la Dra. Socorro Lara por sus constantes consejos

a mis compañeros y amigos del Hospital Veterinario UNAM

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Rebecca Franco, por compartir sus conocimientos, su apoyo y por su confianza en demostrar que un 7 no es siempre 7.

Agradezco infinitamente a la Dra. Claudia Rivera C. Jefe del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Por la donación incondicional de todas las ratas necesarias para la realización de éste trabajo.

Al personal del Servicio de Bioquímica-Ortopedia, y en especial al QBP Carlos Martínez Canseco, por sus enseñanzas, su asesoría, sus invaluable aportaciones y su disposición incondicional para la realización de éste trabajo y en mi formación.

Al MVZ Hugo Lecona Buitrón Jefe del Bioterio del Centro Nacional de Rehabilitación SSA, por su disposición y apoyo.

Al personal de la Sección de Rayos "X" del Centro Nacional de Rehabilitación, SSA.

Al personal de la Sección de Imagenología del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la FMVZ. UNAM. Por su ayuda y su apoyo incondicional.

Al Laboratorista Morales Arreola Luis Antonio del Departamento de Patología de la FMVZ. UNAM.

INDICE GENERAL

1.0	Introducción	1
1.1	Etiología	1
1.2	Factores predisponentes a la infección	3
1.3	Vías de entrada del agente etiológico	3
2.0	Patogenia	4
2.1	Lisis ósea inducida por la bacteria	5
2.2	Respuesta inmune ante la infección	6
3.0	Diagnóstico histopatológico	6
4.0	Diagnóstico radiológico de la osteomielitis	7
5.0	Patología ósea causada por <i>S. aureus</i>	8
5.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	8
5.2	Proteinasas como factores de virulencia	9
5.3	Fosfatasa ácida estafilocócica	11
6.0	Modelos Animales de osteomielitis	12
	Justificación	14
	Hipótesis	15
	Objetivo general	15
	Objetivos específicos	15
	Material y métodos	16
	Inoculación de <i>S. aureus</i>	
1.0	Selección de la cepa de <i>S. aureus</i> a inocular	16
1.1	Preparación de los inóculos de las 12 cepas de <i>S. aureus</i>	16
1.2	Determinación de la actividad proteolítica secretada	17

1.2.1	Preparación de inóculos	17
1.2.2	Preparación de los medios de cultivo con sustratos proteínicos	17
1.2.3	Pruebas de actividad proteolítica	18
1.3	Caracterización de la actividad de fosfatasa ácida	18
1.3.1	Obtención de medios de cultivo	18
1.3.2	Concentración por precipitación con acetona de las proteínas de <i>S. aureus</i>	19
1.3.3	Determinación de la concentración de proteína en medios	19
1.3.4	Medición y caracterización de la actividad de fosfatasa ácida	20
1.4	Caracterización de la cepa 76IQM de <i>S. aureus</i>	21
1.4.1	Caracterización fenotípica de la cepa 76IQM	21
1.4.2	Preparación del inóculo	23
1.4.3	Inóculo en la tibia de rata	23
1.4.4	Medición de la cuenta viable	23
1.5	Medios de cultivo	24
2.0	Desarrollo del modelo animal de infección	27
2.1	Animales	27
2.2	Procedimiento de inoculación bacteriana	28
2.2.1	Anestesia general	28
2.2.2	Procedimiento quirúrgico e inoculación de <i>S. aureus</i>	28
3.0	Aproximación clínica a la infección	32
4.0	Procedimientos radiológicos	32
4.1	Análisis de estudios radiológicos	33
5.0	Procedimientos microbiológicos	34

6.0	Procedimientos histológicos	34
Resultados		
1.0	Caracterización bioquímica y antibiograma de la cepa	35
2.0	Actividades proteolíticas de las cepas de <i>S. aureus</i>	37
3.0	Determinación de la actividad de fosfatasa ácida	39
4.0	Ensayos para la estandarización del método de inoculación	43
5.0	Inoculación del <i>S. aureus</i> 76IQM	43
6.0	Hallazgos clínicos ante la infección	44
7.0	Análisis radiológico	46
8.0	Análisis microbiológico	58
9.0	Patología macroscópica	60
10.0	Hallazgos histopatológicos	61
Discusión		68
Conclusiones		72
Apéndice		72
Aspectos de Bioseguridad		73
Medidas de Bioseguridad Nivel II		74
Literatura citada		75

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1	Cepario de <i>S. aureus</i>	16
Figura 1	Distribución de los aislados clínicos en cajas de Petri	18
Figura 2	Curva de calibración para la determinación de proteínas	20
Tabla 2	Parámetros bioquímicos y antibiograma evaluado en el Microscan®	22
Figura 3	Reacción de la fosfatasa ácida	27
Figura 4	Diversas maniobras con cepas de <i>S. aureus</i>	24-26
Figura 5	Alojamiento de las ratas	27
Figura 6	Aplicación del anestésico	28
Figura 7	Preparación del miembro a inocular	30
Figura 8	Descripción del procedimiento quirúrgico	31-32
Figura 9	Subdivisión de la tibia afectada	33
Figura 10	Caracterización bioquímica y antibiograma sistema Microscan®	36
Figura 11	Aislados clínicos de <i>S. aureus</i> sobre una caja de Petri agar-leche	37
Figura 12	Cepas de referencia y aislados clínicos sobre medios de cultivo	38
Tabla 3	Actividad de las proteinasas de los cultivos de <i>S. aureus</i>	38
Tabla 4	Actividad de fosfatasa ácida total y resistente al tartrato	40
Figura 13	Actividad de fosfatasa ácida + tartrato de sodio (50mM)	41
Figura 14	Actividad de fosfatasa ácida + tartrato + heparina (20U)	41
Figura 15	Actividad de fosfatasa ácida + tartrato + fluoruro (50mM)	42
Tabla 5	Efecto de los inhibidores sobre la actividad específica de la fosfatasa ácida	43

Figura 16	Estudios radiográficos que muestran la posición del inóculo	44
Figura 17	Características macroscópicas de los miembros inoculados	45
Tabla 6	Registro de peso corporal y temperatura de los animales inoculados	45
Figura 18	Estudio radiográfico de la tibia izquierda de la rata 1/Sa 76IQM	48
Figura 19	Estudio radiográfico de la tibia infectada de la rata 1, 35 días posinoculación	49
Figura 20	Estudio radiográfico de la tibia infectada de la rata 3, 15 días Posinfección	51
Figura 21	Estudio radiográfico de la rata 3, 35 días después de la Inoculación	52
Figura 22	Estudio radiográfico de la rata 4, 15 días posinoculación	54
Figura 23	Estudio radiográfico de la rata 4, 35 días posinoculación	55
Figura 24	Estudio radiográfico de la rata 5	57
Figura 25	Crecimiento de la cepa de <i>S. aureus</i> sobre agar-sangre	58
Figura 26	Morfología de las colonias de la cepa recuperada	59
Figura 27	Características macroscópicas de las tibias infectadas	60
Figura 28	Microfotografías de cortes histológicos de hueso de rata	62
Figura 29	Microfotografías de cortes histológicos de hueso de rata II	63
Figura 30	Microfotografías de cortes histológicos de hueso de rata III	64-65
Figura 31	Microfotografías de cortes histológicos de hueso de rata IV	66

Resumen

Con el objetivo de desarrollar un modelo de osteomielitis crónica, se caracterizaron 12 cepas de *S. aureus* obtenidas de pacientes con osteomielitis crónica. Para esto se determinó *in vitro*, en las 12 cepas su actividad proteolítica (caseinolítica, gelatinolítica y colagenolítica) y de fosfatasa ácida 5b semejante a la de origen osteoclástico. Tres de las doce cepas de *S. aureus* expresaron las tres actividades proteolíticas. La actividad de fosfatasa ácida secretada por las cepas de *S. aureus* de los aislados clínicos es similar a la TRAP 5b osteoclástica; es resistente al tartrato de sodio, y a la heparina; su inhibición con el fluoruro de sodio es parcial.

Generamos un modelo de osteomielitis crónica en la tibia izquierda de ratas Wistar de 6 meses de edad empleando una cepa de *S. aureus* 76IQM aislada de un paciente con osteítis crónica. Demostramos que expresa actividades caseinolíticas, gelatinolítica y colagenolítica así como de fosfatasa ácida, probables factores de patogenicidad a hueso. Dado el alto grado de virulencia de esta cepa no hubo necesidad de pretratar la cavidad con una sustancia facilitadora de la infección como el morruato de sodio un agente esclerosante (una práctica común en el diseño de modelos animales de osteomielitis). Las ratas infectadas fueron evaluadas clínicamente y la tibia osteomiéltica fue caracterizada por radiografía e histología. El presente modelo reproduce las lesiones similares a aquellas encontradas en la osteomielitis crónica humana y puede emplearse en estudios fisiopatológicos, inmunes y terapéuticos de la enfermedad.

Palabras clave: Osteomielitis crónica, *Staphylococcus aureus*, modelo animal, osteomielitis experimental, modelo en rata, infección ósea.

Characterization of model of staphylococcal osteomyelitis in rat

Abstract

With the purpose of create a model for chronic osteomyelitis, 12 strains of *S. aureus* obtained from patients with chronic osteomyelitis they were characterized. For this we determined in vitro, in the 12 strains their proteolytic activity (caseinolytic, gelatinolytic and collagenolytic), and acid phosphatase 5b similar to the osteoclastic origin one. Three of the twelve strains expressed the three-proteolytic activities. The activity of the acid phosphatase secreted by the *S. aureus* strains from the clinical isolates is similar to the 5b osteoclastic TRAP; it is resistant to the sodium tartrate and heparin; inhibition with sodium fluoride is partial.

We generated a model for chronic osteomyelitis in the left tibia of 6 month old wistar rats utilizing a 76 IQM *S. aureus* strain isolated from patient with chronic osteitis. We demonstrated that it expresses activities as well as acid phosphatase, wich are probable factors for bone pathogenesis. Due to the high virulence of this strain there was no need to pretreat the medular cavity with an infection facilitating substance like sodium morrhuate, a sclerosing agent (a common practice in animal model designs for osteomyelitis). The infected rats were clinically evaluated by radiology and histology.

The model present reproduces the similar lesions to those opposing ones in the human chronic osteomyelitis and it can be used in studies pathophysiological, inmunity and therapeutic of the illness.

Key words: chronic osteomyelitis, *Staphylococcus aureus*, experimental osteomyelitis, animal model, rat model, infection bone.

1.0 Introducción

La osteomielitis constituye un desafío para el médico tratante, esto se debe a que es una enfermedad de difícil tratamiento, además de los altos costos que genera la atención a los enfermos. Ésta enfermedad constantemente constituye un importante tema de investigación para la práctica médica y veterinaria.

El término de osteomielitis fue acuñado por Nelaton en 1844, describe la inflamación del hueso, de los tejidos blandos de la cavidad medular, endosito, periostio y canales vasculares. Es una enfermedad que requiere de un diagnóstico temprano y de un tratamiento vigoroso, ya que como se mencionó con anterioridad es de difícil tratamiento. La osteomielitis se clasifica en aguda, subaguda, crónica, de foco contiguo y en los humanos es común asociarla con enfermedades vasculares¹. Las infecciones óseas de curso agudo y las de origen postraumático que no son tratadas agresiva y tempranamente generalmente desarrollan una enfermedad de curso crónico que se caracteriza por una destrucción inflamatoria progresiva, necrosis y resorción ósea además de la producción compensatoria de nuevo hueso, procesos que pueden presentarse por períodos prolongados.^{2,3,4,5,6,7}

1.1 Etiología

Los agentes causales de la osteomielitis varían de acuerdo a la especie y a la edad de los pacientes afectados, pueden ser de origen bacteriano o fungal.⁸

La osteomielitis micótica es poco común, se piensa que esto debido a que la vía de entrada del hongo es inhalada. En los perros y en los gatos los principales agentes micóticos causantes de osteomielitis son: *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*.^{8,9}

Las bacterias que afectan pueden ser aeróbicas o anaeróbicas y la infección que se desarrolla puede ser purulenta o supurativa o no purulenta.^{2,5,10}

En los perros y en los gatos el *Staphylococcus aureus*, es la bacteria que con mayor frecuencia se ha aislado de infecciones óseas;^{5,8,10,11} sin embargo el *Staphylococcus intermedius* productor de β lactamasa es común.¹² También agentes como, *Streptococcus spp*, *Corynebacterium pyogenes*, *Salmonella spp*, *Proteus spp*, *Pasteurella spp* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como *Escherichia coli*, frecuentemente causan infecciones óseas supurativas.^{3,4,5,8,10,11}

Algunos anaerobios como *Clostridium spp* (*C. villosum*, *C. perfringens*, *C. welchi*)¹³, *Bacteroides spp*, *Fusobacterium spp* también son causa de infección, sobre todo cuando hay heridas generadas por peleas, ya que las bacterias anaeróbicas son residentes normales de la cavidad oral de los perros y gatos.^{14,15} La supuración en ésta clase de lesiones es maloliente y se aprecian sombras de gas en las radiografías.^{2,14,15}

Se ha subestimado la incidencia de las osteomielitis causadas por gérmenes anaeróbicos; esto se debe a que muy frecuentemente las muestras

microbiológicas se obtienen para bacterias aeróbicas y al no crecer son consideradas negativas. Se dice que las bacterias anaeróbicas pueden aislarse en más del 70% de las infecciones óseas en perros y gatos, si se colectan, transportan e incuban apropiadamente.¹²

Actinomyces pyogenes y otras bacterias piogénicas son causas comunes de osteomielitis supurativa en animales de granja.^{5,10,15} En los bovinos el *Actinomyces pyogenes* es la causa más frecuente de osteomielitis de la falange, mientras que la osteomielitis de la mandíbula por *Actinomyces Bovis*.^{8,10}

En 1978 Mackowiack demostró en un estudio retrospectivo en 40 personas que sólo el 44% de las muestras obtenidas de hisopados de fístulas y de tejidos blandos contenían el mismo patógeno que se obtenía de la muestra tomada de hueso en el momento quirúrgico del tratamiento de la osteomielitis; sin embargo el aislamiento de *Staphylococcus aureus* de la muestra tomada del tracto fistuloso mostró predecir importantemente (78%) que éste era el agente causal de la infección. En el mismo estudio se encontró que el 60% de las osteomielitis crónicas se debían a *S. aureus*, seguido de *Enterobacterias* (23%), *Pseudomonas* (9%) y *Streptococos* (9%).¹⁶

La identificación exacta del microorganismo y su sensibilidad antimicrobiana se puede obtener, solo por medio del cultivo de tejido óseo infectado, éste material se recupera a través de un procedimiento quirúrgico abierto;¹⁷ también es posible tomar muestras de los implantes que se retiran durante el procedimiento de desbride.¹²

En estudios realizados en humanos de los cultivos obtenidos a través de procedimientos abiertos el *Staphylococcus aureus* es el que con mayor frecuencia se ha aislado de osteomielitis crónicas, seguido de *Pseudomona aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.¹⁷

En osteomielitis vertebrales en humanos y perros el *S. aureus* es el más frecuente, pero asociadas con infecciones de tracto urinario son fuentes de infección las Gram negativas. *B. canis* también se ha aislado de animales con osteomielitis vertebral.^{8,15}

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es el organismo que con mayor frecuencia se ha aislado de casos de osteomielitis en humanos.^{4,6,8,18,19,20,21,22} En los niños el *Streptococcus pyogenes*, *agalactiae*, *Haemophilus influenzae* se aísla con frecuencia de osteomielitis aguda.^{23,3} Algunos otros agentes causantes de osteomielitis se han identificado en humanos inmunocomprometidos, éstos son; *Aspergillus*, *Mycobacterium avium*, *Candida albicans*. En poblaciones humanas donde la tuberculosis es prevalente, también se ha aislado *Mycobacterium tuberculosis*.³

Las infecciones bacterianas del hueso pueden ser mono o polimicrobianas. Entre el 35 y 50% de los casos en los humanos y en los animales las osteomielitis se

describen como monomicrobianas. Las infecciones asociadas a prótesis articulares y las osteomielitis hematógenas predominantemente también son monomicrobianas.^{8,24} En los animales la osteomielitis hematógena aguda es polimicrobiana causada por bacterias entéricas Gram negativas.⁸ En un estudio retrospectivo realizado en perros y gatos un solo organismo fue aislado de casos de osteomielitis, mientras que en el 33% de los casos fueron aislados dos microorganismos asociados y tres en el 15% de los casos.²⁵

En estudios recientes se ha demostrado que la prevalencia de infecciones posquirúrgicas en algunos pacientes humanos y animales se asocia al uso de implantes y la presencia de éstos cuerpos extraños son un factor predisponente o de riesgo para padecer éste tipo de infecciones.^{11,12,15} Las infecciones asociadas con la presencia de implantes ortopédicos o prótesis son una severa complicación de la cirugía ortopédica; *S. aureus* y *S. epidermidis* representan a los agentes patógenos responsables, se ha encontrado que en un 90% son causales de las infecciones a través de los tractos de los clavos.^{17,20}

Estas infecciones asociadas a la presencia de implantes ortopédicos, se deben a que algunas proteínas del hospedero promueven la fijación al implante por bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estas proteínas son de origen plasmático o bien componentes de la matriz extracelular y son: fibrinógeno o fibrina, fibronectina, colágena, laminina, sialoproteína ósea y recientemente descrita una proteína que se une a la matriz extracelular con amplia especificidad.^{7,26}

1.2 Factores predisponentes a la infección.

A pesar de la alta incidencia de contaminación durante la cirugía, la osteomielitis sólo se desarrolla en una pequeña proporción de casos. Algunos factores que aumentan la probabilidad del desarrollo de la infección son el traumatismo excesivo en los tejidos blandos, desgarramiento perióstico lo que resulta en la desvascularización del hueso cortical, inestabilidad de la fractura y presencia de factores individuales del hospedero que pueden alterar las defensas locales, como de malignidad (neoplasias) o enfermedades crónicas como la diabetes mellitus.^{2,7,10} Presencia de cuerpos extraños, necrosis ósea, una gran contaminación y osteolisis.¹⁷

1.3 Vías de entrada del agente etiológico

Existen diferentes vías por medio de las cuales la bacteria entra al hueso: la inoculación directa en el momento en que se realiza el tratamiento quirúrgico de una fractura es el mecanismo más común, las fracturas expuestas y las heridas por mordeduras, son otros ejemplos. La infección que se extiende de los tejidos blandos que rodean al hueso como es el caso de sinusitis, artritis séptica periodontitis u otitis media son otra causa de osteomielitis.^{4,5,10}

La vía hematogena de la infección es una causa frecuente en niños y animales jóvenes; la localización típica de la infección es en la región metafisiaria y vertebral.^{5,11,27}

2.0 Patogenia

El desarrollo de la osteomielitis como cualquier otra infección, depende de una íntima interrelación entre el microorganismo, el hospedero susceptible y los factores ambientales predisponentes, a éste conjunto de factores se les conoce como la triada de la osteomielitis.²⁸

Las características que influyen sobre esta interacción incluyen: 1) propiedades anatómicas del hueso involucrado, 2) poder de reparación de los tejidos, 3) mecanismos inmunes celulares y humorales y 4) virulencia del organismo.

Los factores relacionados al agente infeccioso incluyen la vía de entrada, localización, virulencia y colonización del área. Los factores que son significativos del huésped incluyen las propiedades anatómicas y mecánicas del hueso involucrado, los mecanismos celulares y humorales y el poder de reparación del área dañada.^{8,28,29}

La colonización del tejido óseo por un agente infeccioso se manifiesta por los cambios debidos a la inflamación y destrucción del tejido así como por la degradación de la matriz extracelular y los depósitos de calcio.¹

Una vez que la bacteria se ha inoculado en hueso se desarrolla una reacción inflamatoria, una hiperemia, se incrementa la permeabilidad de los vasos sanguíneos, el resultado es la diapedesis de las células fagocíticas y cambia el pH, lo que contribuye a el rompimiento de las trabéculas y la remoción de la matriz ósea; posteriormente se desarrolla una trombosis local, la cual provoca necrosis del hueso esponjoso del área. La hiperemia y la actividad de las enzimas proteolíticas liberadas cuando las células blancas se destruyen por acción bacteriana, causan la resorción de fragmentos óseos resultando en la lisis de la superficie cortical del hueso.^{2,8,28,29,30}

El aporte sanguíneo del hueso o de un fragmento óseo es vital para poder controlar o limitar un proceso infeccioso. Si el flujo sanguíneo se encuentra dañado la posibilidad de combatir la infección se encuentra limitada. El estancamiento del flujo sanguíneo crea un excelente medio de cultivo para las bacterias.^{2,4,5,8,12,,17,28}

Una vez que la bacteria entra al sitio de fractura, se adhiere al endotelio vascular dañado donde se expone la membrana basal, prolifera y provoca una respuesta inflamatoria. La colonia se multiplica si las condiciones son aceptables, y si la respuesta inflamatoria inicial no controla el foco de infección; se establece un nuevo foco de infección resultando en la expansión del área inflamatoria.^{2,4,7}

Cuando la bacteria se localiza en las áreas metafisiarias o vertebrales, se ha visto que el flujo sanguíneo lento y la turbulencia de la sangre favorece la colonización de las mismas. El exudado se acumula en los espacios intertrabeculares y se extiende. Al incrementarse la presión intramedular se causa compresión vascular, trombosis, necrosis de la grasa intramedular, médula ósea y hueso, empeorando la isquemia tisular. La hiperemia local, producción de prostaglandinas, liberación de citocinas por los tejidos locales y las células inflamatorias estimulan la resorción ósea osteoclástica.^{5,8,10}

El tejido fibroso avascular y el secuestro óseo son un mecanismo de defensa del hospedero, al tratar de concentrar o aislar a la infección en una sola área; constituyen el blanco en el tratamiento quirúrgico, ya que deberán ser removidos. Cuando la osteomielitis proliferativa se disemina a estructuras vecinas a través de los canales de Havers y de Volkman; esto contribuye a la destrucción avascular, incrementa la necrosis y la muerte de los osteocitos. El suplemento sanguíneo cortical se compromete por la necrosis de los fragmentos del secuestro.^{8,12}

Los segmentos de hueso muerto avascular se separan, la infección se disemina y traspasa la superficie ósea y la corteza, llegando al espacio subperiosteal, el material supurativo se extiende hacia el periostio; cuando éste se afecta se inflama como un mecanismo de defensa y se inicia la formación del involucro que consta de tejido fibroso y hueso de nueva formación. El involucro y el secuestro condicionan la persistencia de la bacteria, impidiendo la difusión de antibióticos, células fagocíticas y anticuerpos.^{3,7,20,26,31}

Otro tipo de respuesta es el llamado absceso de Brodie que puede ocurrir cuando se establece una osteomielitis supurativa y el huésped es capaz de controlar la infección por lo que ésta se disemina a lo largo del hueso esponjoso pero no llega a la región subperiosteal. El área central de supuración y necrosis se rodea por tejido de granulación el cual se fibrosa, y se desarrolla un absceso localizado, es común localizarlo en las áreas metafisiarias.²³

2.1 Lisis ósea inducida por la bacteria

Las bacterias causan una pérdida patológica del hueso debido a: i) la bacteria destruye directamente los componentes del hueso por liberar ácidos y proteinasas, ii) promueven procesos celulares que estimulan la degradación del hueso o iii) inhiben la síntesis de la matriz ósea. Los últimos dos mecanismos pueden ser efecto directo de la bacteria o bien consecuencia de que el hospedero libere factores tales como citocinas o prostaglandinas que actúan en las células óseas.^{26,31}

Durante el curso de la infección, la bacteria induce la destrucción local del hueso, éste mecanismo sirve para diseminar y ayuda a la persistencia de la infección en

el hueso, así mismo ésta osteólisis es responsable del aflojamiento de los implantes.¹⁷

Al inicio de la infección se desencadena una respuesta inflamatoria, trombosis de los vasos sanguíneos endosteales y periosteales, infartos óseos, formación de abscesos y formación de secuestros. Ante la respuesta inflamatoria se desarrolla un mecanismo de osteoclastogénesis vía estimulación de factores solubles o citocinas, tales como IL1, TNF α , y prostaglandinas; también el sistema inmune participa después de interactuar con la bacteria.^{17,32}

Los estafilococos y otras bacterias Gram positivas producen un glicocalix o biofilm; consiste de polisacáridos extracelulares, iones y nutrientes. Una de las funciones más importantes del biofilm es la de mediar la adherencia de las bacterias en los diferentes sustratos presentes en su medio ambiente natural. Protege a las colonias bacterianas y facilita su adhesión, la bacteria se protege de la fagocitosis y anticuerpos, y altera la susceptibilidad de la bacteria a las drogas.³³

2.2 Respuesta inmune ante la infección

Los linfocitos T activados juegan un papel crítico en la destrucción ósea observada en estados inflamatorios tales como artritis reumatoide, osteomielitis, enfermedad periodontal, ciertas malignidades y enfermedades crónicas como la que produce el virus de la inmunodeficiencia humana VIH y hepatitis además de algunas infecciones virales crónicas. La activación de los linfocitos T con antígenos microbianos o péptidos de colágena desnaturalizada conduce a la síntesis de citocinas inflamatorias específicas, incrementa la expresión de moléculas de adhesión celular y otros cambios característicos de inflamación local. Las citocinas osteoclastogénicas secretadas por linfocitos T activados, macrófagos, fibroblastos y osteoblastos son; las interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α). Las citocinas que inhiben la formación y activación de osteoclastos son: IL-4, IL-10, IL-13, interferón (IFN γ).^{32,34,35}

3.0 Diagnóstico histopatológico

La pronta y precisa identificación de la infección requiere del examen histológico del material para biopsia.^{10,29}

Una vez que se desarrolla la infección, la respuesta inflamatoria aguda provoca la producción del exudado que contiene bacterias, inmediatamente llegan al lugar los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y células plasmáticas, los cuales liberan enzimas, iniciando así el proceso de necrosis. El hueso esponjoso se destruye, se adelgaza el hueso cortical y se erosiona el periostio formandose un absceso en los tejidos blandos. En estadios avanzados de la enfermedad predominan los cambios osteolíticos, fragmentos necróticos óseos, fibrosis alrededor de zonas inflamatorias y también se observa nueva formación ósea.^{4,10,36}

Histológicamente la infección a tejido óseo se caracteriza por cambios asociados a un proceso inflamatorio purulento agudo, edema, hemorragia, hiperemia, exudación de neutrófilos, necrosis de hueso y de tejido blando en la médula ósea, posteriormente se reabsorbe hueso por los osteoclastos. Los osteoclastos agrandan las paredes de los canales Haversianos y de Volkmann permitiendo la extensión del exudado séptico, diseminación de la infección y drenaje de la lesión.^{2,4,12}

La necrosis ósea se caracteriza histológicamente por la muerte de osteocitos, por lo que las lagunas osteocíticas se observan vacías, pueden observarse microabscesos rodeados de tejido conectivo.¹⁰

4.0 Diagnóstico radiológico de la osteomielitis.

Los estudios radiológicos son parte fundamental en el diagnóstico de cualquier enfermedad de involucramiento óseo. El papel del examen radiológico en el diagnóstico de la infección ósea asociada con una fractura no siempre es claro. Los cambios radiológicos no son evidentes en el curso temprano de la infección, pudiéndose establecer diagnósticos falsos negativos, y los cambios observados dependen de la fase de la enfermedad; es decir, si es aguda o crónica, de la edad del animal, del tipo de hueso afectado, de la causa de la infección y de los agentes etiológicos involucrados en la osteomielitis aguda puede observarse solo inflamación de los tejidos blandos.²⁹

La destrucción local ósea se aprecia por lesiones líticas; se sugiere que la lisis ósea ocurre en las infecciones óseas más tempranas y la formación de huesos o esclerosis además de secuestros son un hallazgo de la etapa crónica de la enfermedad. Con la rápida diseminación a lo largo del hueso, pueden encontrarse áreas líticas que son difíciles de visualizar por el desarrollo del callo óseo, mientras que lesiones localizadas crean grandes zonas líticas.²

Se puede observar una reacción o respuesta del periostio a la infección, pero cuando se forma callo es difícil observarla; sin embargo la reacción del periostio a la infección se aprecia por que es una respuesta más grande y el callo está más relacionado a la zona fracturada. Ocasionalmente sobre todo en personas o animales en crecimiento, el periostio se separa del hueso depositándose material purulento, permitiendo aún más la elevación del periostio y formando una nueva superficie ósea con patrón laminar.^{2,37}

Los primeros cambios radiográficos en una osteomielitis se aprecian desde los 7 a 10 días cuando es un niño o un animal inmaduro, ya que el periostio es más reactivo, o bien hasta las 2 semanas del inicio de la infección.^{2,29,37} Los cambios óseos observados se caracterizan por lisis ósea con radio lucidez de la cortical o resorción endosteal, puede observarse la formación de secuestros cuando fragmentos corticales se ven involucrados sobre todo en la fase crónica de la enfermedad; ésta imagen se caracteriza por una porción de hueso rodeado por un área radiolúcida y posteriormente tejido óseo que constituye un involucro.^{2,29,37}

Cuando la infección se centra alrededor de implantes metálicos, se pueden observar áreas de lisis alrededor de los mismos.²

Cuando los animales son jóvenes la corteza diafisaria entera puede rápidamente reabsorberse y ser reemplazada por nuevo tejido llamado involucro. El secuestro puede ser pequeño y ser obscurecido por el involucro que lo rodea, haciendo éste difícil de observar; sin embargo se deberá sospechar de su existencia en casos de infecciones óseas persistentes, pudiendo ser necesarios los exámenes radiográficos seriados para identificarlos.²⁹

5.0 Patología ósea causada por *Staphylococcus aureus*

5.1 *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* es un coco Gram+; forma parte de la microflora normal en el 20-50% de la población, viviendo en armonía con la piel y membranas mucosas del hospedero; estas barreras son las que impiden que este patógeno penetre a otras partes del organismo (Nair et al., 2000). Crece agrupado en racimos; es coagulasa positivo, no forma esporas, no es móvil. Muchas cepas producen exotoxinas incluyendo las enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D, E, la toxina del síndrome de choque tóxico TSST-1 y las toxinas exfoliativas A y B. otros factores de virulencia de importancia para el desarrollo de infecciones en hueso y articulaciones son: el polisacárido capsular, ácido lipoteicoico y peptidoglicanos, componentes de la superficie microbiana reconocedoras de la matriz extracelular, proteína A.²⁶

La habilidad que posee el *S. aureus* para penetrar al organismo y causar enfermedad en huesos y articulaciones depende de: a) su habilidad para unirse a los tejidos del hospedero y su tropismo hacia los tejidos, b) su capacidad para evadir los sistemas de defensa y para causar daño a los tejidos del hospedero.²⁹

Al inicio de la infección estafilocócica, la adherencia de la bacteria al hueso se logra por medio de la expresión de receptores o proteínas de la pared microbiana (adhesinas) específicos para diferentes componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, laminina, colágena y sialoglicoproteína ósea. La expresión de las adhesinas que se unen a la colágena permite la unión del patógeno al cartílago.^{3,7,20,26,31}

Hudson y cols. (1995)³⁸ demostraron en cultivos de osteoblastos la capacidad del *S. aureus* de internalizarse en las células y sobrevivir intracelularmente. Para sobrevivir alteran su estado metabólico apareciendo las llamadas pequeñas variantes de colonias, lo que podría explicar la persistencia de infecciones óseas.^{7,15,38} La presencia intracelular de esta bacteria induce al osteoblasto a apoptosis vía la expresión del ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL) mismo que activa a la caspasa 8.³⁹ Se conoce que *S. aureus* también es capaz de internalizarse en células endoteliales de la glándula mamaria, células epiteliales y osteoblastos.^{7,15,38}

Los mecanismos de virulencia de *S. aureus* actúan en forma coordinada u orquestada durante el proceso de infección. Caracterizan a la infección estafilocócica la rápida multiplicación del patógeno y la inducción de la inflamación en el sitio de infección y su habilidad para diseminar e iniciar la infección metastásica.⁴⁰ Este mecanismo se facilita por la expresión de proteinasas mecanismo que se encuentra bajo el control de un gen regulador accesorio (locus *agr*), que en altas densidades celulares es responsable de inducir la expresión de toxinas secretadas y exoenzimas, que simultáneamente promueven la reducida expresión de adhesinas de la superficie celular y factores de colonización. Por lo tanto se ha demostrado que cepas mutantes que carecen del gen *agr* manifiestan una expresión abundante de factores de colonización y un defecto pleiotrópico en la expresión de factores de virulencia secretados, lo que ha demostrado en diferentes modelos de infección que su virulencia está atenuada. Y en el caso del gen regulador accesorio locus *sar*, éste se requiere para una óptima transcripción del *agr*.^{3,41,42}

La síntesis de proteinasas extracelulares se activa por *agr* y se reprime por *sarA*; de tal forma que la producción de proteinasas se lleva a cabo principalmente durante la fase exponencial tardía y fases posexponenciales de crecimiento.^{40,41,42}

5.2 Proteinasas como factores de virulencia.

Muchas bacterias producen proteinasas con una amplia especificidad al sustrato lo que les permite obtener nutrientes de diferentes fuentes. Componentes nutricionales importantes son los carbohidratos, que se generan por glicosilasas como la amilasa, hialuronidasa y otras proteinasas, otro componente nutricional importante es el hierro.⁴³

Las proteinasas producidas por diversos microorganismos patógenos, son consideradas como factores de virulencia que participan en la destrucción de componentes titulares facilitando la invasión de órganos y/o tejidos, evasión de la respuesta inmune, activación de proenzimas y toxinas como un mecanismo de daño al hospedero,⁴³ activación de zimógenos, algunas activan la cascada de generación de bradicinina, activación de la coagulación sanguínea, fibrinólisis, inactivación de los inhibidores plasmáticos de proteinasas, inactivación de inmunoglobulinas, activación de toxinas bacterianas.⁴³

La expresión de proteinasas juega un papel importante en la transición de *S. aureus* de un fenotipo adhesivo a uno invasivo por degradar proteínas de la superficie celular bacteriana, tales como la proteína de unión a la fibronectina y proteína A.⁴⁰

Karlsson y Arvidson 2002, estudiaron el nivel de expresión de proteinasas en diferentes aislados clínicos de *S. aureus*, y demostraron que el nivel de expresión varía considerablemente entre ellos, debido a la expresión de genes reguladores, cepas que expresan altas concentraciones de proteinasas muestran una reducida actividad del gen *SigB*, que depende de la actividad de *sarA*. Esto demuestra que

la síntesis de éstas enzimas como factores de virulencia, son producidas sólo durante un momento durante la infección, que la bacteria es capaz de incrementar o reducir sus niveles de expresión durante la infección; es decir que tiene la habilidad de regular la producción de enzimas, lo que demostraría que son igual de virulentas las cepas negativas, que las positivas.⁴¹

Es bien sabido que el *S. aureus* secreta cuatro tipos de enzimas proteolíticas o proteinasas que son: serina proteasa (V8, SspA), cisteína proteasa o tiol proteasa (SspB), codificadas por el mismo operón, metalo-proteinasa (aureolysina) y una segunda cisteína proteasa conocida como stafopaina (Scp).^{42,44,60} Las cuatro son expresadas como proenzimas que son cortadas proteolíticamente para generar enzimas maduras.^{40,44}

La serina- proteasa o proteasa V8 (Ssp) fue una de las primeras enzimas de *S. aureus* en ser purificadas y caracterizadas en detalle.⁴⁰ Se trata de una endopeptidasa, miembro de la familia de las glutamil endopeptidasas que rompe las uniones peptídicas en el extremo carboxiterminal de ácido glutámico y es inhibida por el diisopropil fluorofosfato (DFP). No se conoce su contribución al crecimiento y sobrevivencia de la bacteria aunque estudios realizados por Rice et al., 2001, indican que parece ser que la Ssp es la única proteína que es requerida por el *S. aureus* para su crecimiento y supervivencia. Trabajos previos indican que esta proteína se encuentra implicada en la degradación de la proteína de unión a la fibronectina, sugiriendo que puede jugar un papel importante en el control de la estabilidad y/o procesamiento de las proteínas de la superficie celular. El operón que codifica para las proteinasas de serina SspA y SspB cisteína proteasa es el mismo. Estudios demuestran que la SspA se requiere para la maduración proteolítica de SspB.^{40,45}

La proteasa V8 (SspA) es secretada como un precursor inactivo, que es procesado por la metaloproteasa aureolisina para formar la serina proteasa madura. La aureolisina también es expresada como un precursor pero su mecanismo de maduración se desconoce. En consecuencia, la Ssp A es necesaria para la maduración de SspB.⁴⁰

La proteinasa tiol es activa únicamente en presencia de agentes reductores y se activa por metales pesados. La metalo-proteinasa es completamente inactivada por quelantes de metales, tales como el ácido dietil amino tetracético (EDTA) y 1,10-fenantrolina.^{43,44,45}

Se ha descrito ampliamente la síntesis por *S. aureus* de una hialuronidasa; sin embargo se ha descuidado el estudio de la función de ésta enzima en la patogenia de las enfermedades debidas a *S. aureus*.^{43,46}

El *S. aureus* expresa lipasas, éstas se consideran un mecanismo de virulencia ya que neutralizan a los ácidos grasos y lípidos que actúan como bactericidas.³¹ La

expresión de colagenasas por *S. aureus* se menciona poco en la literatura, sin embargo se sugiere que la presencia de esta enzima bacteriana en mujeres genera complicaciones durante la gestación, al desarrollar una ruptura prematura de las membranas, corioamnióticas, además de asociarla con infecciones puerperales.⁴⁷

5.3 Fosfatasa ácida estafilocócica.

Recientemente se informó de la primera caracterización a nivel molecular de una fosfatasa ácida obtenida a partir de una cepa de *S. aureus* aislada de vegetales. Se determinó que es una fosfatasa ácida tipo C inespecífica.⁴⁸

Hasta la fecha no se conoce el mecanismo de acción de esta fosfatasa ácida sintetizada por *S. aureus* a nivel óseo; sin embargo se ha determinado que una fosfatasa ácida catiónica estafilocócica al tener una gran afinidad sobre la membrana basal del glomérulo renal induce glomerulonefritis en ratas, también observaron que esta fosfatasa ácida se une *in vitro* a las células endoteliales de la vena umbilical humana conduciendo a vasculitis y la unión de esta enzima con anticuerpos anti-fosfatasa ácida estafilocócica puede ser vasculogénico y nefrogénico en pacientes humanos que sufren de granulomatosis de Wegener.⁴⁹ Esto demuestra que la expresión de la fosfatasa ácida por el *S. aureus* constituye un factor de virulencia más para esta bacteria.

Las fosfatasas catalizan la desfosforilación de varios sustratos por hidrólisis de uniones fosfoéster (nucleótidos, fosfatos de azúcares y ácido fítico) o fosfoanhidrido. Cada célula está equipada con diferentes enzimas que tienen funciones reguladoras principales o accesorias en la biología de la célula. Algunas son secretadas en forma soluble, pero otras se retienen como proteínas de membrana.⁴⁸

Una vez hidrolizado el sustrato se libera fosfato inorgánico y orgánico y puede transportarse a través de la membrana y proveer a la célula con nutrientes esenciales, otras tienen funciones importantes como mecanismos de virulencia o bien en el citosol participan en reacciones de desfosforilación durante las señales de transducción o en diversas vías metabólicas.⁴⁸

La TRAP 5b de origen osteoclasto también puede actuar desfosforilando 2 fosfoproteínas de la matriz ósea la osteopontina y la sialoproteína ósea II. Contienen grupos fosfatos en residuos de serina. La osteopontina promueve la unión del osteoclasto vía la integrina $\alpha v \beta 3$ que es abundante en la zona de unión del osteoclasto, por lo que se ha propuesto que la osteopontina regula la influencia de unión del osteoclasto al hueso.^{50, 51}

6.0 Modelos animales de osteomielitis.

Los modelos animales de osteomielitis se han empleado para examinar la fisiopatología y tratamiento de esta enfermedad; diferentes especies animales han sido empleadas; sin embargo, el uso de la rata como modelo animal de infección ha mostrado varias ventajas con respecto a otras especies.^{52,53,54}

Dada la resistencia que muestra el hueso a la infección se han generado diferentes métodos para lograr una osteomielitis. Todos se basan en lograr ambientes de reducida irrigación, favoreciendo la inflamación y muchos de ellos, además involucran el uso de cuerpos extraños, que constituyen un sustrato inerte en donde las bacterias tales como el *S. aureus* se adhieren tenazmente; estos cuerpos extraños han sido implantes contaminados³³, cemento óseo⁵⁴, cera para hueso,^{52,53} goma de fibrina²² etc.

La colocación del inóculo bacteriano para producir la infección es variable: la vía intravenosa muestra desventajas tales como el tamaño del vaso sanguíneo, y la distribución sistémica de la bacteria lo que ocasiona una mortalidad elevada; la vía local de inoculación parece ser adecuada; sin embargo los problemas que esta vía ofrece son la fuga del inóculo y riesgo de contaminación a los tejidos blandos. Este método puede ser exitoso colocando directamente el inóculo a través de una perforación hecha al hueso y colocando el inóculo mediante una aguja ó por medio de un fresado óseo empleando una broca lo que genera calor en la zona y un proceso inflamatorio mayor^{52,53}

En el modelo de Monzón et al., 2002, se emplean cepas muy adherentes debido a la formación de un exopolisacárido, que media la adherencia bacteriana y la formación de una biocapa o biofilm sobre varias superficies y al ser colocada ésta directamente sobre un implante metálico, protege a las bacterias de la acción de células fagocíticas, así como de la difusión adecuada de antimicrobianos induciendo infecciones crónicas.³³

El empleo de sustancias facilitadoras que producen esclerosis u oclusión de la microvasculatura centro medular como el morruato de sodio al 5% es muy común en la producción de osteomielitis experimental.⁵² En el modelo de Norden et al., 1970, en conejo, la adición de morruato de sodio al inóculo de *S. aureus* genera rangos de infección superiores al 80%, mientras que la administración de inóculos sin el morruato resulta en huesos estériles hasta los 14 – 60 días postinoculación.⁶ Estas sustancias se aplican previamente a la colocación del inóculo. En un estudio realizado por Rissing et al., 1985 se demostró que el morruato de sodio era tóxico para el *S. aureus* por lo que sugirió explorar otros métodos para eliminar el empleo del morruato de sodio como facilitador.⁵² Rissing et al., 1985, posteriormente desarrollaron un nuevo modelo animal en rata empleando ácido araquidónico 250ng (nanogramos) en un volumen de 5µl sobre el fundamento de que éste actúa favoreciendo la liberación de prostaglandinas incrementando así el proceso inflamatorio. Lograron infectar a las ratas empleando una menor cantidad de ácido araquidónico comparado con el morruato de sodio, obteniendo las características deseadas de la infección.⁵³ Rissing et al., 1985 refieren que el morruato de sodio es una mezcla heterogénea de ácidos grasos de cadena larga, que facilita la infección por ocluir la microvasculatura. Esta condición también puede dañar a los

osteocitos y la perturbación de la membrana celular concomitante libera ácido araquidónico de la membrana lo que favorece la liberación de prostaglandinas E2 y la I2 ambas mediadoras de la resorción ósea y de la respuesta inflamatoria. El empleo del ácido araquidónico que es uno de los ácidos grasos presentes en el morruato de sodio facilitó la infección a dosis más pequeñas y resultó ser tan efectivo como dosis mayores de morruato de sodio.⁵³

Los modelos animales de infección ósea deben correlacionar razonablemente bien con la enfermedad humana en cronicidad y cambios radiológicos e histológicos.⁵⁴

La presencia de *S. aureus* en un hueso infectado implica la existencia de factores de virulencia específicos que promueven la colonización del hueso y tejido conectivo.

Los hallazgos fisiopatológicos de la osteomielitis son diferentes; esto es si la infección sigue a la implantación de un cuerpo extraño es diferente a la que se produce por una osteomielitis hematógena.⁵⁴

Se han empleado modelos en perros, ratón, cobayo, aves, conejos y ratas.^{6,18,19,20,21,27,52,55} Tales estudios han concluido que el hueso normal es relativamente resistente a la infección y los estudios de modelos animales de osteomielitis han mostrado que la enfermedad crónica sólo puede generarse si concurren varios factores:

- Inoculación de un número suficiente de bacterias patógenas (grandes inóculos).
- Hueso cortical avascular.
- Microambiente favorable para la colonización y multiplicación bacteriana (Implantes metálicos, hematoma, tejido blando necrótico).

Justificación

La osteomielitis es una enfermedad devastadora, dolorosa y desgastante que conduce al debilitamiento progresivo de la persona o animal infectado. Genera secuelas adicionales como la diseminación de la infección ya sea en forma directa o por vía sanguínea a otros huesos o tejidos. La pérdida masiva ósea predispone a fracturas patológicas, aflojamiento de implantes, faltas de unión, pérdida de piezas dentales y en el caso de la osteomielitis vertebral se puede producir compresión de la médula espinal o nervios por la fibrosis. El tratamiento de la osteomielitis crónica es costoso y la mayoría de las ocasiones no resuelve el problema.

La producción experimental de osteomielitis en diferentes modelos animales ha permitido estudiar diferentes aspectos tan importantes de la enfermedad como: virulencia de las cepas infectantes, mecanismos de lesión, tratamientos, inmunidad, etc, ya que los estudios clínicos de la osteomielitis son difíciles debido a las múltiples variables involucradas en el proceso de la enfermedad y a la variabilidad en los protocolos de tratamiento.^{4,19}

Las ventajas que representa el emplear a la rata como modelo animal para el estudio de la osteomielitis son las siguientes: se consideran confiables ya que diferentes estudios han demostrado que los hallazgos histopatológicos son similares a la osteomielitis crónica postraumática en humanos, es un modelo económico ya que ocupa espacios reducidos y su consumo de alimento es menor. La rata es más resistente a tratamientos prolongados y a procedimientos quirúrgicos, presenta un período de vida menor lo que permite estudiar varias generaciones de individuos de la misma especie. La principal desventaja del uso de ratas radica en que su tamaño no permite realizar procedimientos quirúrgicos mayores, el tamaño de sus huesos dificulta la realización de algunos procedimientos.

Para el estudio de los diferentes procesos de la infección ósea es muy importante el desarrollo de modelos animales de infección que conserven el estado natural de la enfermedad; por lo que ante éste panorama se decidió establecer un modelo animal de infección, el que constituirá el punto de partida más para el subsecuente estudio de diferentes aspectos moleculares de la osteomielitis.

Los avances en el tratamiento de la osteomielitis crónica deberán enfocarse al entendimiento de los diversos factores de virulencia que facilitan la adhesión, colonización e invasión de *S. aureus* al tejido óseo, lo que permitirá detener a la infección antes de que se establezca desarrollando terapias más específicas.

En el INO/CNR contamos con diferentes cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes humanos con diferentes grados de infección, el estudio de los mecanismos de virulencia que hacen a éstas cepas especialmente virulentas a hueso, permitiría establecer terapias más específicas.

Hipótesis

La inoculación a la tibia de rata de una cepa de *S. aureus* obtenida a partir de un aislado clínico caracterizado por la expresión elevada de proteinasas y fosfatasa ácida, induce el desarrollo de osteomielitis crónica.

Objetivo general

Generar un modelo experimental de osteomielitis crónica en tibia de rata inoculando una cepa de *S. aureus* aislada de pacientes con osteomielitis, con elevada expresión de proteinasas y fosfatasa ácida.

Objetivos específicos

1. Determinar in vitro, la actividad proteolítica y de fosfatasa ácida de 12 cepas de *S. aureus* obtenidas de pacientes con osteomielitis como probable índice de patogenicidad a hueso.
2. Diseñar un procedimiento quirúrgico para la inoculación de *S. aureus* en tibia de rata.
3. Inocular en tibia de rata una cepa de *S. aureus* con elevada expresión de proteinasas y fosfatasa ácida
4. Caracterizar el modelo de infección ósea en la rata, mediante datos clínicos, radiológicos, bacteriológicos e histopatológicos.

Material y Métodos

Inoculación del *Staphylococcus aureus*: Selección, preparación y estandarización de la cepa bacteriana empleada para infectar tibias de ratas.

1.0 Selección de la cepa de *Staphylococcus aureus* a inocular. En el Servicio de Bioquímica-Ortopedia tenemos un cepario de *S. aureus* que incluye 12 cepas de origen clínico obtenidas de pacientes adultos con infecciones óseas (Tabla 1) que han sido parcialmente caracterizadas.⁵⁶

Tabla 1. Cepario de *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos de pacientes adultos con infecciones óseas.

Paciente	Origen clínico	Adhesinas	
		<i>cna</i>	<i>map</i>
17 CPJ	Falta de unión ósea infectada	-	-
54 SL	Falta de unión ósea infectada	-	-
68 FFC	Falta de unión ósea infectada	+	-
69 GGT	Osteomielitis crónica	-	-
76 IQM	Osteítis	+	+
88 VTM	Falta de unión ósea infectada	+	+
89 RTC	Falta de unión ósea infectada	+	+
92 HM	Osteomielitis crónica	+	+
93 EMC	Falta de unión ósea infectada	-	-
101 AOC	Osteítis	-	-
105 IMO	Osteítis	+	+
107 FMR	Osteítis	-	-

Fuente: Martínez CJ. 1999.

La selección de la cepa a inocular en la tibia de ratas para generar el modelo de osteomielitis se basó en sus actividades enzimáticas secretadas de proteinasas (caseinolítica, gelatinolítica y colagenolítica) y de fosfatasa ácida resistente a tartrato del tipo 5b (osteoclástica), resistente a heparina y sensible a fluoruro de sodio (probablemente factores de virulencia). Para determinar sus actividades de proteinasas y de fosfatasa ácida se prepararon lotes frescos de las 12 cepas de *S. aureus*.

1.1 Preparación de los inóculos de las 12 cepas de *S. aureus*.

De lotes de reserva de 14 cepas bacterianas almacenadas en criotubos a -20°C se suspendieron alícuotas de 200 µL en 3.5 mL de infusión cerebro corazón (BHI el método de preparación del caldo se indica más adelante). Estas suspensiones fueron incubadas a 37°C durante 24h. Para su caracterización como *S. aureus*, de cada una de las cepas que crecieron (2 cepas no crecieron) se sembraron por estría asadas en agar-sangre, agar de sal y manitol, agar con eosina/azul de metileno; en agar con soya y tripticaseína se estudió su morfología (color, bordes).

Se tomaron muestras para las pruebas de coagulasa y catalasa. De las suspensiones se recuperaron las bacterias por centrifugación y resuspendieron en 2.5 mL de caldo BHI fresco. Se almacenaron a -20°C alícuotas de 750 µL más 250 µL de glicerol en criotubos, unos como cepas de reserva y unos como cepas de trabajo (Fig. 9A).

una vez realizadas las pruebas de viabilidad e identidad de las cepas frescas como cepas de *S. aureus*, de cada una de las cepas de trabajo frescas, almacenadas en criotubos, se prepararon siembras por estría (una asada) en tubos con agar con soya y tripticaseína inclinado para el trabajo diario. Estas siembras se pueden almacenar a 4°C hasta por 4 meses (Fig. 9B).

1.2 Determinación de la actividad proteolítica secretada por cepas de *Staphylococcus aureus*. A continuación se describen los pasos para medir la actividad proteolítica secretada en cultivos de agar con sustrato proteínico por cada una de las 12 cepas de *S. aureus* evaluadas.

1.2.1 Preparación de inóculos. Se sembraron en 10 mL de infusión dializada de cerebro- corazón (D-BHI) las bacterias de una asada (Fig. 9C) de cada una de las 12 cepas de *S. aureus* (Tabla 1), almacenadas en agar con soya y tripticaseína inclinado. Las siembras se incubaron durante 18h a 37°C. Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 mL de cada cultivo (Fig. 9D), se centrifugaron en tubos Eppendorf a 3000 rpm (centrífuga clínica, International Clinical Centrifuge, modelo CL 1451 OM-3) durante 10 min. Los sobrenadantes se descartaron y las pastillas de bacterias se lavaron en 3 volúmenes de 2.5 mL de una solución salina estéril; finalmente se resuspendieron en 2.5 mL de la misma solución salina estéril. La concentración final de las suspensiones de bacterias se ajustó a una absorbancia (turbidez) de 1.0 a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Fig. 9G).

1.2.2 Preparación de los medios de cultivo con sustratos proteínicos. Se prepararon cajas de Petri con agar al 1.5% en D-BHI y diferentes sustratos proteínicos: gelatina bacteriológica al 1%, leche descremada (skim milk, Difco) al 1%, colágena tipo I al 0.1% (Sigma, de cola de canguro, soluble en ácido), colágena tipo II al 0.1% (Sigma, de septo nasal bovino, soluble en ácido).

Agar al 1.5% en D-BHI, gelatina bacteriológica al 1% y leche descremada (skimed milk, Difco) fueron esterilizados a 121°C durante 15 min; las colágenas tipo I y II fueron disueltas en 0.2 mL de ácido acético 0.1M (ref. Niyibizi *et al.*, JBC 59 (1984) 1417-1474) y esterilizadas por filtración a través de membranas Millipore de nitrocelulosa con poros de 0.2 micras estériles. Después de dejar enfriar al D-BHI y las soluciones de gelatina y leche descremada en un baño de agua fría, hasta que sus recipientes fueran tolerables al tacto, se prepararon medios de agar con cada uno de los sustratos proteínicos estériles (también enfriados), agitando suavemente y evitando que se formaran burbujas. Enseguida se vertieron 10 mL de cada uno de los medios en cajas de Petri estériles, que se mantuvieron en una

superficie plana hasta que el agar solidificó. Las cajas se guardaron en refrigeración hasta su uso.

1.2.3 Pruebas de actividad proteolítica. Se inocularon 4 μ L de cada uno de los cultivos de las 12 cepas de *S. aureus* ajustados a una turbidez de 1 a 600 nm en una solución salina sobre los medios de agar con sustrato, espaciados y en un orden predeterminado (Fig. 1). Además, a cada caja se le aplicaron 10 μ L de una solución de peptidasa de *Clostridium* tipo A al 0.2% (Boehringer) en la solución de Tyrods (Sigma) (solución enzimática control positivo de actividad proteolítica).

Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 18-24 h. La actividad proteolítica de cada una de las cepas es directamente proporcional a los halos de proteólisis de cada colonia bacteriana.

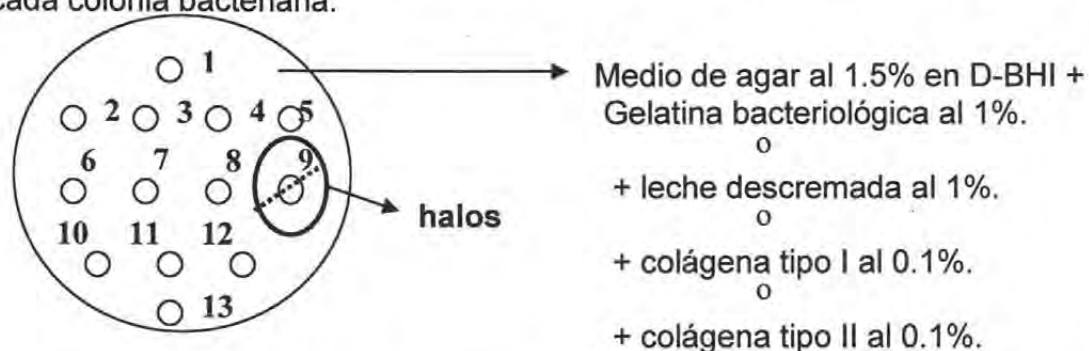


Figura 1. Distribución de los aislados clínicos en cajas de Petri con agar al 1.5% en D-BHI y alguno de los sustratos proteínicos empleados. Se muestra una actividad proteolítica simulada de la cepa 9. El diámetro del halo es una medida aproximada de la actividad proteolítica secretada por la cepa sobre el sustrato correspondiente.

1.3 Caracterización de la actividad de fosfatasa ácida en medios de cultivo de *Staphylococcus aureus* en fase de crecimiento estacionaria.

1.3.1 Obtención de los medios de cultivo. Las bacterias de una asada de cada una de las 12 cepas de trabajo de *S. aureus* (Tabla 1) mantenidas a 4°C en agar inclinado con soya y tripticaseína, fueron sembradas en 10 mL de la infusión D-BHI en tubos e incubadas a 37°C durante 18-24h. De cada uno de los 12 cultivos se resembró 1 mL en 10 mL de la infusión D-BHI en matraces Erlenmeyer de 250 mL e incubó, a 37°C en un baño con agitación constante (Lab-Line Shak-R-Bath, modelo 3582), durante 24h, hasta alcanzar su fase de crecimiento estacionaria.

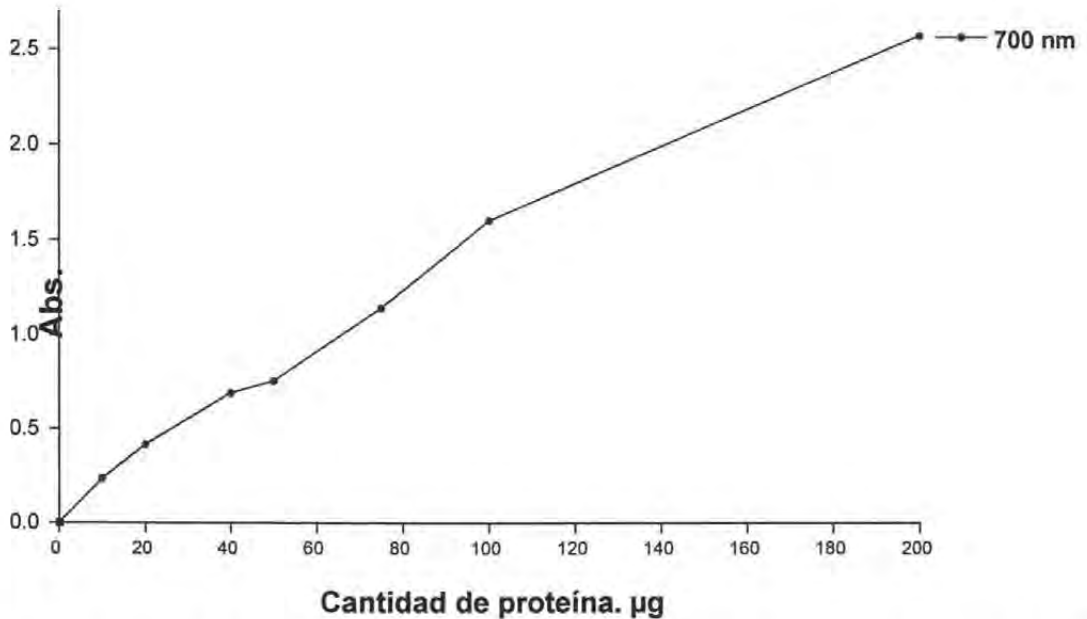
Los 12 medios de cultivo de la fase estacionaria fueron centrifugados en tubos cónicos de plástico (polipropileno) a 3000 rpm (centrifuga clínica) durante 15 min. Las pastillas bacterianas fueron descartadas. Los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración a través de membranas Millipore de nitrocelulosa de

0.22 micras colocados en soportes de plástico Millipore Swinnex-25 esterilizables, adaptados a una jeringa de 10 mL. Los sobrenadantes estériles fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

1.3.2 Concentración por precipitación con acetona de las proteínas de *Staphylococcus aureus* secretadas en el medio de cultivo de la fase de crecimiento estacionaria. Este procedimiento se realizó según el método de DuPlessis *et al.*, 2000. Las proteínas secretadas por cada una de las 12 cepas de *S. aureus* en los medios de cultivo obtenidos en la fase estacionaria de su crecimiento fueron concentradas por precipitación con acetona ultrapura (EM Science), previamente enfriada a -20°C. A 200 µL de cada uno de los 12 medios de cultivo se añadieron 800 µL de la acetona fría. Las muestras se mantuvieron a -75°C en un congelador ultrafrío durante 1h. Los precipitados fueron recuperados por centrifugación en tubos de Eppendorf de 1.5 mL a 12000xg, durante 30 min a 4°C (Hettich Mikro Rapad/K microcentrífuga refrigerada). Los sobrenadantes fueron decantados cuidadosamente y descartados. El exceso de acetona en las pastillas de proteína se evaporó a temperatura ambiente. Las pastillas de las proteínas secas se resuspendieron en 25 µL de acetato de sodio 0.1 M (0.5M), pH 5.0 ó 6.0, para la determinación de la actividad de fosfatasa ácida. Los extractos proteínicos fueron alicuotados y conservados a -20°C hasta su uso.

1.3.3 Determinación de la concentración de proteína en medios de cultivo crudos de la fase estacionaria y sus correspondientes extractos proteínicos. Estas determinaciones se hicieron por el micrométodo de Lowry modificado.⁵⁷ Por duplicado, se colocaron alícuotas de 1-15 µL de una solución patrón de albúmina sérica bovina (para elaborar la curva de calibración) o de los extractos proteínicos diluidos o concentrados en celdillas desechables para espectrofotómetro, que se ajustaron a 200 µL con agua desionizada. Enseguida se agregaron 200 µL del reactivo de reacción: 3 partes del reactivo de Cu (mezcla de; 20 g de carbonato de sodio en 260 mL de agua, 0.4 g de sulfato de cobre (5x hidratado) en 20 mL de agua, 0.2 g de tartrato de potasio), 1 parte de SDS al 1% y 1 parte de hidróxido de sodio, 1 M; la mezcla se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Después se adicionaron 200 µL del reactivo de Folín, diluido 1:5 con agua destilada; nuevamente se agitó la mezcla e incubó 30 min a temperatura ambiente. Las absorbencias se midieron a 700 nm. En un espectrofotómetro Beckman DU 640. La concentración de proteínas se reportó en µg / mL

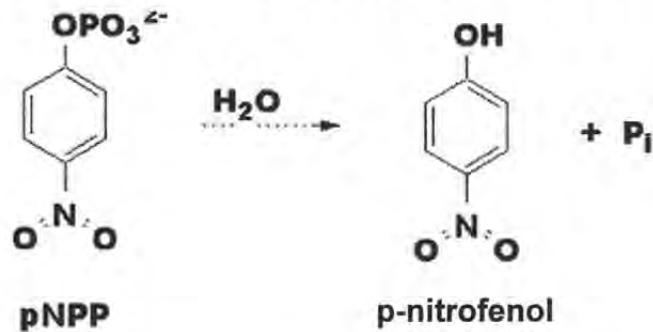
Figura 2. Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Lowry modificado.



1.3.4 Medición y caracterización de la actividad de fosfatasa ácida en los extractos proteínicos de los medios de cultivo de la fase estacionaria de crecimiento de las 12 cepas de *Staphylococcus aureus*. La actividad de fosfatasa ácida de los extractos proteínicos se caracterizó empleando el para-nitro-fenil-fosfato (pNPP) como sustrato, en presencia y ausencia de varios inhibidores y probando los efectos del pH sobre dicha actividad enzimática. El control positivo de estas pruebas fue el Precipath U (Roche), un suero humano de referencia.

A 5 µL de extracto proteínico se añadieron 20 µL de acetato de sodio 1 M (0.5M), pH 5.0 ó 6.0, 75 µL de una solución de pNPP 25 mM y se incubó el sistema a 37°C durante 30 min; la reacción se detuvo agregando 250 µL de NaOH 1M. La absorbancia del producto de la reacción (el para-nitro-fenolato) se midió a 405 nm y se calculó su concentración en base a su coeficiente de extinción molar ($18.5 \mu\text{M} / \text{cm}^2$). La actividad específica de la fosfatasa ácida se reportó en U /mg de proteína. Una U de fosfatasa ácida es igual a la cantidad de enzima que libera 1 µmol de para-nitro-fenolato por min en las condiciones del ensayo.

1. REACCIÓN CATALIZADA POR LA FOSFATASA ACIDA



2. REACCION COLOR

ADICIONAR NaOH

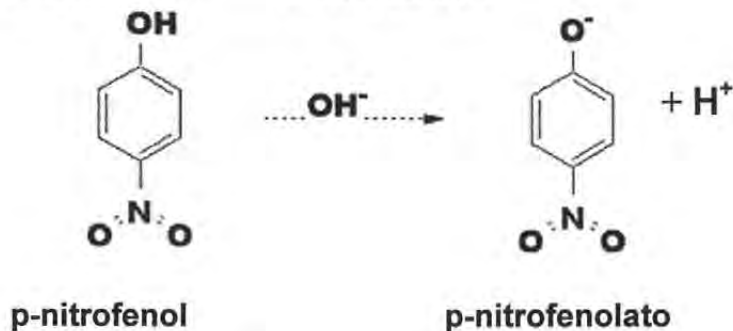


Figura 3. Reacción de la fosfatasa ácida. 1. La fosfatasa ácida hidroliza al pNPP. 2. La reacción se detiene con NaOH 1M y se forma el cromógeno (p-nitrofenolato).

Esta prueba se repitió en las mismas condiciones, a pH 5 y pH 6, en presencia de los siguientes inhibidores: tartrato de sodio, 50 mM (7.5 μL), heparina, 20 U/ensayo (un inhibidor específico de la fosfatasa ácida resistente a tartrato tipo 5a, TRAP 5a) y fluoruro de sodio, 50 mM (10 μL). (Un inhibidor específico de la TRAP 5b).

1.4 Caracterización de la cepa 76 IQM de *Staphylococcus aureus*.

Por su alta expresión de proteinasas y de la fosfatasa ácida resistente a tartrato, de las 12 cepas que estudiamos (Tabla 1) escogimos la cepa 76 IQM para inducir la osteomielitis en tibia en nuestro modelo experimental murino. Esta cepa un aislado clínico, caracterizada originalmente por Martínez –Canseco 1999, expresa las adhesinas codificadas por *cna* y *map*, es positiva para coagulasa (Bactident, Merck), que lo diferencia de *S. epidermidis*, es positivo para oxidasa (Bactident, Merck), que lo diferencia de *Streptococcus*, que es oxidasa negativo. En primera instancia su perfil bioquímico básico se obtuvo empleando el sistema Uniscept 20PG.

1.4.1 Caracterización fenotípica de la cepa 76 IQM: caracterización bioquímica y antibiograma. Antes y después de su inoculación en la tibia de ratas (nuestro modelo experimental), la cepa 76 IQM fue recharacterizada en un MicroScan® Dade Behring, un sistema comercial automatizado en el que se evalúan simultáneamente diversos parámetros bioquímicos y su susceptibilidad a antibióticos. Se determinaron sus características morfológicas en cultivos de agar (racimos amarillos) y se le hizo una tinción de Gram. La prueba de fermentación de carbohidratos se duplicó sembrando la cepa en medio de sal y manitol y se le hizo las pruebas de catalasa y coagulasa. Además una asada se cultivó en agar-sangre, para probar su capacidad hemolítica y se valoró su crecimiento en agar eosina / azul de metileno, un medio para crecimiento de fermentadores de lactosa (*S. aureus* es fermentador de manitol, pero no de lactosa).

Tabla 2. Parámetros bioquímicos y antibióticos evaluados en el MicroScan®. Parámetros bioquímicos.

Reacciones de identificación.

1. Cristal violeta (CV)	11. Pirrolidonil-β- naftilamida (PYR)
2. Micrococcus Screen (MS)	12. Arginina (ARG)
3. Nitratos (NIT)	13. Urea (URE)
4. Novobiocina (NOV)	14. Carbohidratos
5. Glicosidasas (PGR,PGT)	15. Cloruro de sodio (NaCL) 6.5% (NACL)
6. Indoxil fosfatasa (IDX)	16. Bacitracina (BAC)
7. Voges-Proskauer (VP)	17. Piruvato (PRV)
8. Optocina (OPT)	18. β-lactamasa (BL)
9. Fosfatasa (PHO)	19. Hemólisis (HEM)
10. Bilis esculina (BE)	

Antibióticos

- Amoxicilina/clavonato
- Ampicilina
- Cefalotina
- Cefazolina
- Cefotaxima
- Ciprofloxacina
- Claritromicina
- Clindamicina
- Eritromicina
- Gentamicina
- Imipenem
- Nitrofurantoína
- Norfloxacina
- Oxacilina

- Penicilina
- Rifampina
- Tetraciclina
- Trimet/sulfa
- Vancomicina

1.4.2 Preparación del inóculo. Las bacterias de una asada de la cepa 76 IQM almacenada en el agar inclinado con soya y tripticaseína se sembraron en 5-8 mL de BHI y se incubaron a 37°C durante 24h hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionaria (Fig. 4C y D). Al día siguiente (día de la inoculación de los animales), se centrifugó el cultivo durante 5 min a 3000 rpm (centrífuga clínica) recuperándose la pastilla bacteriana (Fig. E). Ésta se resuspendió con agitación en una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) estéril, a pH 7.2 (Fig. F). se ajustó la turbidez (medida de concentración) a una absorbencia de 2 a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Fig. G).

1.4.3 Inóculo en la tibia de rata. Se inyectaron 20 µL de una mezcla volumen / volumen de agar-agar al 0.9% y de la suspensión de la bacteria (*S. aureus*, cepa 76 IQM) ajustada a una absorbencia (turbidez) de 2 a 600 nm, equivalente a 36×10^6 UFC/10 µL del inóculo original. El uso de agar-agar al 0.9% reduce el riesgo de fuga del hueso y su difusión a los tejidos blandos.

1.4.4 Medición de la cuenta viable. La cuenta viable de bacterias o cantidad de bacterias vivas en una preparación de la cepa 76 IQM similar a la anterior se determinó en base a las unidades formadoras de colonias (UFC). Éstas se midieron usando suspensiones muy diluidas de esta preparación. Con agitación, se realizaron 8-9 diluciones decimales seriadas del inóculo colocando volúmenes de 100 µL de cada dilución en tubos con 0.9 mL de solución salina fisiológica (Fig. H). De las 3 últimas diluciones se tomaron 100 µL que se agregaron a 3 mL de agar-agar bacteriológico al 0.9% mantenido a 45°C en un termobolck. Duplicados de las 3 últimas diluciones se sembraron por vaciado en cajas de Petri sobre un medio de agar con soya y tripticaseína (Fig. I y J). Una vez fraguado el agar se colocaron las cajas en una estufa bacteriológica durante 24h a 37°C. Al día siguiente se contaron las colonias formadas reportándose las UFC/caja ó 100 µL de la dilución evaluada; de allí se calcularon las UFC/mL del inóculo original.

1.5 Medios de cultivo para la siembra y almacenamiento de preparaciones de *Staphylococcus aureus*. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados a 121°C durante 15 min antes de su empleo.

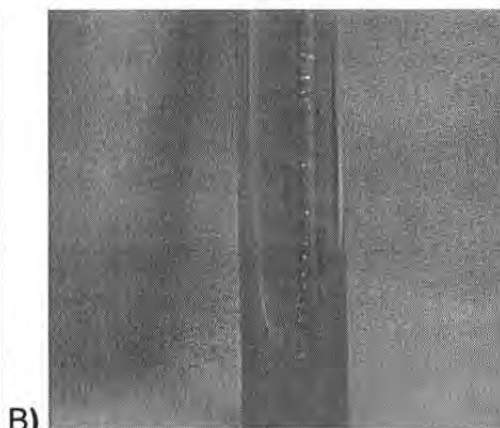
-Caldo de cerebro / corazón (BHI): Se disolvieron 3.7 g de la infusión de cerebro / corazón deshidratado (BHI) (Difco) en 100 mL de agua destilada, evitando la formación de burbujas.

-Dializado de BHI (DBHI). Se pesaron 9.25 g de medio de cultivo de cerebro/corazón deshidratado y se suspendieron en 25 mL; la suspensión se colocó en una bolsa de diálisis (Spectrapor 3500) y se dializó contra 200 mL de agua bidestilada por 72 h a 4°C (Sokol, 1979).

- Agar de sal y manitol: suspender 111 g del polvo en un litro de agua destilada, mezclar bien y calentar agitando frecuentemente. Hervir durante 1 minuto hasta disolución completa, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

-Agar con eosina/azul de metileno: suspender 36 g en 1 litro de agua recién destilada o completamente desmineralizada, reposar durante 15 minutos y calentar en baño maría hasta su disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C.

-Agar con soya y tripticaseína: Empleando calor y agitación, se disolvieron 16 g de agar casoy (Merck) en 400 mL de agua destilada.



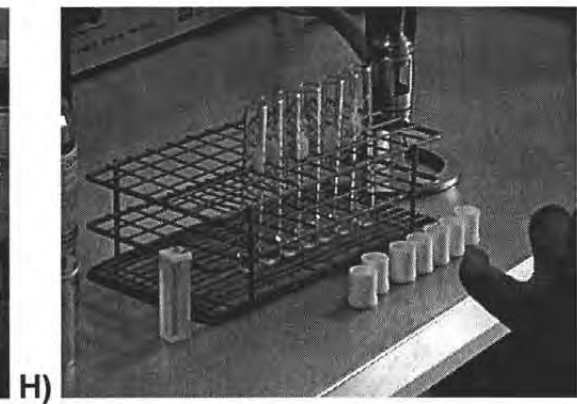
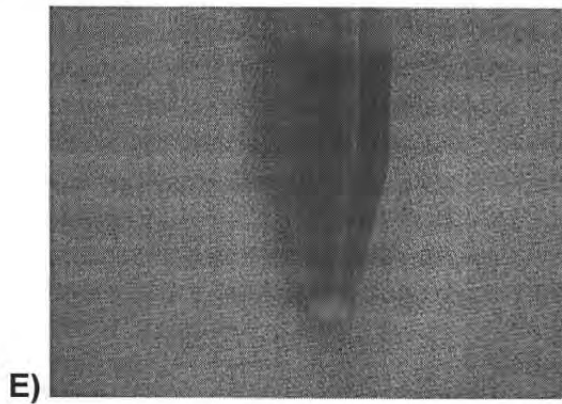
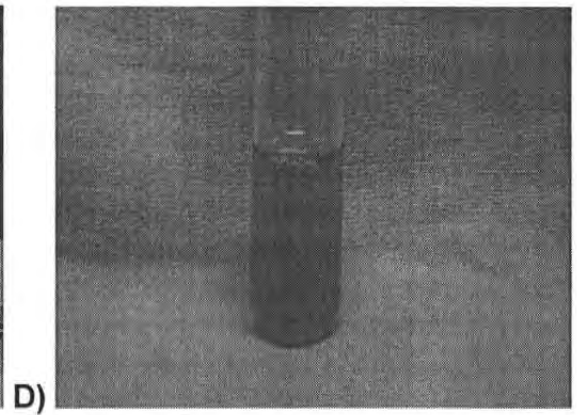




Figura 4. Diversas maniobras con cepas de *Staphylococcus aureus*. A) Se prepararon lotes nuevos de cepas de *S. aureus* que se mantuvieron en caldo BHI y glicerol al 20% almacenados en criotubos a -20°C (cepas de reserva y de trabajo). (B). De las cepas almacenadas a -20°C se prepararon siembras por estría en tubos de agar con soya y tripticaseína inclinado. (C y D) Asadas de las siembras por estría se cultivaron en 10 mL de BHI durante 18h a 37°C . (E) enseguida se tomó 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. (F) Se resuspendieron las pastillas bacterianas en una solución salina y (G) y se ajustó su concentración a una absorbencia (turbidez) de 1 ó 2 a 600 nm (según el caso) en un espectrofotómetro Beckman DU 640. (H) Para la cuenta viable de las preparaciones de bacterias se realizaron 8-9 diluciones decimales. De las 3 últimas se tomaron 100 μL que se mezclaron con 3 mL de agar-agar al 0.9%. (I y J) Éstas se sembraron por vaciado en cajas de Petri sobre un medio de agar con soya y tripticaseína. Después de 24h a 37°C se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) caja extrapolándose este valor a las UFC/inóculo original.

2.0 Desarrollo del modelo animal de infección.

2.1 Animales

Se emplearon 5 ratas Wistar, machos, adultos de 5 – 6 meses de edad, de 500 a 600 g de peso corporal, obtenidas por donación del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El trabajo fue aprobado por la Subdirección de Investigación del Centro Nacional de Rehabilitación Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Las ratas fueron manejadas conforme a la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Fueron mantenidas en jaulas de policarbonato individuales, debidamente etiquetadas, en un área aislada del bioterio del CNR, a 20-21°C, con ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Para su identificación se les hicieron muescas en las orejas. Las ratas fueron alimentadas con una dieta comercial especial de acuerdo a su especie y edad (Lab Diet.Rat Diet® 5012), con agua a libre acceso.

Una vez infectadas las ratas, sus desechos fueron eliminados en bolsas rojas de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 de Protección Ambiental-Salud, Ambiental-Residuos Peligrosos y Biológico Infecciosos, Clasificación y Especificaciones de Manejo. La limpieza y desinfección del cuarto de alojamiento, de las jaulas y los anaqueles se realizó cada tercer día empleando hipoclorito de sodio al 1%.



Figura 5. Alojamiento de las ratas en jaulas individuales de policarbonato.

2.2 Procedimiento de la inoculación bacteriana.

2.2.1 Anestesia general. Después de aplicar un antiséptico sobre la piel abdominal se inyectó el anestésico en la región caudal del abdomen, a un lado de la línea media, cuidando de inclinar a la rata cranealmente para desplazar las vísceras abdominales hacia la cabeza y de esta manera evitar el riesgo de lesionar órganos internos, además de perder el anestésico a través del intestino o la vejiga (Fig. 6). Se empleó una mezcla del anestésico disociativo, clorhidrato de ketamina (Anesket, Pisa) a una dosis de 87 mg/kg y la xylazina (Procin, Pisa), un sedante, analgésico y relajante muscular a una dosis de 13 mg/kg,⁵⁸ en una sola dosis por vía intraperitoneal. En caso necesario se redosificó empleando únicamente ketamina por la misma vía. Una vez anestesiadas las ratas, se les aplicaron unas gotas de lágrima artificial para protección de las córneas.

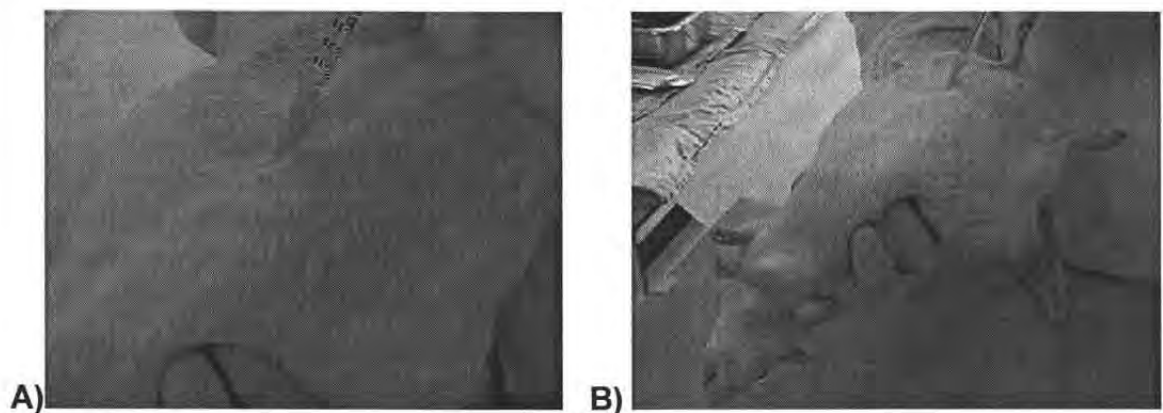


Figura 6. Aplicación del anestésico. A) El anestésico se aplicó en la región caudal del abdomen a un lado de la línea media. B) Se inclinó a la rata para evitar perder el anestésico en intestino o vejiga.

2.2.2 Procedimiento quirúrgico e inoculación del *Staphylococcus aureus*.

Se preparó la piel de la tibia izquierda, rasurando toda el área quirúrgica con una máquina rasuradora (Oster) y un peine del # 40. Se lavó con povidona yodada espumosa 3 veces; se colocó al animal en un soporte quirúrgico de acrílico, para mantener a la rata en posición decúbito dorsal y se mantuvo fija por medio de cinta adhesiva; se colocaron los campos quirúrgicos estériles alrededor del miembro pélvico izquierdo a intervenir, para prevenir una contaminación bacteriana accidental (Fig 7).

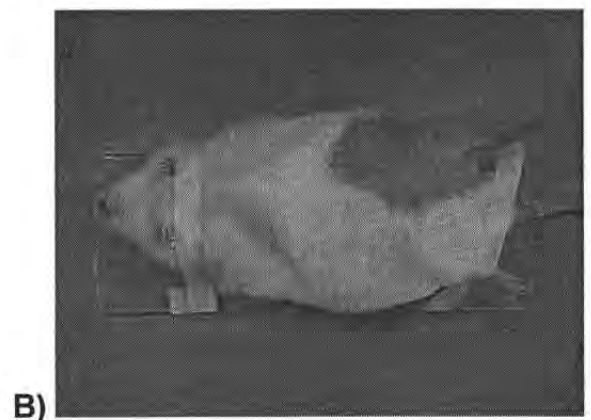
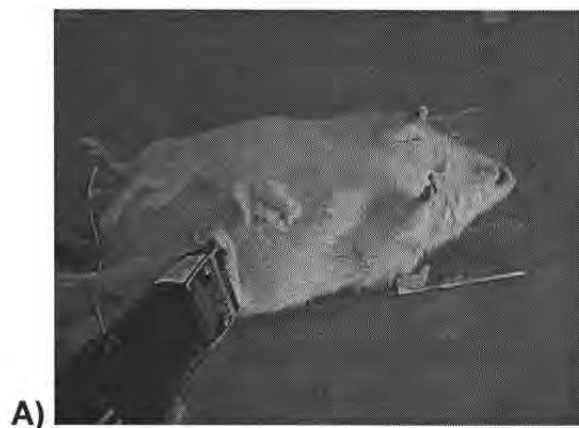
Se realizó una incisión en piel craneal, ligeramente medial a la región de la rodilla, de aproximadamente 1 cm de largo (Fig. 8A); se expuso la metáfisis anterior de la tibia, cuidando de no lesionar el ligamento patelar (Fig. 8B). Del lado derecho, ligeramente por detrás de él, se hizo una perforación guía con un alambre de Kirschner de 0.045 mm (Solco de México) empleando un taladro manual de Jacobs hasta alcanzar el canal medular, protegiendo a la articulación (Fig. 8C y

8D). Después de retirar el alambre, se controló el sangrado por medio de compresión digital durante aproximadamente 2 min. Enseguida se aplicaron lentamente en el canal medular 20 μ l del inóculo bacteriano suspendido en agar. (la preparación del inóculo se describe en detalle más adelante), con una jeringa Hamilton® (705N/aguja fija de 50 μ l), evitando la fuga del mismo para no contaminar el tejido blando (Fig 8E). Finalmente se colocó sobre la perforación ósea cera para hueso (Ethicon®) para sellar y evitar la fuga del inóculo bacteriano (Fig 8F y 8G). El tejido celular subcutáneo y la piel se suturaron con poliglactina 910 (Vycril, Ethicon), material absorbible 3/0, en un patrón interrumpido simple (Fig 8H y 8I). Se aplicó nuevamente yodo sobre el tejido blando (Fig 8J).

Inmediatamente después de la cirugía, la rata aún anestesiada, fue llevada a la Unidad de Rayos "X" del CNR para hacerle un estudio radiográfico posquirúrgico inmediato. Antes de regresarla a su jaula en el bioterio, se mantuvo al animal en un lugar caliente, alejado de ruidos extremos y luz, hasta su recuperación de la anestesia.

Durante el tiempo que permanecieron en estudio las ratas, fueron evaluadas clínica y radiológicamente, como se indica en las secciones correspondientes.

Los animales fueron sacrificados a los 30-35 días de la inoculación por medio de una dosis letal de pentobarbital sódico de 100 mg/500g de peso corporal, administrada intraperitonealmente. Las tibias (la izquierda infectada y la derecha sana control) fueron disecadas bajo condiciones de esterilidad; se removió el tejido blando que cubre al hueso con cuidado para no alterar el espécimen infectado que radiológicamente aparecía lítico. Se realizó la necropsia de los animales y se tomaron muestras de hígado, bazo, sangre y médula ósea de las tibias infectadas y control, así como de los abscesos (si los hubiera), para su análisis microbiológico.



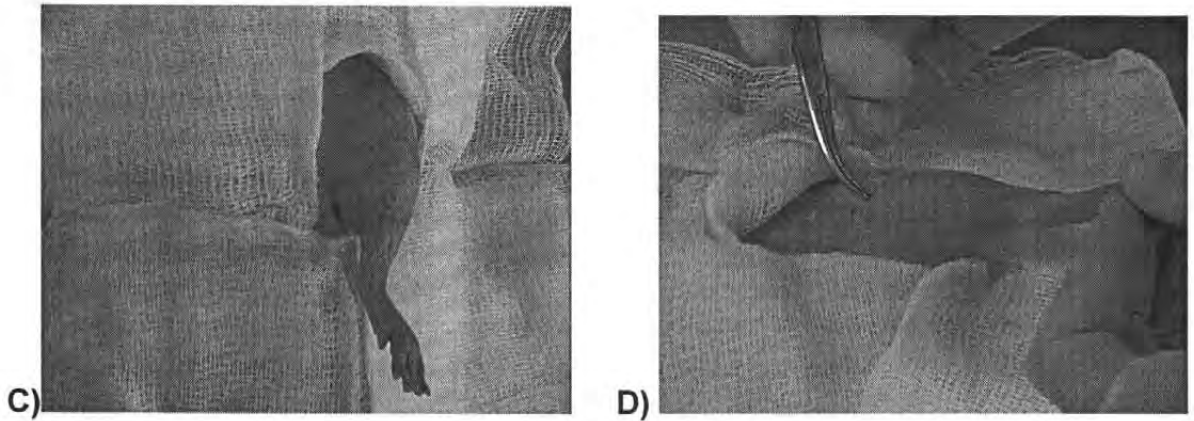
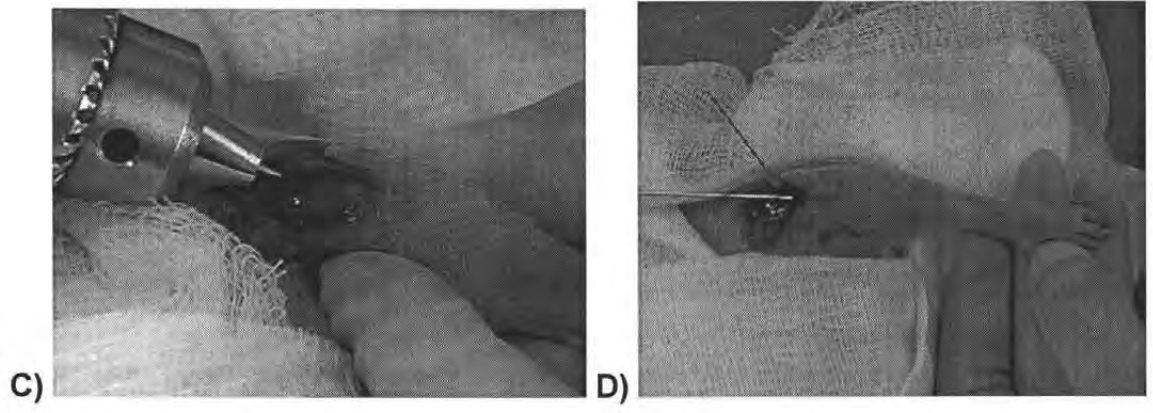
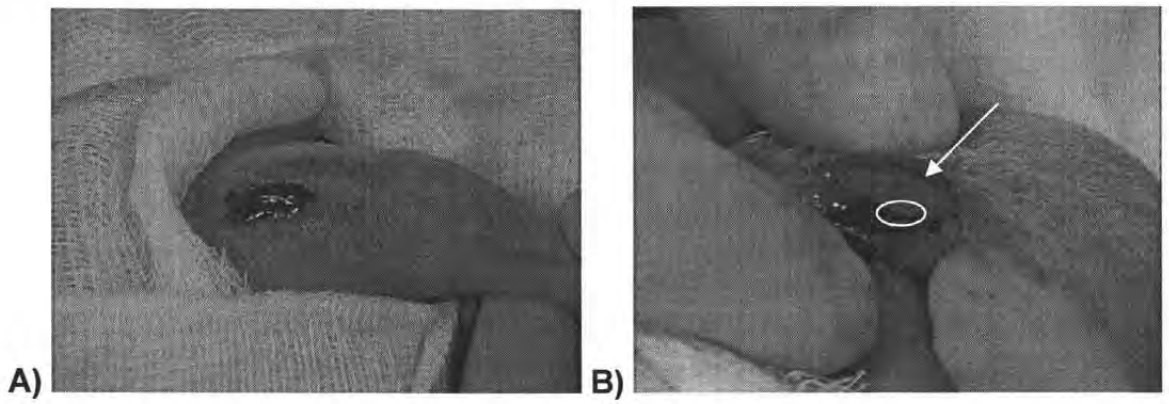


Figura 7. Preparación del miembro pélvico izquierdo a intervenir. A) El miembro a intervenir se rasuró con cuidado para no lesionar la piel. B) Enseguida se lavó el miembro con yodo y se fijó a la rata al soporte de acrílico por medio de cintas adhesivas, sin comprimir el tórax. C) Se colocaron campos quirúrgicos estériles alrededor del miembro a intervenir para prevenir una contaminación bacteriana accidental. D) Se señala el área quirúrgica a intervenir.



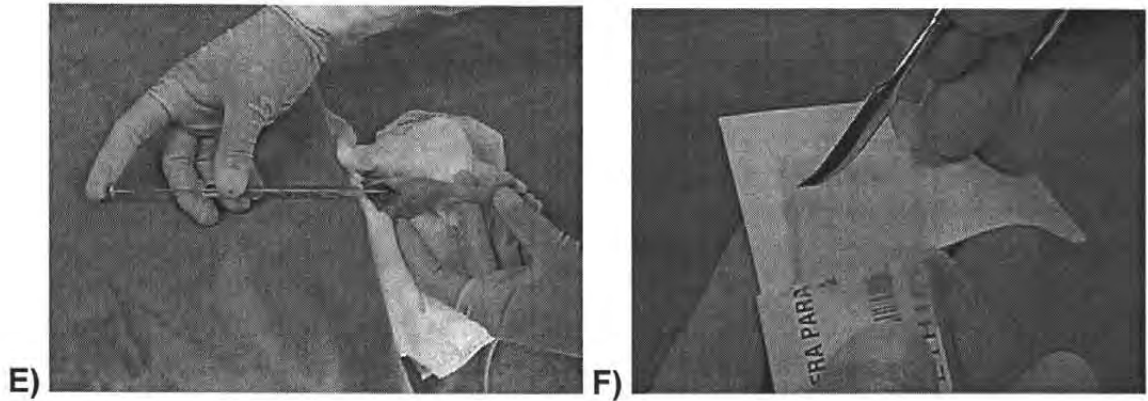
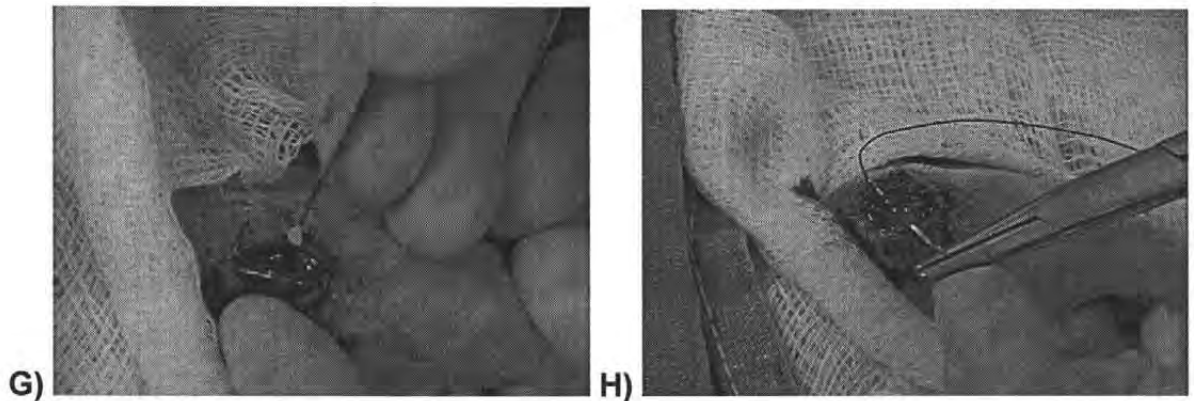


Fig. 8 Descripción del procedimiento quirúrgico para la inoculación del *Staphylococcus aureus* en la tibia izquierda. A) Incisión de la piel y tejido celular subcutáneo. B) Exposición de la metáfisis anterior. La flecha señala el ligamento patelar y el círculo, la región a perforar. C) Perforación guía con alambre de Kirschner, 0.045 mm, mediante un taladro manual de Jacobs, hasta alcanzar el canal medular. D) El implante (flecha azul) muestra la dirección de la perforación para el depósito del inóculo. E) Inoculación bacteriana lenta en el canal medular con una jeringa Hamilton 705N. F) Cera para hueso.



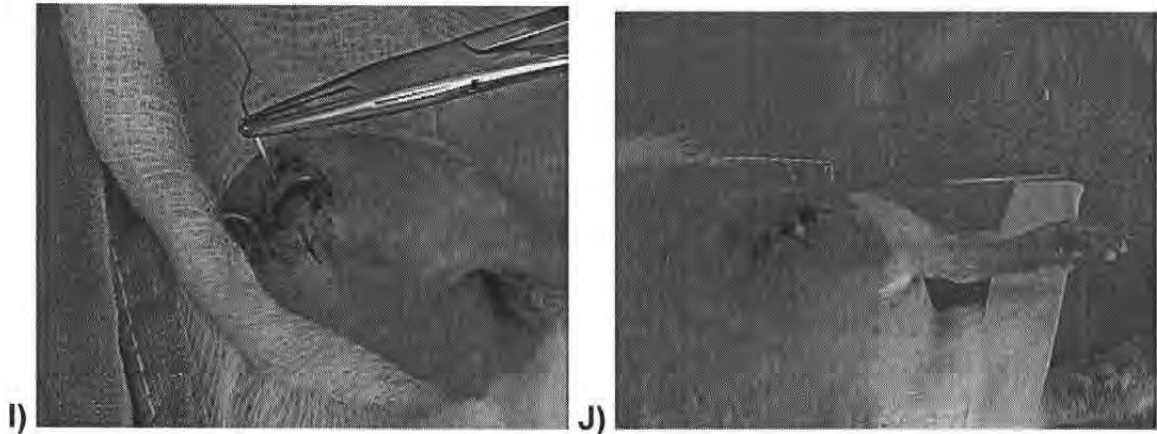


Figura 8. Continuación. G) Previo secado del área, se sella la perforación con la cera, para evitar la fuga del inóculo. H) Se suturan los planos profundos. I) Se sutura la piel. J) Suturada la piel se aplica antiséptico.

3.0 Aproximación clínica a la infección

Diariamente se realizó la exploración clínica de los animales inoculados. Ésta consistió en la observación macroscópica de la condición general, así como en la valoración de la marcha y la exploración del miembro inoculado. En las primeras 72 horas posteriores a la cirugía las ratas requirieron de un cuidado intensivo, que incluyó la determinación de la temperatura por vía rectal. Ésta sólo se registró durante los primeros 3 días posinoculación para evitar estresar a los animales. El peso corporal se registró cada 15 días, el mismo día de su estudio radiográfico de seguimiento.

4.0 Procedimientos radiológicos

Los estudios radiográficos inmediatos se realizaron en las instalaciones del Servicio de Rayos X del CNR y los de seguimiento se realizaron tanto en el CNR como en el Servicio de Imagenología del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Una vez inoculadas las ratas (de manera simulada empleando el BaSO_4 o con el inóculo bacteriano), se realizaron estudios radiográficos, tomando proyecciones cráneo-caudal (Cr-Cd) y medio laterales (M-L) de ambas tibias (control e inoculada), empleando un equipo de rayos "X" fijo, marca Fischer Imaging con capacidad de 1000 miliamperes (mA) y 100 kilovoltios (kV) (UNAM), chasises marca Kodak con pantalla intensificadora tipo Lanex regular, y películas radiográficas marca Kodak TMG/RA. En CNR. Equipo de rayos "X" fijo, marca Shimadzu RS-110, con capacidad de 500 (mA) y 150 (kV), chasises Kodak X-sight y películas radiográficas marca Kodak T-mat.

Para la colocación correcta del miembro a radiografiar hubo que anestesiarse a la rata. En la mesa del equipo radiográfico se colocó a la rata sobre un campo quirúrgico estéril y se fijó con masking tape. Una vez tomadas las placas, se desinfectó la mesa con hipoclorito de sodio al 1%. Los estudios radiográficos se realizaron inmediatamente después de la inoculación y a los 15 días y 30 días después.

4.1 Análisis de estudios radiográficos

Para realizar la evaluación completa de la tibia afectada ésta se dividió en tres regiones, según el método de Lucke, *et al*, 2003: R1, epífisis y metáfisis proximales, R2, diáfisis y R3, epífisis y metáfisis distales. (Fig. 9). El análisis de las placas se llevó a cabo evaluando los siguientes parámetros: reacción perióstica, destrucción de la arquitectura ósea (osteólisis), formación de nuevo hueso reactivo (osteo esclerosis), deformidad ósea, formación de secuestros, abscesos intramedulares, además de la inflamación del tejido blando.⁵³



Fig 9. Subdivisión de la tibia afectada para su evaluación radiológica. En proyección medio lateral se dividió la tibia afectada en 3 regiones según el método de Lucke, *et al.*, 2003.⁵⁹ R1, epífisis y metáfisis proximales, R2, diáfisis y R3, epífisis y metáfisis distales. Los parámetros a evaluar fueron: reacción perióstica, osteólisis, osteoesclerosis, deformidad ósea, formación de secuestros, abscesos intramedulares, inflamación del tejido blando.⁵³

5.0 Procedimientos microbiológicos.

El día en que fueron sacrificadas las ratas, bajo condiciones de esterilidad, se obtuvieron muestras bacteriológicas de los siguientes órganos: hígado, bazo, sangre y médula ósea tanto de la tibia afectada como de la tibia control. Se realizaron siembras bacteriológicas en cajas Petri con medios de crecimiento selectivos tales como agar sangre, agar de sal y manitol y agar eosina / azul de metileno (EMB), tomando una muestra interna del tejido y colocándola directamente sobre el medio para después realizar la distribución de la muestra por estriado con asa bacteriológica. La caracterización de la bacteria se realizó en dos etapas; en la primera, observando si hay crecimiento o no, si lo hay en la segunda se observan las características morfológicas de las colonias y se realizan las pruebas de catalasa y coagulasa.

Una vez recuperada la bacteria, se realizó la segunda caracterización de la cepa, mediante un frotis de Gram seguidos de una evaluación bioquímica por el método comercial automatizado MicroScan®.

6.0 Procedimientos histológicos.

Para el estudio histopatológico de los especímenes óseos, las muestras se fijaron en una solución de formalina amortiguada al 10%. Posteriormente se descalcificaron en frío empleando ácido nítrico al 15%. Una vez descalcificadas fueron cortadas las tibias longitudinalmente y a la mitad; se lavaron los cortes con agua destilada y se colocaron en un bastidor que se fueron introduciendo al procesador de tejidos Stockinette, aquí los cortes fueron deshidratados en alcoholes de diferentes concentraciones y posteriormente aclarados empleando bencenos. Finalmente los cortes fueron infiltrados con parafina y después incluidos en parafina. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina / eosina y la técnica de Gram.

Empleando un microtomo se obtuvieron cortes longitudinales de 4 μ de grosor. Las tibias fueron procesadas para análisis histológico en la UNAM. Fac. Med. Vet. Y Zoot. Depto. de Patología.

Resultados.

1.0 Caracterización bioquímica y antibiograma de la cepa de *Staphylococcus aureus* 76 IQM antes y después de la inoculación.

Para la caracterización de las cepas, se realizó una resiembra de las cepas de referencia y de los aislados clínicos, en diferentes medios como se menciona en el tema de manejo de los inóculos. De los aislados clínicos originales (13) se perdió la cepa 71 AP.

Con el propósito de confirmar la identidad de la cepa bacteriana infectante en las ratas infectadas antes de la inoculación y al término del experimento, la cepa de *S. aureus* 76 IQM fue caracterizada empleando el sistema MicroScan® y duplicando la prueba del manitol en un sistema de cultivo aparte con sal y manitol (Figura 10). Así determinamos que la cepa recuperada al término del experimento en las tibias infectadas fue la misma que se inoculó. Cepa 76 IQM, biotipo No. 317177, manitol positiva, coagulasa positiva, nitratos positiva, indoxil fosfatasa positiva, arginina positiva, glicosidasa positiva, urea positiva Voges Proskauer positiva, optocina positiva.

Los cultivos obtenidos a partir de los abscesos encontrados en otros órganos tales como pulmón, hígado y cavidad abdominal, fueron positivos a la bacteria inoculada.

En un animal que presentó edematización severa y persistente del miembro infectado se encontró además una asociación bacteriana con *Proteus sp.* Los cultivos obtenidos a partir de la médula ósea de otros huesos fueron negativos.

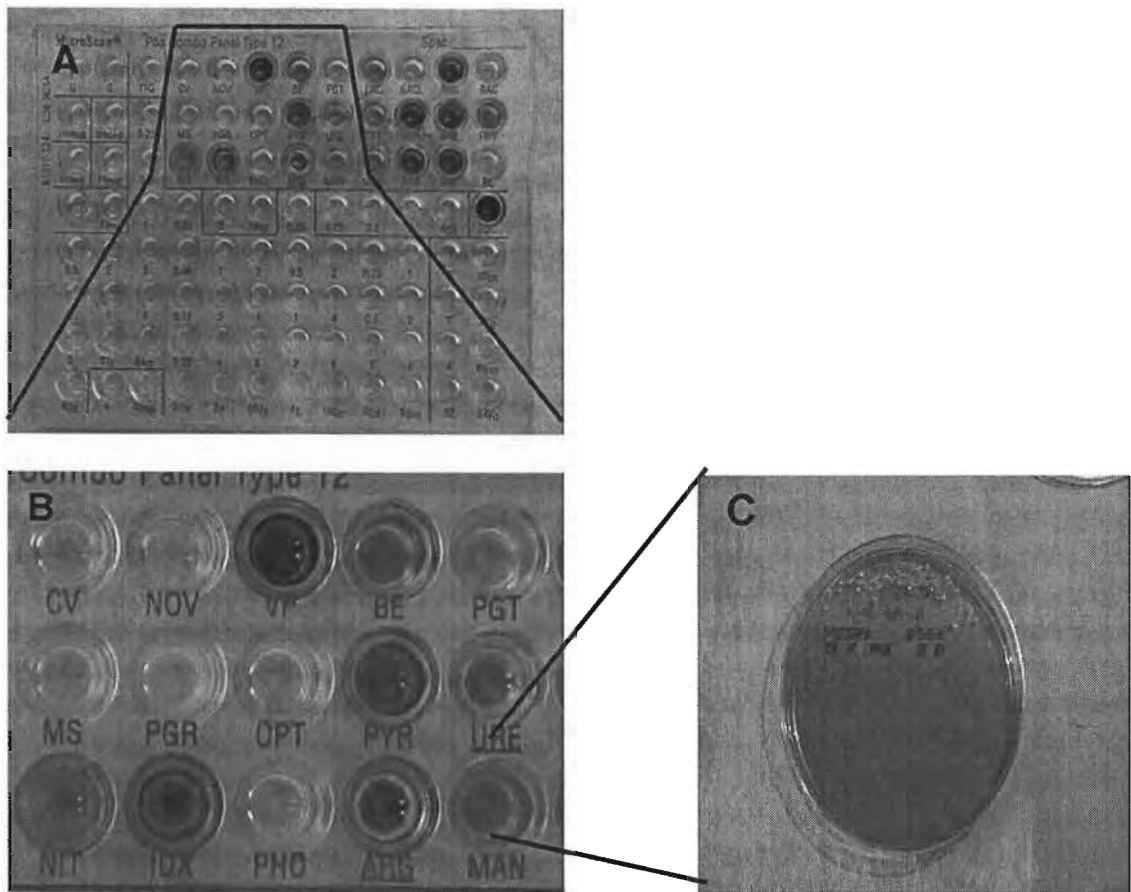


Figura 10. Caracterización bioquímica y antibiograma en el sistema automatizado MicroScan® de la cepa de *Staphylococcus aureus* 76IQM antes y después de su inoculación. A) Panel completo del sistema MicroScan®. Las 3 hileras superiores corresponden a las pruebas bioquímicas y en las 5 hileras inferiores se observa el crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de diversos antibióticos B) ampliación de las pruebas bioquímicas que incluyen: manitol+; coagulasa +; nitratos+; indoxil fosfatasa +; Voges Proskauer +; optocina +; fosfatasa +; arginina +; glucosidasa + y urea +. C) La prueba del manitol también se muestra en una caja de cultivo de sal y manitol.

2.0 Actividades proteolíticas de cepas de *S. aureus* de aislados de pacientes con OC en placas de agar al 1.5% en D-BHI.

Cuando se colocaron los inóculos, se depositaron los 4 μ L del inóculo ajustado, en los pequeños pozos realizados sobre el medio con capilares estériles, sin embargo se mostró especial cuidado al colocar el inóculo de ésta manera, ya que existe el riesgo de salpicar con la pipeta y contaminar las áreas de las otras cepas, como se muestra en la figura 12 A.

Las 12 cepas de *S. aureus* mostraron actividad caseinolítica, 9 mostraron actividad gelatinolítica, 3 presentaron actividad colagenolítica (tipo I y tipo II), 3 cepas mostraron únicamente actividad caseinolítica y gelatinolítica y 3 presentaron actividad caseinolítica, gelatinolítica y colagenolítica. Estos resultados se resumen en la Tabla 3.

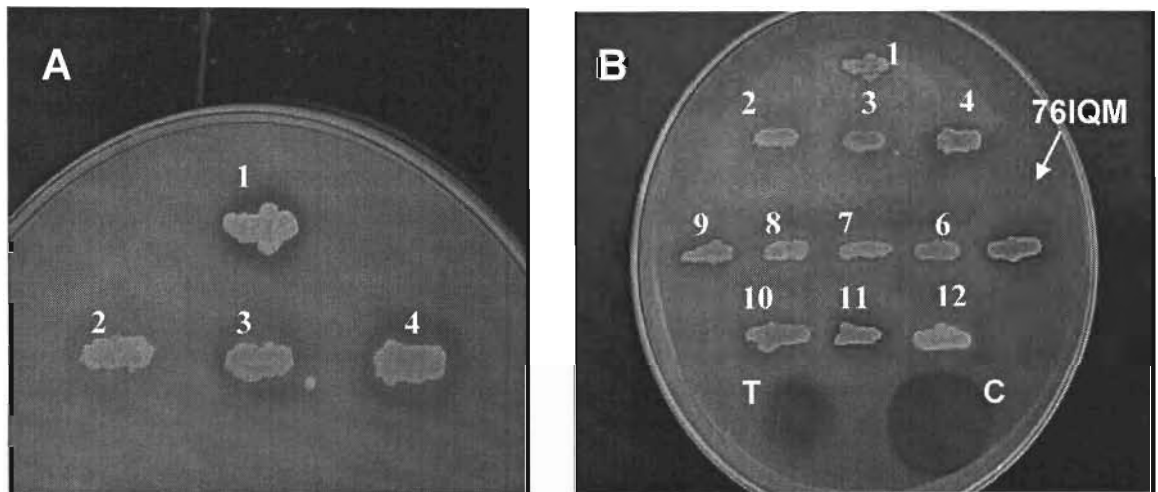


Figura 11. Aislados clínicos de *S. aureus* en caja de Petri de agar con leche como sustrato de las proteinasas. Los números identifican a las 12 cepas y en orden son: 1. 17CPJ, 2. 54SL, 3. 68FFC, 4. 69GGT, 5. 76IQM, 6. 88VTM, 7. 89RTC, 8. 92HM, 9. 93EMC, 10. 101 AOC, 11. 105IMO, 12. 107FMR. A) proteólisis positiva en 3 cepas en sustrato de leche. B) Caja con 12 aislados clínicos, control positivo con T, tripsina y C, colagenasa.

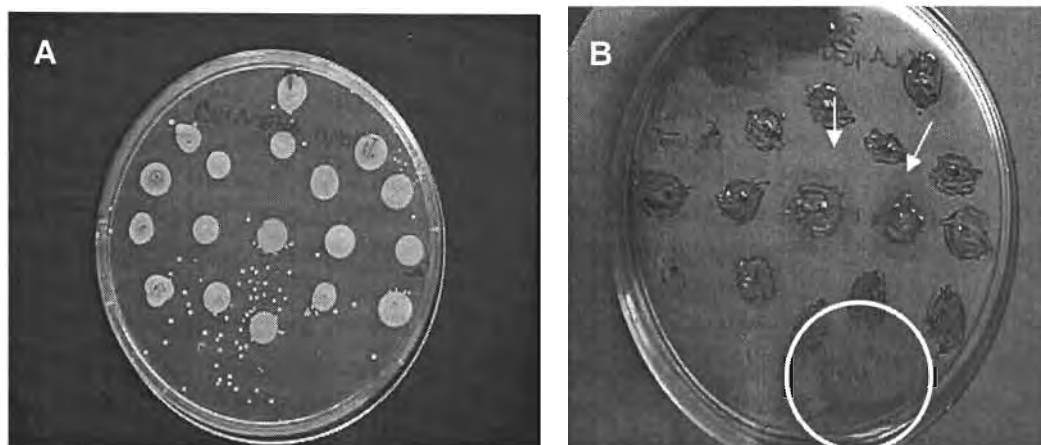


Figura 12. Cepas de referencia y aislados clínicos sobre medios de cultivo con colágena tipo II. A) Primeros cultivos de prueba, en donde se observa contaminación de las cepas. B) Crecimiento de aislados clínicos y cepas de referencia de *S. aureus* sobre medio de colágena tipo II cepas positivas (flecha), para hacer evidentes los halos proteolíticos sobre colágena, se retiraron las colonias bacterianas con el asa bacteriológica y se realizó una tinción con azul de coomasie. El círculo señala el control positivo con colagenasa.

Tabla 3. Actividad de las proteinasas de los cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Cepa	Leche (1%)	Gelatina (1%)	Colágena tipo I (0.1%)*	Colágena tipo II (0.1%)*
17 CPJ	+++ (2)	10 mm	-	-
54 SL	+++ (1)	-	-	-
68 FFC	+++ (1)	-	-	-
69 GGT	+++ (2)	10 mm	-	-
76 IQM	+++ (2)	13 mm	10 mm	10 mm
88 VTM	+++ (1)	10 mm	-	-
89 RTC	+++ (1)	10 mm	-	-
92 HM	+++ (1)	10 mm	-	-
93 EMC	+++ (2)	8 mm	-	-
101 AOC	+++ (1)	-	-	-
105 IMO	+++ (2)	19 mm	13 mm	15 mm
107 FMR	+++ (2)	12 mm	10 mm	7 mm

* diámetro del halo de proteólisis; +++ actividad proteolítica; (1) halo de proteólisis de precipitado opaco, (2) halo de proteólisis transparente seguido de halo tipo 1.

Los halos de proteólisis observados alrededor de las colonias, no mostraron características uniformes; en algunos aislados el halo se observaba muy claro y

rodeando perfectamente a la colonia, como se muestra en la figura----. En otros casos, se mostró el área proteolítica, después de un área opaca semejante al medio.

En las colonias que crecieron en el sustrato de leche se observó que alrededor de las mismas se observaron dos tipos de respuesta; halo tipo 1, que corresponde a un halo de proteólisis de precipitado opaco, un tipo 2 observado como un halo de proteólisis transparente seguido de un halo tipo 1 como se observa en la figura 11. Algunas cajas para poder observar con claridad las áreas de proteólisis, se retiraron las colonias bacterianas por medio de una asa bacteriológica, posteriormente se tiñeron en 5ml de azul de Coomasie durante 1 hora, teniendo cuidado de levantar el medio y que el colorante tiña por todos lados, posteriormente con cuidado empleando solución para desteñir geles (metanol 40%, ácido acético 10% y agua al 50%). Figura 12B.

3.0 Determinación de la actividad de la fosfatasa ácida con pNPP a pH de 6.1 y 5.0 efecto de la heparina, fluoruro y tartrato.

Los sobrenadantes de los cultivos de *S. aureus* presentaron tres niveles de actividad de fosfatasa ácida en presencia de pNPP, a pH de 5.0 y 6.1 como se observa en la Tabla 2.

- a) Los aislados que presentan < 1.0 U / mg (92, 93,105)
- b) Los aislados que presentan de 1.0 a 2.0 U / mg (17, 54, 68, 88, 89, 101,107)
- c) Aquellos que presentan > 3.0 U / mg (69, 76).

La actividad de la fosfatasa ácida fue resistente al tartrato de sodio un inhibidor específico de la isomorfa 5a. Como se muestra en la figura 13; 8 (67%) cepas mantuvieron su actividad enzimática de fosfatasa ácida y 4 (33%), la cepa 76 IQM mantuvo su actividad en un 76%; así como el control positivo. En la figura 14, se observa que en presencia de la heparina un inhibidor específico de la isomorfa 5a, 12 (100%) cepas mantienen su actividad enzimática; 7 de ellas (58.3%) conservan en presencia de heparina el 100% de su actividad enzimática, mientras que 5 se inhiben parcialmente. El sobrenadante de la cepa 76IQM muestra una inhibición en su actividad de 14% (figura 14). Mientras que su inhibición con el fluoruro de sodio inhibidor específico de la forma 5b fue parcial (figura 15), 4 (33%) de los sobrenadantes mostraron una inhibición en su actividad enzimática en presencia de fluoruro similar a la TRAP 5b, tipo osteoclástica. En la cepa 76IQM se observa una inhibición de 74% y 26% de resistencia.

En la tabla 4, se muestran los resultados de la actividad enzimática medida a diferentes pH, en ella se observa que casi todos los aislados clínicos se comportan igual; a excepción de las cepas 101, en donde se observa que la actividad de fosfatasa ácida total se incrementa notablemente de 2.6 U/mg de proteína a 18.18 U/mg de proteína al incrementar el pH de 5.0 a 6.1. y el caso de la cepa 89, que

se incrementó la actividad enzimática al incrementar el pH y adicionando tartrato de sodio, tal como la fosfatasa ácida 5b, resistente al tartrato.

CEPA	FOSFATASA ACIDA TOTAL U/mg de proteína		FOSFATASA ACIDA CON TARTRATO U/mg de proteína	
	pH 5.0	pH 6.1	pH 5.0	pH 6.1
17	0.82	0.78	0.89	0.92
54	1.15	1.33	1.42	1.38
68	1.02	1.03	1.11	1.18
69	10.60	9.58	9.40	11.25
76	4.01	6.65	4.95	4.90
88	11.58	13.56	14.27	13.17
89	16.86	10.85	14.55	18.45
92	4.07	0.91	0.47	4.02
93	2.49	3.89	1.86	3.30
101	2.65	18.18	9.87	10.72
105	0.57	0.91	0.64	0.70
107	4.25	3.07	3.36	2.92
FDA	0.45	0.65	0.65	0.83
DB	5.31	8.94	7.55	6.55
ATCC	1.71	1.30	2.37	1.84
PHILLIPS	0.26	0.27	0.23	0.42
NEWMAN	0.83	0.82	1.36	1.03
PRECIPAT	----		----	---

Tabla 4. Actividad de fosfatasa ácida total y resistente al tartrato de sodio en los aislados clínicos y cepas de referencia, a pH de 5.0 y 6.1.

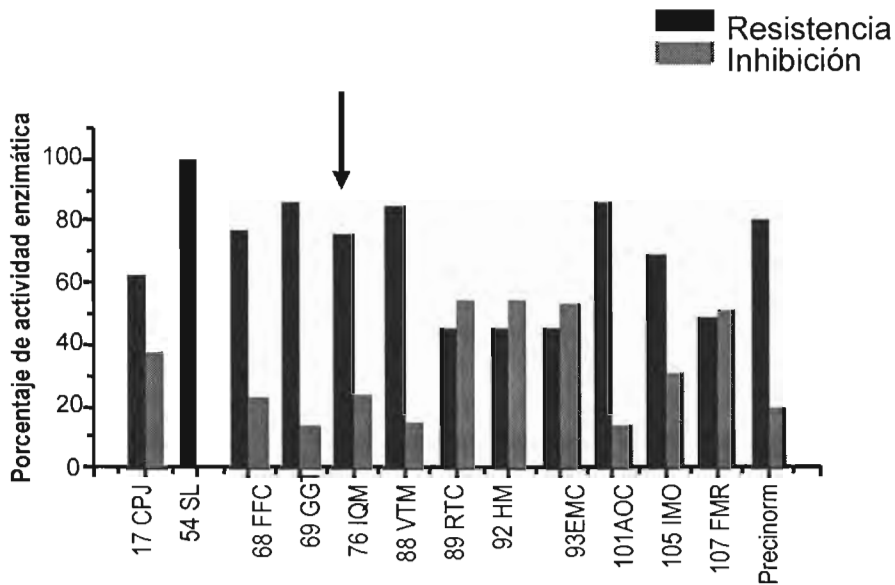


Figura 13. Actividad de fosfatasa ácida + tartrato (50mM). En la gráfica se observa que la actividad enzimática de fosfatasa ácida de la cepa 76 IQM, en presencia de tartrato se mantiene en un 76%, semejante a este comportamiento se encuentra la cepa 68 FFC y el control, esto es semejante a la fosfatasa ácida 5b de origen osteoclástico.

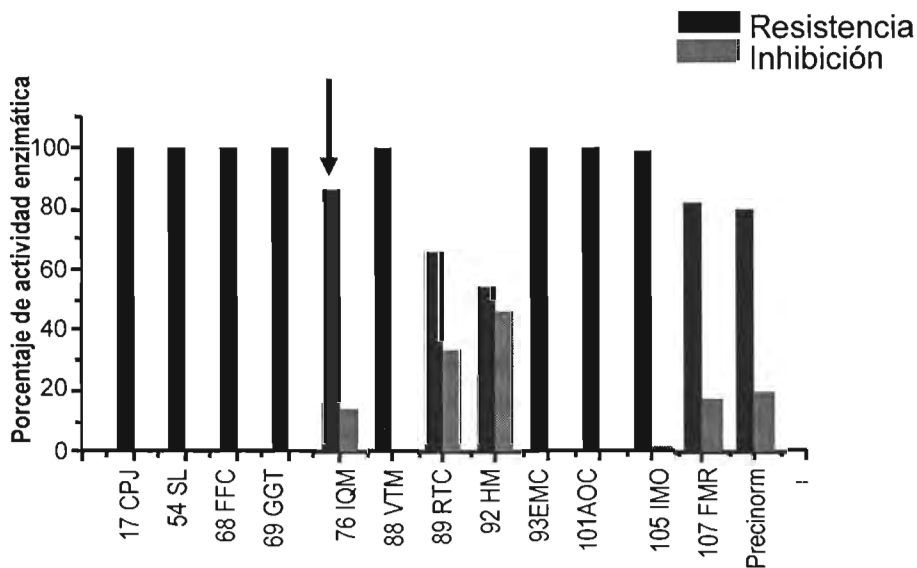


Figura 14. Actividad de fosfatasa ácida + tartrato + heparina (20U). En presencia de heparina, se observa que todos los sobrenadantes de los aislados clínicos mantienen su actividad enzimática, la cepa 76 IQM muestra una inhibición en su actividad de 14%.

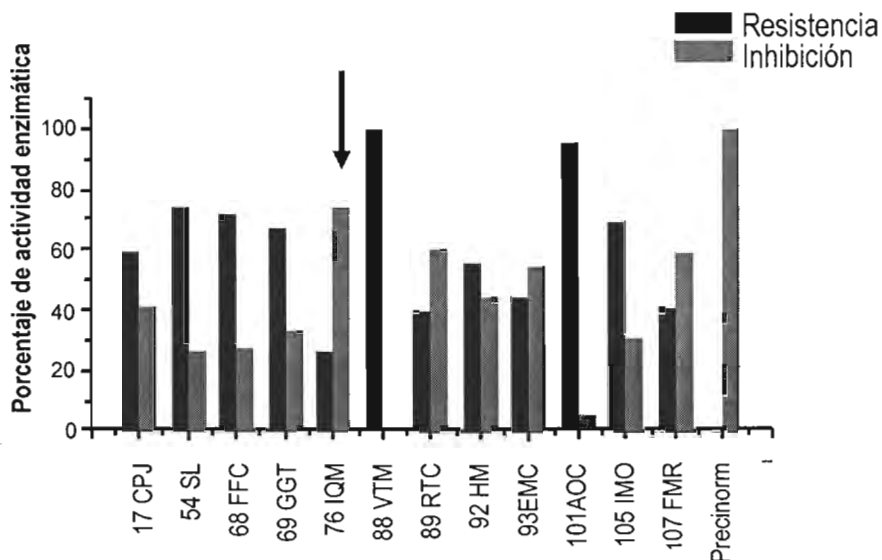


Figura 15. Actividad de fosfatasa ácida + tartrato + fluoruro de sodio (50mM). Los niveles de actividad de fosfatasa ácida en los sobrenadantes de los aislados clínicos mostraron una inhibición parcial en presencia de fluoruro, es decir no todos mostraron resistencia; en la cepa 76 IQM se observa una inhibición de 74% y 26% de resistencia, tal como la fosfatasa ácida 5b de origen osteoclástico.

Tabla 5. Efecto de los inhibidores sobre la actividad específica de la fosfatasa ácida (U/mg) medida con pNPP a un pH de 6.1 en los concentrados proteínicos de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos de *S. aureus*.

Cepa	Actividad total	Tartrato Resistencia 50mM)	Resistencia (%)	Inhibición (%)	Tartrato/Heparina (20U)	Resistencia (%)	Inhibición (%)	Tartrato/fluoruro (50nM)	Resistencia (%)	Inhibición (%)
17 CPJ	1.31	0.81	62	38	1.56	100	-----	0.77	59	41
54 SL	1.30	1.45	100	--	3.34	100	-----	0.96	74	26
68 FFC	1.30	1.00	77	23	2.15	100	-----	0.93	72	28
69 GGT	6.45	5.54	86	14	7.75	100	-----	4.31	67	33
76 IQM	6.11	4.62	76	24	5.23	86	14	1.57	26	74
88 VTM	1.86	1.58	85	15	2.68	100	-----	3.42	100	--
89 RTC	2.92	1.31	45	55	1.93	66	34	1.14	40	60
92 HM	0.99	0.44	45	55	0.53	54	46	0.55	56	44
93 EMC	0.72	0.33	46	54	0.81	100	-----	0.32	45	55
101 AOC	1.28	1.10	86	14	1.87	100	-----	1.21	95	5
105 IMO	0.76	0.52	69	31	0.75	99	1	0.52	69	31
107 FMR	2.99	1.44	49	51	2.43	82	18	1.22	41	59

4.0 Método de inoculación bacteriana.

4.1 Ensayos para la estandarización del método de inoculación bacteriana.

Pruebas con sulfato de bario (Ba So₄)

Se realizaron diferentes ensayos para estandarizar el método quirúrgico de inoculación, ya que es muy importante evitar la fuga del inóculo bacteriano. Estos estudios se realizaron teniendo como objetivo determinar el volumen a inocular, la localización y distribución del mismo. Para esto se empleo sulfato de bario (BaSo₄) al 60%, un medio de contraste positivo no iodado. La técnica quirúrgica empleada fue la antes descrita en el área de la metáfisis de la tibia. Figura 16

5.0 Inoculación del *Staphylococcus aureus* 76IQM.

Se realizó la inoculación dentro de la médula ósea de la tibia izquierda una mezcla de volumen/volumen de 20µL totales, 10 µL de agar –agar al 0.9% y 36 x 10⁶UFC/10 µL del inóculo original. Este procedimiento se realizó con sumo cuidado y lentamente para evitar la contaminación de los tejidos blandos, durante esto no se observó fuga del inóculo,

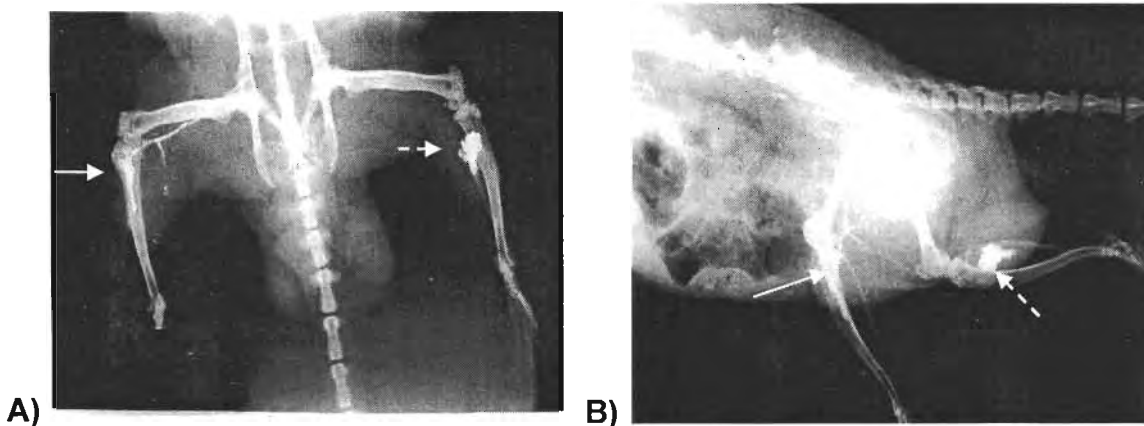


Figura 16. Estudios radiográficos que muestran la posición del sulfato de bario con respecto al canal medular de las tibias de rata. A) Estudio ventral-dorsal de pelvis de rata, para observar ambas tibias al mismo tiempo; en donde se observa que la flecha continua muestra la tibia derecha con el medio de contraste en posición correcta y la flecha punteada indica una inadecuada colocación del medio, B) estudio latero-lateral izquierda-derecha de pelvis de rata, en donde se aprecia en la flecha punteada la tibia izquierda con el medio de contraste en posición incorrecta, y con la flecha continua a la tibia derecha con el medio en posición correcta.

6.0 Hallazgos clínicos ante la infección.

Después de la cirugía las ratas fueron confinadas en jaulas individuales. Los animales dejaron de comer, tomar agua las primeras 24 horas. El peso corporal que mostraron al inicio del experimento, no lo recuperaron después de 4 semanas momento en que fueron sacrificadas. (Tabla 6)

Las primeras 72 horas después de la inoculación los animales se observan deprimidos. El miembro inoculado se aprecia severamente inflamado, edematoso, y se palpa caliente durante los primeros días. Todos los animales muestran una claudicación grado IV, es decir no apoyan ni en estática ni en dinámica, ésta claudicación persiste durante 2 semanas, también se aprecia dolor a la extensión de la articulación de la rodilla y a la palpación de la tibia izquierda. El registro de la temperatura no mostró cambios durante las primeras 72 horas. (Tabla 6)

Todas presentan dehiscencia de la herida quirúrgica con formación de abscesos en la zona de inoculación los que drenan un exudado caseoso de color amarillento; éstos abscesos también se desarrollan en la zona de aplicación del anestésico y nunca se resolvieron (Figura 17). Los abscesos comunicaban con el hueso.

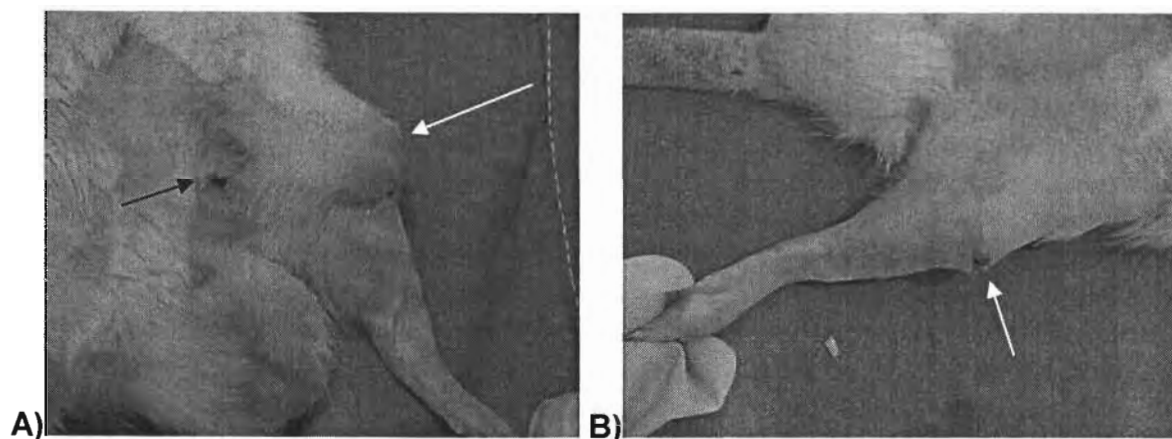


Figura 17. Características macroscópicas de los miembros inoculados. A) absceso en la zona de inoculación y en el área de aplicación del anestésico. B) Fístula en el área de inoculación.

Después de la primera semana de inoculación los animales se observan aparentemente activos, toman agua y comen normalmente, sin embargo fue posible observar la pérdida de peso corporal a las dos y 4 semanas de inoculadas (Tabla 6).

Un animal mostró marcada depresión, anorexia, deshidratación y pérdida de peso y muere a los 8 días de ser inoculada.

Tabla 6. Registro de peso corporal y temperatura de los animales inoculados.

rata	Peso inicial	Peso a las 2 semanas	Peso a las 4 semanas	Temperatura °C rectal 12 y 24 horas de inoculadas
1	561.0 g	530.0 g	550.0 g	38.0 ----- 37.0
2	621.5 g	400.0 g	-----	39.0 ----- 38.0
3	600.0 g	554.0 g	580.0 g	37.4 ----- 38.3
4	600.5 g	510.0 g	570.0 g	37.6 ----- 37.5
5	610.0 g	580.0 g	600.0 g	37.4 ----- 37.0

7.0 Análisis radiológico.

Las figuras A y B de los estudios radiográficos que aquí se muestran corresponden a las tibias izquierdas el día de la inoculación. En ellas se aprecia la integridad de su arquitectura ósea. Estas imágenes contrastan con los estudios radiográficos de las tibias infectadas. A los 15 días de la inoculación de 36×10^6 UFC de la cepa de *S. aureus* 76IQM todas las tibias mostraron signos de infección; fueron evidentes áreas de lisis ósea, sobre todo en el área de inoculación, otro signo claramente evidente fue la elevación con formación de hueso reactivo de origen periosteal a todo lo largo de las tibias infectadas, ésta respuesta del periostio se observó irregular o desordenada, áreas de enrarecimiento o alteraciones en el patrón radiográfico medular con zonas de osteolisis y osteoesclerosis, lo que sugiere una reacción del endostio con formación de hueso endosteal y formación de abscesos intramedulares, además de la distorsión de la arquitectura ósea normal.

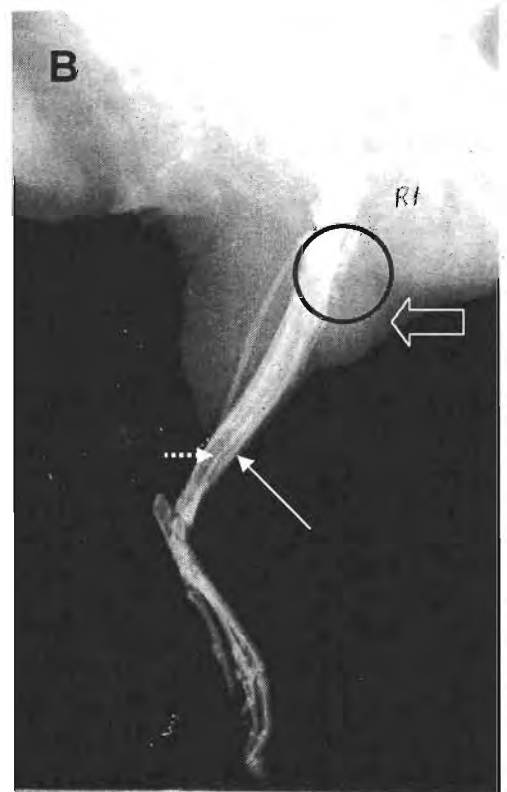
Las radiografías de las tibias infectadas obtenidas 30-35 días después de la inoculación bacteriana mostraron las marcadas alteraciones que se caracterizaron por progresiva destrucción ósea y formación de nuevo hueso (Figura 19,21,23), éste proceso de formación que también es evidente en los estudios previos. En los estudios a los 30-35 días se observa que el nuevo hueso se encuentra en fase de remodelación y se aprecia una mayor amplitud ósea, este engrosamiento periosteal fue pronunciado, incorporando la corteza original. El periostio se mantuvo bien organizado, involucrando en algunos animales la mayoría de la longitud de la tibia (18C y D, 20C y D, 22C y D). Se observa también la formación de secuestros (Figura 19A, 21A, 23E, 24C). En otros animales las lesiones fueron principalmente líticas (Figura 24C y D), y la densidad ósea se aprecia disminuida (Figura 20D, 23E y F). El aumento de tamaño de los tejidos blandos adyacentes a la región inoculada, correspondiente a la presencia de abscesos.

Figura 18. Estudio radiográfico de la tibia izquierda de la rata R#1/Sa 76IQM-1, 17 días posinoculación; Fecha de inoculación: 23 de Febrero del 2004. A y B) Proyecciones Cr-Cd y M-L de la tibia izquierda el día de la inoculación. C) Fecha del estudio: 9 de marzo 2004. Proyección Cr-Cd. La imagen sugiere un proceso inflamatorio activo que estimula al periostio a la formación de hueso nuevo (hueso reactivo). Se aprecia una reacción perióstica irregular y abundante a todo lo largo del hueso (flecha continua); al parecer hay adelgazamiento de las cortezas en la región R2 (flecha bloque); se observa una zona de mayor densidad en la región medular que sugiere la formación de hueso endosteal (osteoesclerosis) (círculo); en R3 hay una región radiolúcida que sugiere osteólisis y la presencia de un absceso intramedular (flecha interrumpida). D) Proyección M-L. Hay una reacción perióstica en toda la longitud del hueso (flecha); en R1 y R2 son evidentes zonas de lisis observándose como áreas radiolúcidas (círculo); no se observa cresta tibial (*), se aprecia un pequeño fragmento óseo (**), derivado posiblemente a remanente de la osteólisis de ésta zona.



Figura 18. Estudio radiográfico de la tibia izquierda de la rata R#1/Sa 76IQM-1, 17 días posinoculación; Fecha de inoculación: 23 de Febrero del 2004.

Figura 19. Estudio radiográfico de la tibia infectada de la rata R#1/Sa 76IQM-1, 35 días posinoculación 30 de marzo 2004. A) Proyección Cr-Cd. Comparada con la imagen a los 15 días posinoculación, ésta luce más nítida sugiriendo un proceso de remodelación ósea activa del nuevo hueso. Este resulta en un ensanchamiento de la diáfisis. El nuevo hueso reactivo periosteal, una capa gruesa de hueso (involucro) (flecha blanca) secuestra a la corteza diafisiaria original (flecha punteada), evidente en R3 (círculo). B) Estudio M-L. La neoformación ósea (flecha blanca) sobre la diáfisis original produce un ensanchamiento de la tibia. La osteoesclerosis es evidente en la zona de la cresta tibial (círculo). La imagen sugiere un absceso en la región de inoculación (flecha en bloque).



Rata # 3/Sa 76IQM-1.

Figura 20. Estudio radiográfico la tibia de la rata # 3/Sa 76IQM-1 a los 15 días posinfección. A y B) Proyecciones Cr-Cd y M-L de la tibia izquierda el día de la inoculación. C) Proyección Cr-Cd. Se señala reacción perióstica, con formación de hueso nuevo a lo largo de la tibia, se aprecian diferentes áreas radiolúcidas, compatibles con lisis ósea y pequeños abscesos intramedulares (flechas curvas); hay un absceso en el tejido blando adyacente a la región de la rodilla (flecha en bloque). D) Estudio M-L. Se aprecia reacción perióstica con formación de hueso nuevo a lo largo de la tibia; quedando la diáfisis original dentro del hueso de nueva formación (flecha); sobre la región de la cresta tibial se señala un área amplia de resorción ósea y un fragmento de hueso sobre el área inoculada (círculo).



Figura 20. Estudio radiográfico la tibia de la rata # 3/Sa 76IQM-1 a los 15 días posinfección.

Figura 21. Estudio radiográfico de la tibia infectada de la rata # 3/Sa 76 IQM-1 a los 35 días de la inoculación. A) Proyección Cr-Cd. En comparación con el estudio a los 15 días (ver Fig...), la imagen aparece más nítida por remodelación ósea de nuevo hueso (flecha curva); un segmento de la diáfisis original aparece como secuestro (círculo), rodeada de un área radiolúcida y de hueso nuevo. B) Imagen M-L. Se aprecia un área de resorción ósea sobre la cresta tibial (flecha), así como un absceso en el tejido blando de la región de la rodilla (flecha en bloque).



Rata # 4/Sa 76IQM-1.

Figura 22. Estudio radiográfico de la tibia infectada de la rata # 4/Sa 76IQM-1, 15 días posinoculación. A y B) Proyecciones Cr-Cd y M-L de la tibia izquierda el día de la inoculación 11 de marzo 2004. C) Proyeccion Cr-Cd. Se aprecia una reacción perióstica a todo lo largo del hueso infectado (flecha en bloque); hay áreas de lisis ósea (flecha blanca) y áreas de adelgazamiento de la cortical diafisiaria (R2) (elipse); D) Proyección M-L. Se observa lisis ósea sobre la región de la metáfisis anterior (flecha); hay áreas rediolúcidas en R2 (elipse). Se aprecia una zona de osteoesclerosis (flecha en bloque). * El diámetro de la tibia está aumentado.

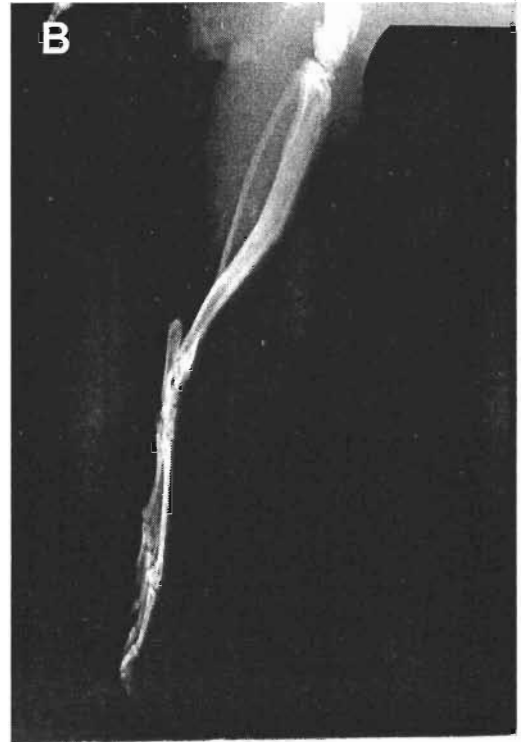
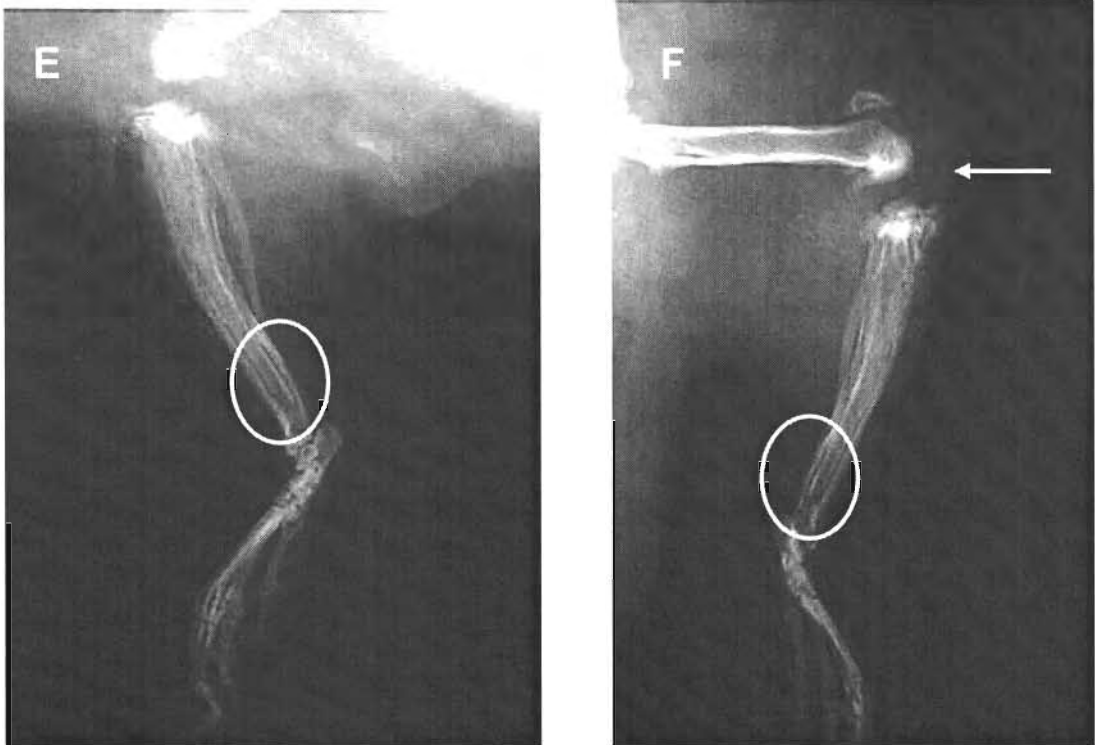


Figura 22. Estudio radiográfico de la tibia infectada de la rata # 4/Sa 76IQM-1, 15 días posinoculación.

Figura 23. Estudio radiográfico de la tibia infectada de la Rata # 4/Sa 76IQM-1, 35 días posinoculación 30 de marzo del 2004. E y F) Proyecciones ML. La tibia infectada presenta una densidad ósea disminuida. La formación de nuevo hueso periosteal cubre en la totalidad a la corteza original. En ambas proyecciones se aprecia un área de secuestro (elipse). Se observa un incremento en el espacio articular, con deformidad de los cóndilos femorales y el espacio intraarticular se observa de mayor densidad, lo que sugiere una efusión articular, por un posible absceso, todo indica una artritis séptica (flecha).



Rata # 5/ Sa 76IQM-1.

Figura 24. Estudio radiográfico de la tibia infectada de la rata # 5/Sa 76IQM-1 a los 15 días de inoculación. A y B) Proyecciones Cr-Cd y M-L de la tibia izquierda el día de la inoculación. C) Proyección M-L. Predominan áreas de lisis en R1 y R2 (flecha); se aprecia un secuestro (flecha en bloque). C) Proyección Cr-Cd. Áreas de lisis en R1 y R2 (flechas); se aprecia un secuestro (flecha en bloque). D) hay un absceso en el tejido blando adyacente a la región de la rodilla (*), marcada destrucción de las áreas R1 y R2, secuestro (flecha en bloque) y reacción periosteal a lo largo de la superficie cortical.



Figura 24. Estudio radiográfico de la tibia infectada de la rata # 5/Sa 76IQM-1 a los 15 días de al inoculación.

8.0 Análisis microbiológico

Los cultivos obtenidos a partir de la médula ósea de las tibias inoculadas permitieron recuperar la cepa de *S. aureus*. Fueron Gram positivas. Los cultivos obtenidos de los abscesos encontrados en otros órganos tales como pulmones, hígado y cavidad abdominal, fueron positivos a la bacteria inoculada. El crecimiento bacteriano en las cajas con medios de cultivo selectivos mostró la morfología característica de *S. aureus*, que corresponde a colonias lisas, brillantes de color amarillento, mostraron capacidad β hemolítica en un medio de agar sangre (Figura 25A y B) y fueron manitol positivo como se muestra en la figura 26E.

La bacteria recuperada mostró el mismo biotipo y el perfil de susceptibilidad a antibióticos semejante al del inóculo bacteriano usado para producir la infección.

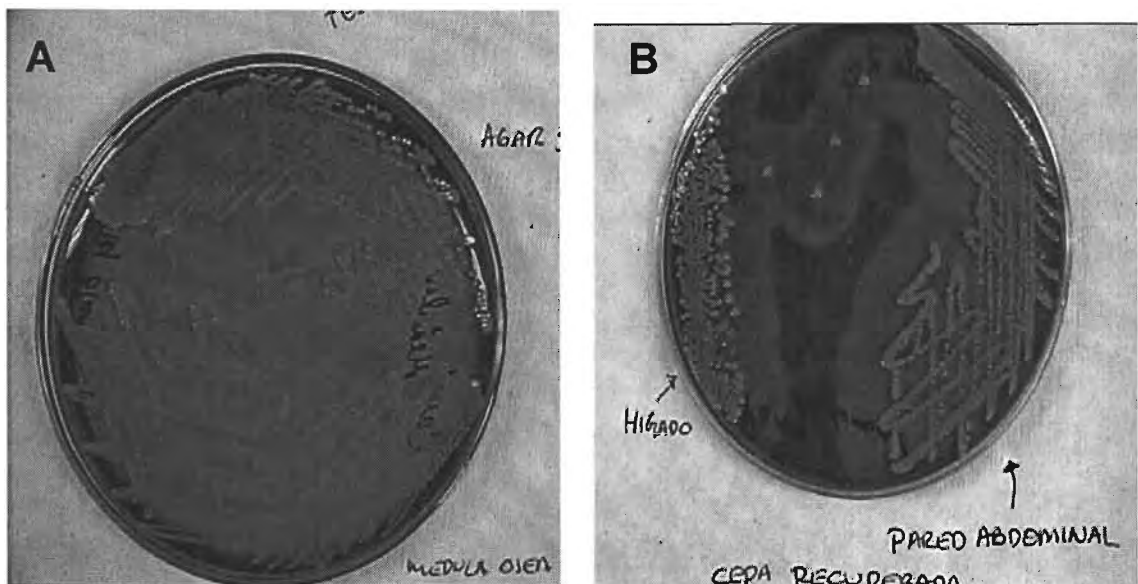


Figura 25. Crecimiento de la cepa de *S. aureus* sobre un medio de agar sangre. A) hemólisis tipo β , a partir de la médula ósea y tejidos blandos adyacentes a la rodilla izquierda de una rata que muere de sepsis a los 8 días. B) Crecimiento *S. aureus* en agar sangre de muestras de hígado y abdomen de la rata que muere de sepsis a los 8 días.

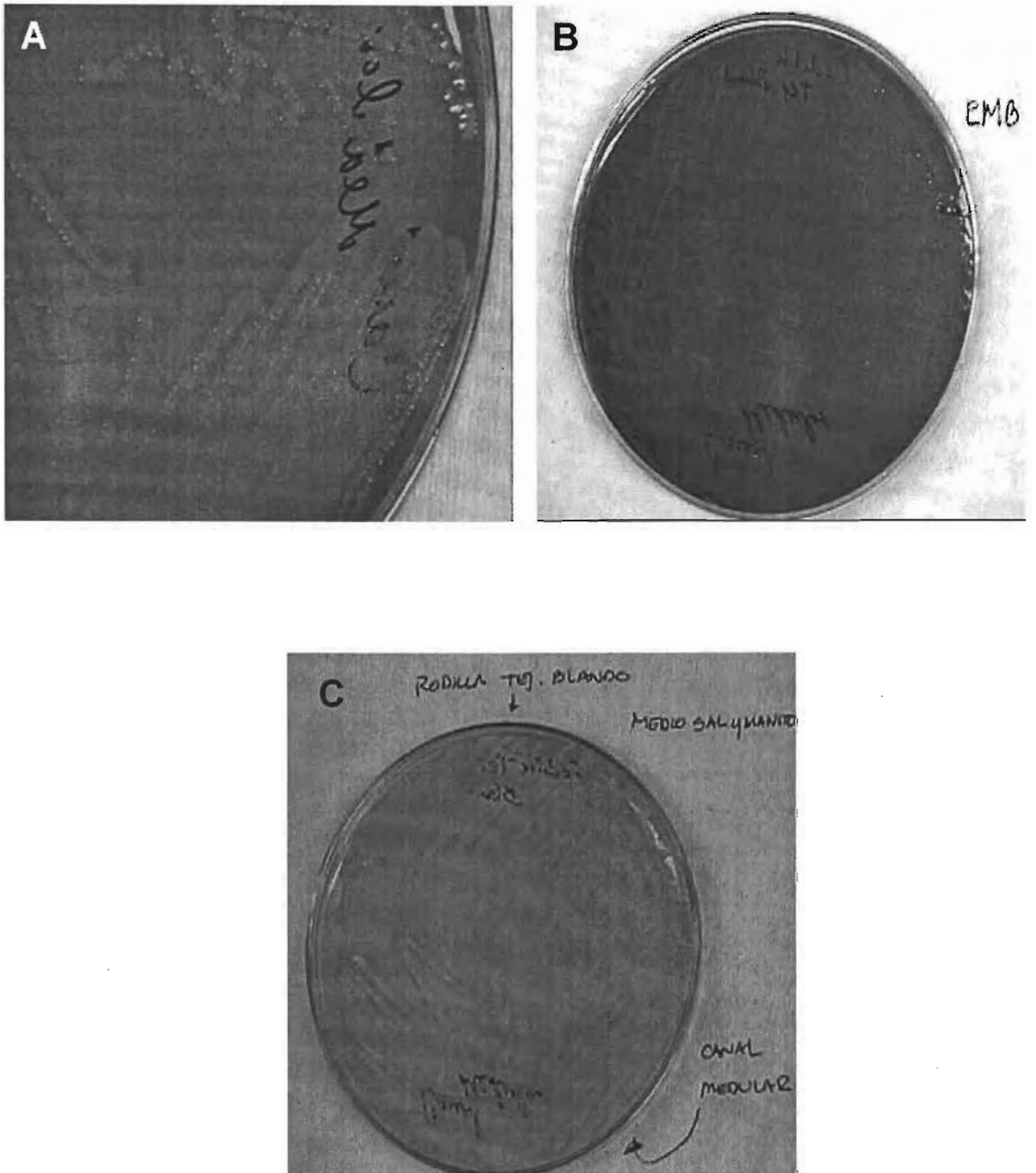


Figura 26. Morfología de las colonias de la cepa de *S. aureus* recuperada de diferentes tejidos de las ratas infectadas. A) Hemólisis tipo β sobre un medio de agar sangre. B) Crecimiento pobre sobre medio EMB. C) Colonias de *S. aureus* en un medio de sal y manitol, manitol positiva.

9.0 Patología macroscópica

A los 7 días de infectadas muere 1 rata, se realiza la necropsia, encontrándose lo siguiente; condición general caquexia, deshidratación, secreción sanguinolenta en ambos ojos, abscesos en cavidad abdominal, parénquima pulmonar y en la zona de inoculación y aplicación del anestésico. No se observaron cambios a nivel óseo. A los 15 días muere un segundo animal y la necropsia reveló abscesos en parénquima pulmonar. En ambos animales se encuentra evidencia de infección metastásica, sin embargo en el primero las lesiones son mayores concluyéndose que el animal murió de sepsis.

Los animales se sacrificaron a los 35 días pos infección mostrando evidencia clara de osteomielitis crónica. Las lesiones macroscópicas de los miembros infectados fueron: abscesos en la región inoculada, los que drenan exudado purulento de consistencia caseosa de color amarillento, eritema, en hueso severa destrucción de hueso, áreas hemorrágicas, engrosamiento óseo con respecto al control normal (Figura 27).

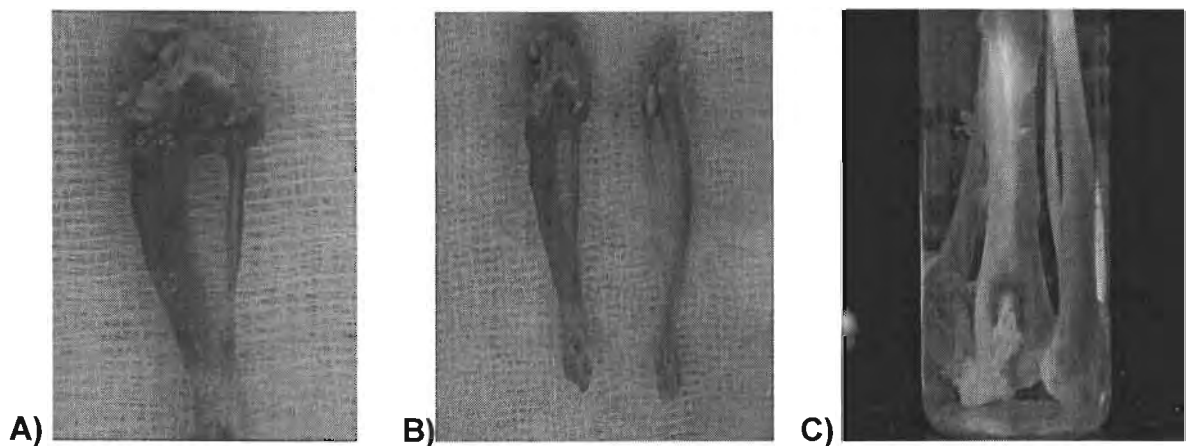


Figura 27. Características patológicas macroscópicas de las tibias infectadas. A) Hueso de rata con 15 días de infección se observa hemorrágico, con exudado que drena desde el canal medular, de superficie rugosa. B) hueso normal a la derecha, e infectado a la izquierda, se observa de mayor tamaño. C) Izquierda tibia infectada drenando exudado y una gran área de lisis en la zona de inoculación, del lado derecho la tibia control.

10.0 Hallazgos histopatológicos.

El análisis histopatológico de los huesos infectados reveló los siguientes datos: abscesos en la cavidad medular, que se continúan hacia la metafisis proximal, mismos que invaden el área de la fisis o placa de crecimiento (figuras 28B), sustitución de elementos celulares hematopoyéticos por tejido fibroso y exudado purulento (figuras 28B, 29E, 30B), una gran infiltración de células inflamatorias, desde polimorfonucleares (29A y C, 30 C). Una abundante reacción fibroplásica (fibrosis) adyacente a los abscesos (figuras 28B, 29 A, 30A y E, 31B) abundante tejido de granulación (figura 30 A y C), espículas de tejido óseo necróticas (29 C, 30B y C, 31D), esto se determina por la ausencia de osteocitos en sus lagunas (29C, 30B y C)). Se observan áreas de resorción (figura 30B y C), también es posible observar hueso de nueva formación (figura 28B, 30A y E, 31C). También es posible observar fragmentos irregulares de hueso necrótico rodeado de tejido fibroso o nuevo hueso, lo que corresponde a un involucro (30C) éstos fragmentos óseos se aprecian rodeados de células inflamatorias (29C y 30C).

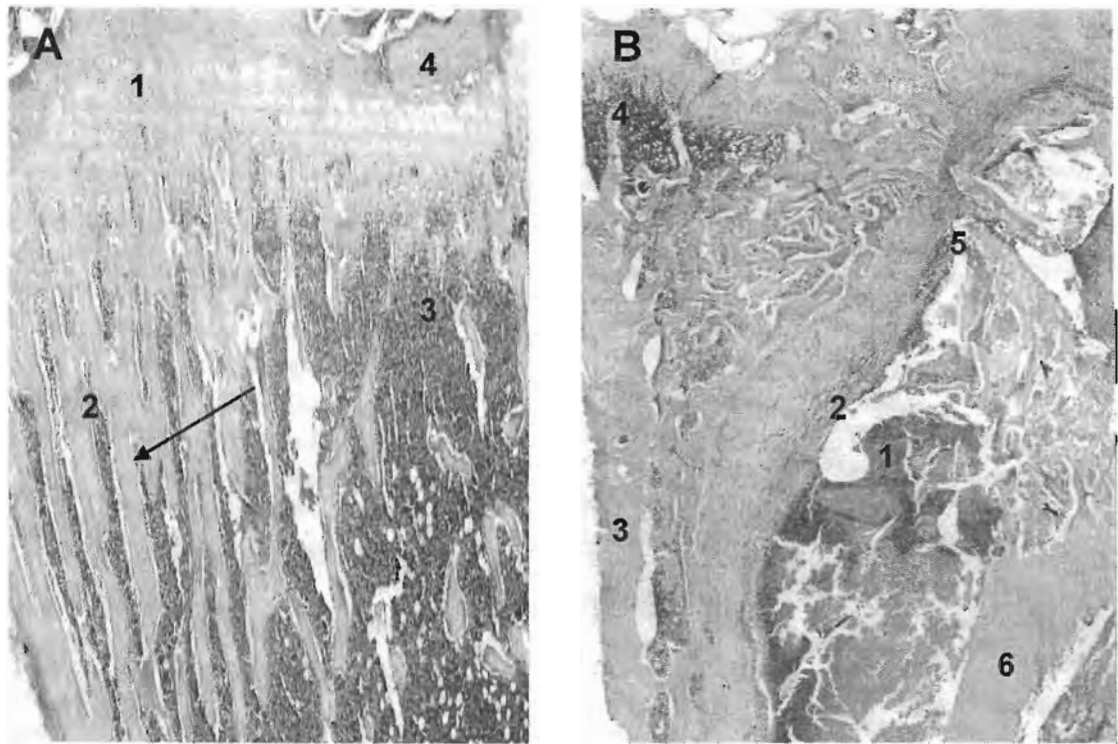


Figura 28. Microfotografías de cortes histológicos de tibia de rata normal e infectada. Las tibias fueron fijadas en formol al 10%, descalcificadas en ácido nítrico al 15%, y cortes longitudinales fueron embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 4 μ que se tiñeron con hematoxilina / eosina. A) Corte de tibia proximal de rata normal: 1) fisis; 2) metáfisis, con espículas de hueso de nueva formación (flecha); 3) elementos celulares de la médula ósea normal, 4) epífisis. B) Tibia de rata infectada experimentalmente con *S. aureus*, con 35 días de evolución. Corte de la región de la epífisis, fisis y metáfisis proximal; 1) cavidad conteniendo exudado, 2) fibrosis; 3) formación de nuevo hueso periosteal, 4) elementos celulares hematopoyéticos normales, adyacentes a la placa de crecimiento 5) el absceso invade a la región de la placa de crecimiento, 6) fragmento de hueso cortical necrótico. Tinción H/E. (Aumento 40x).

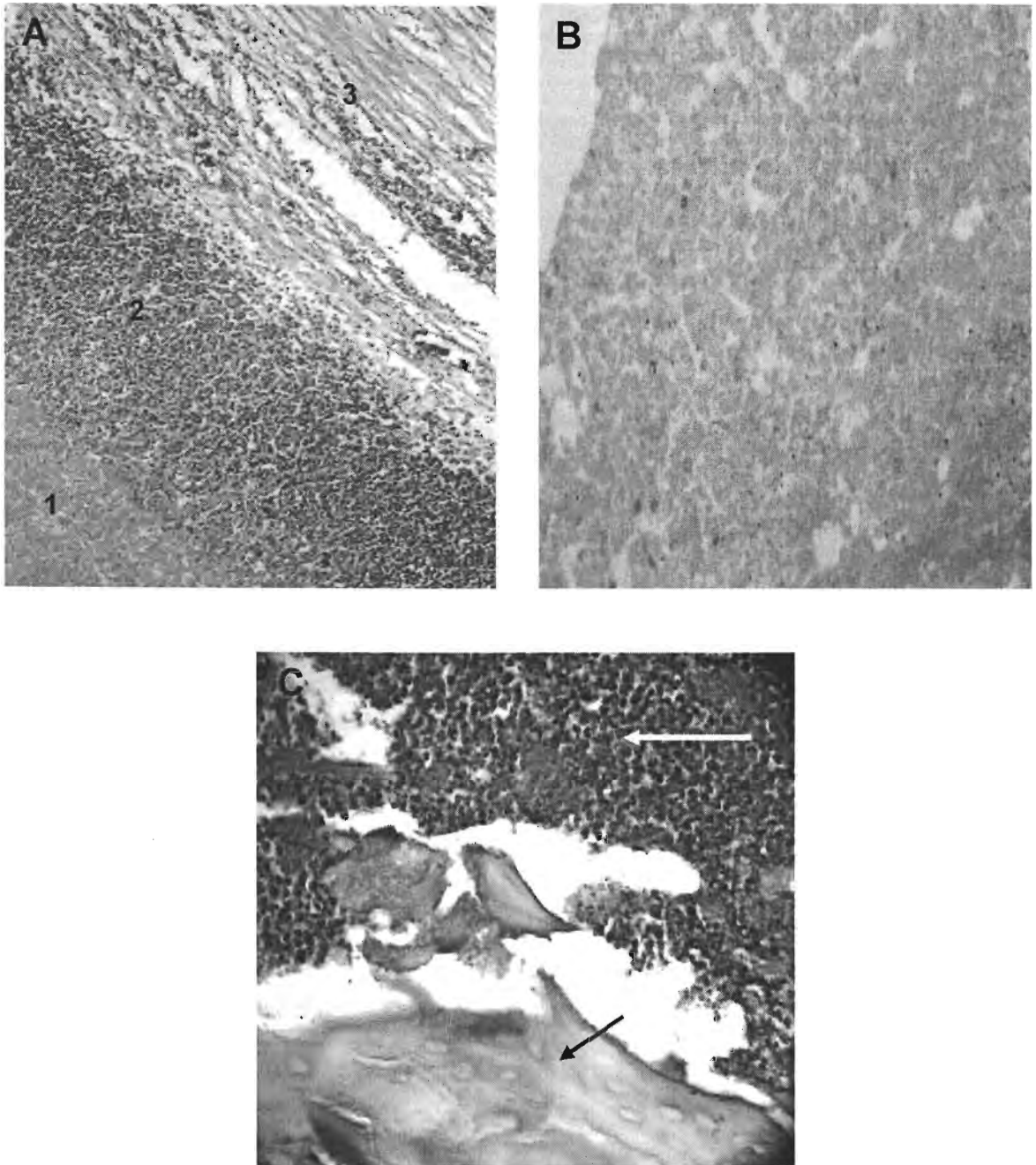
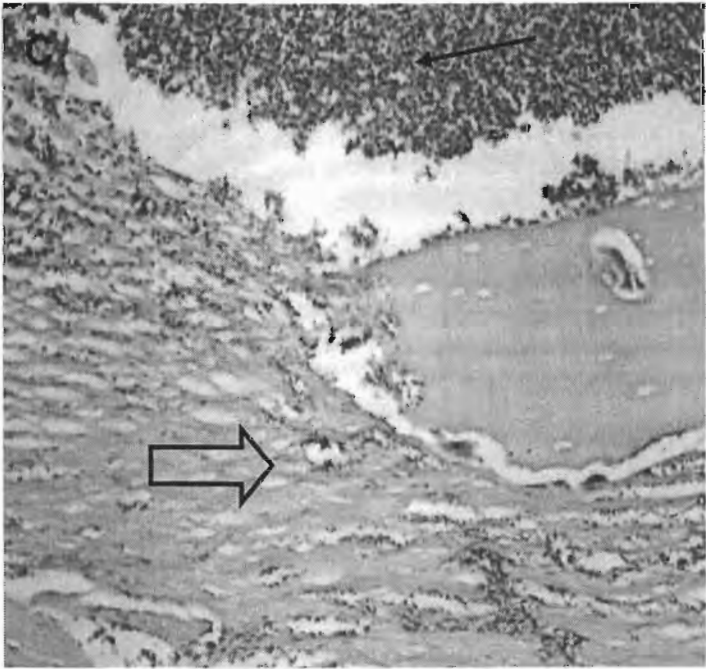
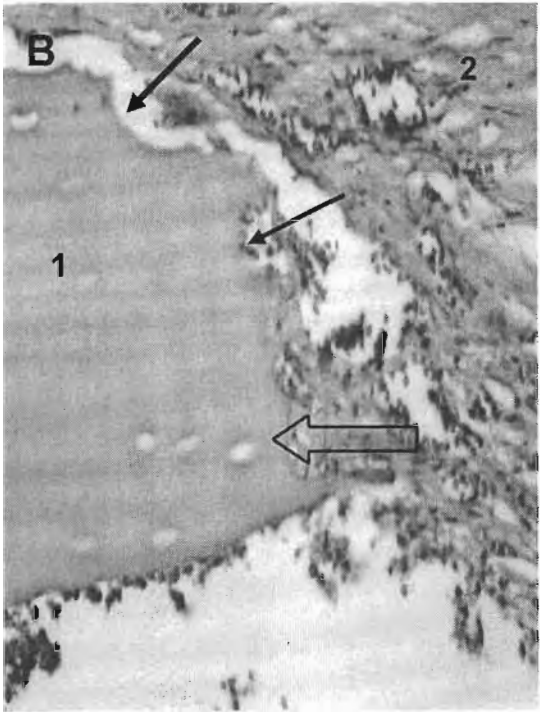
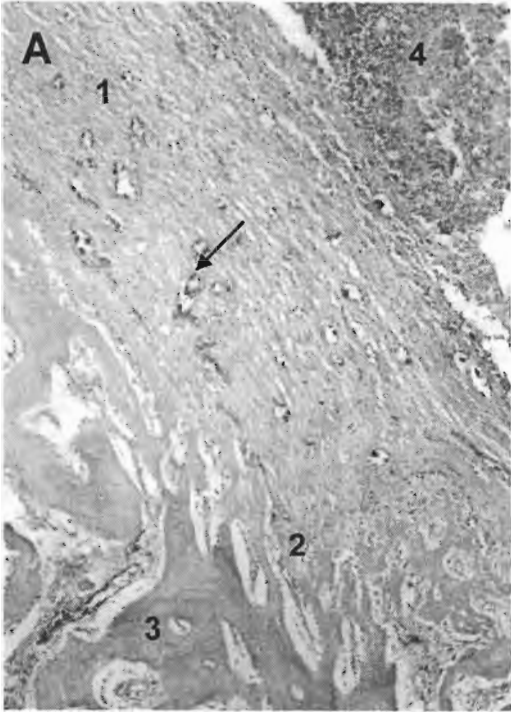


Figura 29. Microfotografías de cortes histológicos de tibia de rata normal e infectada. Las tibias fueron fijadas en formol al 10%, descalcificadas en ácido nítrico al 15%, y cortes longitudinales fueron embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 4 μ que se tiñeron con hematoxilina / eosina. A) Se observan 3 áreas de un absceso; 1) área central del absceso, se observa más clara de necrosis 2) área media muestra una infiltración de células inflamatorias, 3) región de la periferia, en donde se observa tejido fibroso, se caracteriza por células alargadas. (Aumento 100x). B) región central del absceso, en donde se observa ausencia de núcleos,

corresponde a una necrosis licuefactiva. C) la flecha señala espículas de hueso necrótico (lagunas osteocíticas vacías),⁶⁷ rodeadas de un infiltrado inflamatorio (aumento 200x)



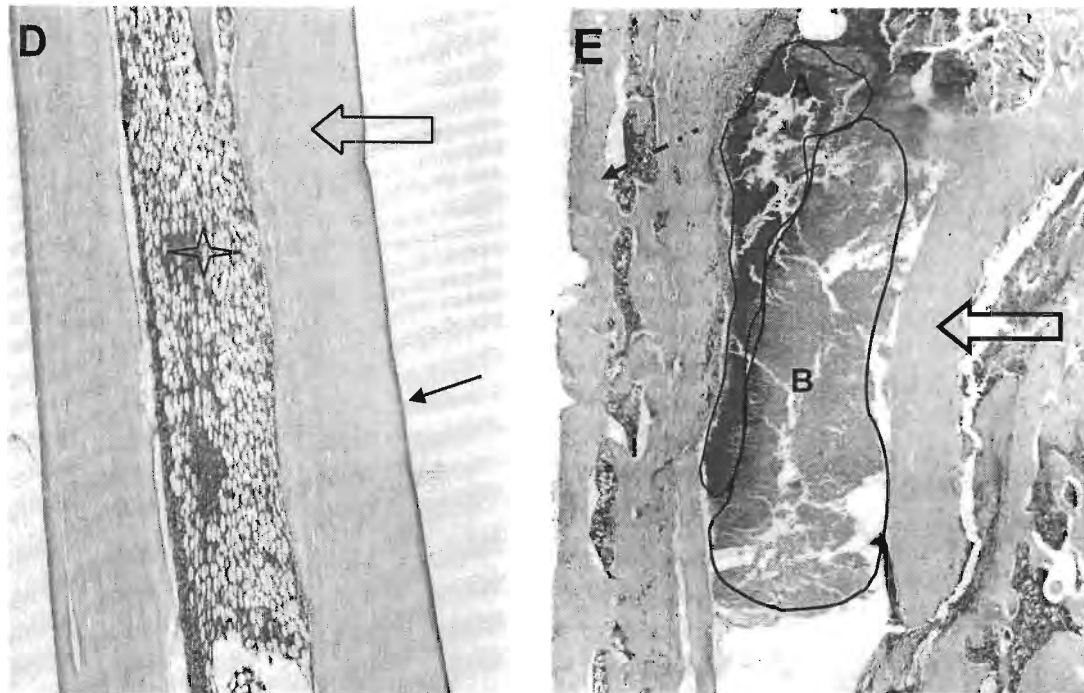


Figura 30. Microfotografías de cortes histológicos de tibia de rata normal e infectada. Fijados en formol a los 10%, descalcificados en ácido nítrico al 15%, y cortes longitudinales fueron embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 4 μ que se tiñeron con hematoxilina / eosina. A) En 1 se muestra abundante tejido de granulación, la flecha indica capilares de neoformación, en 2 se muestra tejido fibroso y en 3 espículas de hueso de nueva formación y 4 exudado (Aumento 100x). B) 1) Hueso necrótico en procesos de resorción, en el que se observan las lagunas vacías (flecha en bloque) se señalan lagunas de resorción osteoclastica y con el número 2 se señala la presencia de tejido fibroso (magnificación 200 x). C) secuestro óseo, adyacente infiltración de células inflamatorias (flecha continua), la flecha en bloque señala la fibrosis y la congestión de vasos sanguíneos (Aumento 100x). D) corte histológico de diáfisis de tibia de rata normal. La flecha en bloque señala el hueso cortical, la flecha oscura señala el periostio y la estrella señala a los elementos celulares de la médula ósea (magnificación 20x). E) diáfisis de tibia de rata con 35 días de infección, la flecha en bloque señala hueso cortical necrótico (secuestro), las áreas A y B corresponden al exudado y la flecha discontinua señala el hueso de nueva formación por reacción perióstica o involucro que rodea a el área de necrosis (magnificación 20x). Tinción H/E.

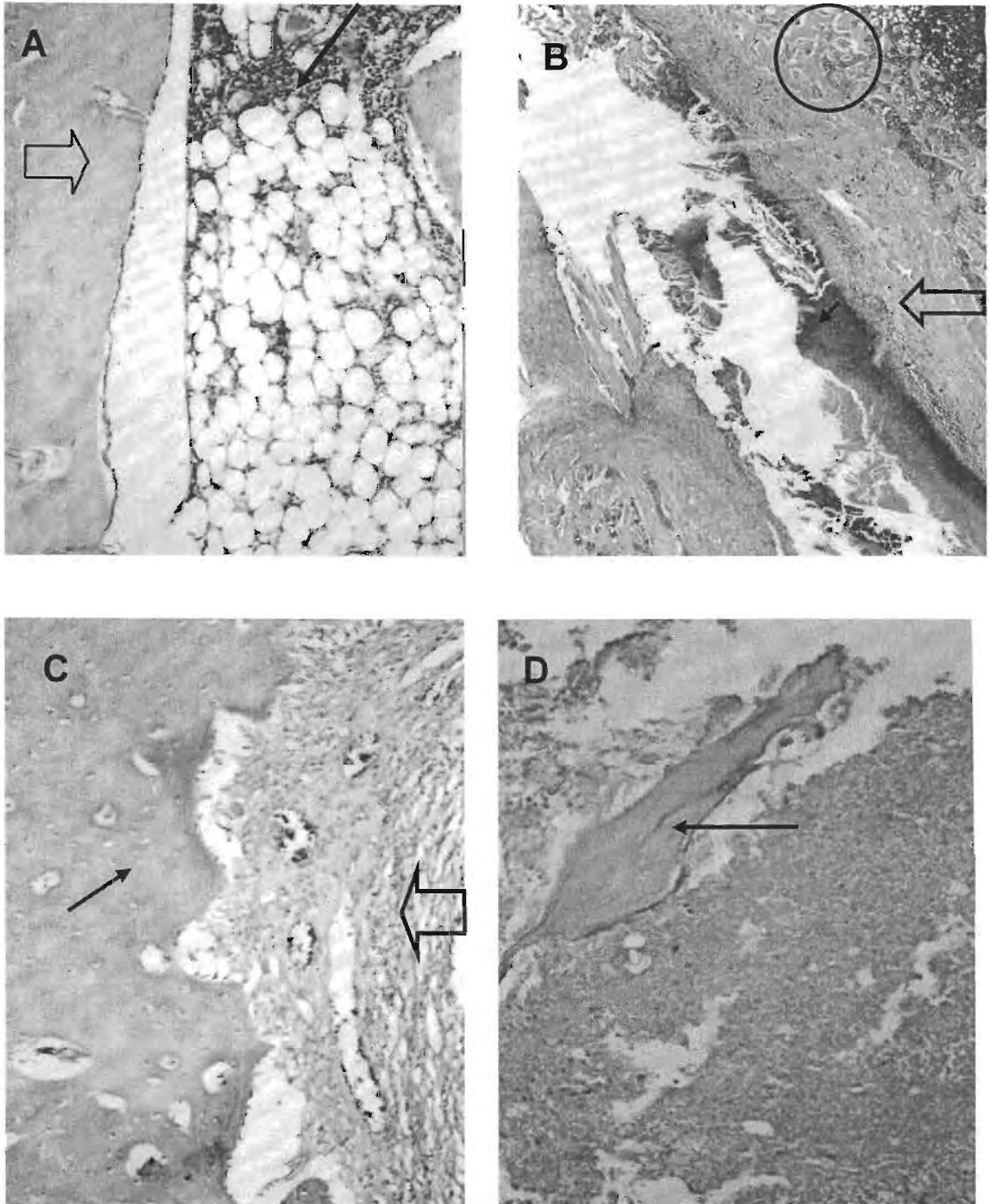


Figura 31. Microfotografías de cortes histológicos de tibias de rata. A) región de la diáfisis de tibia de rata, la flecha indica elementos celulares de la médula ósea normal, la flecha en bloque el hueso cortical (aumento 20x). B) imagen que muestra la diáfisis de la tibia de rata con 36 días de infección, la flecha pequeña indica la presencia de exudado, la flecha en bloque tejido fibroso y en el círculo espículas de hueso de nueva formación. Magnificación 20x. C) Se observa hueso

viable (flecha oscura), vasos sanguíneos congestionados y abundante tejido fibroso (flecha en bloque) (aumento 20x). **D)** Se observa una espícula de hueso necrótico (flecha) dentro del exudado (aumento 100x).

DISCUSIÓN

Resumen

Generamos un modelo de osteomielitis crónica en la tibia izquierda de ratas wistar de 6 meses de edad empleando una cepa de *S. aureus* 76IQM aislada de un paciente con osteítis crónica. Demostramos que expresa actividades caseinolíticas, gelatinolítica y colagenolítica así como de fosfatasa ácida, probables factores de patogenicidad a hueso. Dado el alto grado de virulencia de esta cepa no hubo necesidad de pretratar la cavidad con una sustancia facilitadora de la infección como el morruato de sodio un agente esclerosante (una práctica común en el diseño de modelos animales de osteomielitis). Las ratas infectadas fueron evaluadas clínicamente y la tibia osteomielítica fue caracterizada por radiografía e histología.

Virulencia de la cepa de *S. aureus* 76IQM.

Se desconocen si existen factores de virulencia específicos de *S. aureus* que establecen y mantienen la osteomielitis crónica.^{1,3,30} Más bien, se considera que su virulencia es el resultado de la actividad coordinada de diversas toxinas y enzimas digestivas secretadas, así como un gran número de proteínas de la superficie bacteriana que se unen a hueso.^{41,60}

El *S. aureus* produce diferentes enzimas, tales como proteinasas, lipasas y la hialuronidasa, que destruyen a los tejidos. Estos productos bacterianos pueden facilitar la diseminación de la infección a los tejidos adyacentes, sin embargo su papel en la patogenia de la enfermedad no está bien definida,⁷ se sabe que el organismo secreta 3 tipos diferentes de enzimas proteolíticas: serina proteinasa, cisterna proteinasa y metaloproteinasa.⁶⁰

En el presente trabajo caracterizamos la actividad proteolítica extracelular de las doce cepas de aislados clínicos pertenecientes al cepario del Servicio de Bioquímica del CNR, en placas de agar, según los métodos de Sokol, 1979^{56,61}

Encontramos una variabilidad de respuesta, similar a la descrita por Karlsson y Arvidson, 2002. Predomina la actividad caseinolítica, lo que concuerda con los trabajos realizados por Arvidson, 1973, dada la inespecificidad de la caseína que es sustrato de las tres enzimas que expresa *S. aureus*.⁶²

Tres de las doce cepas de nuestro cepario expresan tres actividades proteolíticas: caseinolítica, gelatinolítica y colagenolítica; entre ellas la cepa *S. aureus* 76IQM.

Se sabe que *S. aureus* expresa una fosfatasa ácida, que como factor de virulencia se comporta como un antígeno al fijarse sobre la membrana basal glomerular e inducir en humanos y ratas una glomerulonefritis y una vasculitis sistémica que afecta a los vasos sanguíneos pequeños y de mediano calibre y como consecuencia también induce una inflamación granulomatosa de las vías respiratorias altas y bajas (enfermedad de Wegener).⁴⁹ Se desconoce si esta enzima juega un papel determinante en la patogenia de la infección ósea.

Los sobrenadantes de los aislados clínicos de *S. aureus* mostraron actividad de fosfatasa ácida. Con el propósito de caracterizar el tipo de actividad se emplearon los métodos de Janckila et al., 2001; Nakanishi et al., 1998, 2000, para

diferenciar la actividad de fosfatasa ácida 5a y 5b; mediante el empleo de inhibidores. Los resultados indicaron una actividad de fosfatasa ácida resistente al tartrato, a la heparina y sensible al fluoruro lo que puede identificarla como el tipo 5b semejante a la osteoclástica.

Casi todos los aislados clínicos se comportan igual a los pH de 5.0 y 6.1 a excepción de las cepas 101 y 89 que muestran diferencias significativas al incrementar su actividad enzimática al elevarse el pH de 5.0 a 6.1.

Existen diferentes criterios para realizar una caracterización fenotípica diferencial entre miembros de una especie bacteriana de importancia clínica. En el caso de *S. aureus* se han empleado entre otras, la tipificación con bacteriófagos, el patrón de susceptibilidad a los antibióticos, la biotipificación con base a su actividad bioquímica, y la determinación de la actividad de diversos productos celulares y extracelulares. Sin embargo debido a que esta especie sintetiza y expresa una gran cantidad de estas sustancias no existe un esquema de pruebas determinado, que permita establecer una correlación entre cierto tipo de cepas causantes de alguna enfermedad y sus características fenotípicas.^{56,66}

Caracterización fenotípica de la cepa de *S. aureus* 76IQM

Previo a su inoculación y después de producir la infección tibial realizamos una caracterización fenotípica de la cepa *S. aureus* 76IQM.

Esta cepa mostró una reacción positiva a la coagulasa del plasma. La producción de coagulasa extracelular es uno de los criterios empleados en microbiología clínica para identificar a los aislados clínicos de *S. aureus*.⁵⁶ Esta capacidad de coagular el plasma se debe a que reacciona específicamente con la protrombina, convirtiendo al fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, no debe confundirse con el factor de aglutinamiento (clumping factor), receptor de superficie celular que se une específicamente al fibrinógeno. Martínez, 1999 encontró que la expresión de la coagulasa celular se asocia con la capacidad de causar infección ósea y la expresión de la coagulasa celular y de las proteínas de unión al fibrinógeno se asocian con el estado de portador sintomático.

La morfología de las colonias del *S. aureus* 76IQM reveló estructuras redondas, lisas, prominentes y brillantes. El *S. aureus* comúnmente forma colonias de color gris o amarillo dorado intenso. El pigmento se forma mejor a temperatura ambiente.⁶⁶ En nuestro aislado como se puede observar en la figura 11B la pigmentación fue variable.

Procedimiento de inoculación

Empleando la cepa de *S. aureus* 76IQM no fue necesario el pretratamiento de la cavidad ósea con agentes facilitadores como el morruato de sodio,^{6,18,19,34,52,53} ácido araquidónico,⁵³ o cuerpos extraños como: implantes metálicos,^{20, 33} o goma de fibrina,²² para generar la osteomielitis en la tibia de la rata. Como en el modelo de Lucke et al., 2003, sólo fue necesario ampliar la cavidad medular manualmente. No se realizó un fresado centromedular a alta velocidad, para no causar termonecrosis⁵² que pudiera intervenir con la virulencia de la cepa.

Para evitar la fuga del inóculo se empleó la cera para hueso, misma que se colocó sobre el sitio de inoculación. Es probable que la presencia de la cera para hueso al actuar como sustancia inerte facilite la infección en el sitio de inoculación. Debido a la presencia de severas infecciones en los tejidos blandos adyacentes al sitio de la entrada del inóculo,⁵⁹ como se puede observar en nuestros estudios radiológicos e histopatológicos, la zona de mayor lesión fue la región en donde se colocó el inóculo. Para producir su modelo de osteomielitis Lucke et al., 2003 y Monzón et al., 2002 colocaron implantes intramedulares sellando así el acceso a la cavidad medular y evitando la salida del inóculo. Otros han usado los yesos dentales para sellar la perforación hecha para aplicar el inóculo.³⁴

El inóculo fue colocado empleando agar al 0.9% un material biocompatible, que no causa necrosis ósea ni actúa como un sustrato inerte, debido a que se reabsorbe rápidamente. Constituye un medio óptimo para el crecimiento bacteriano *in situ*, su uso facilita la aplicación del inóculo, concentra a las bacterias en la cavidad medular y de esta manera reduce el riesgo de contaminación y en consecuencia de sepsis. Hasta la fecha no hay reportes de otros autores que emplearan este método para inocular, aunque sí se ha empleado la goma de fibrina junto con el inóculo, bajo los mismos principios antes mencionados.²²

La cantidad de bacteria inoculada en otros estudios va en rangos de 10^2 - 3×10^6 UFC,^{6,18,19,20,21,22,27,33,34,52,55,59} en contraste con la cantidad de bacteria inoculada en este modelo de 36×10^6 UFC/10 μ L de solución salina estéril; lo que coincide con lo descrito por otros autores que indican que cuando se colocan inóculos grandes con una bacteria altamente virulenta, es factible poder infectar un hueso; a pesar del eficiente sistema inmune que poseen las ratas.³³

El presente modelo simula una osteomielitis clínica, los hallazgos clínicos son los encontrados en humanos y animales infectados con osteomielitis crónica.

Caracterización del modelo de osteomielitis

En el presente trabajo para establecer un diagnóstico de osteomielitis crónica en la tibia de la rata se correlacionaron los hallazgos clínicos, radiológicos e histopatológicos. La radiología sola muestra una especificidad diagnóstica del 57.1% y una sensibilidad de 62.5%.¹⁵

Las radiografías son esenciales en el diagnóstico de la osteomielitis, son importantes para evaluar la presencia de secuestros, involucros, fracturas concomitantes y para el seguimiento de un tratamiento.²⁹ Los hallazgos dependen del estadio de la enfermedad (aguda o crónica).^{2,4,11,15,29,37}

La formación de nuevo hueso periosteal fue uno de los primeros signos radiográficos observados, tal como lo describen otros autores.^{2,29} La destrucción ósea fue otro hallazgo frecuente en los estudios realizados a las ratas infectadas, indicativo de osteomielitis crónica.^{2,11,15,17,21,32,68}

En el presente estudio la infección clínica fue detectable desde las 24 horas del periodo posquirúrgico. Los animales infectados mostraron una pérdida de peso de entre el 4-35% mayor que el reportado por otros autores,^{33, 54,59} ésta pérdida de peso se asocia al traumatismo quirúrgico, anestesia, tensión física asociada a el

mismo proceso infeccioso, durante las 4 semanas en que se mantuvieron vivos los animales, ganaron peso, pero nunca recuperaron su peso inicial.

Como en la enfermedad natural en humanos y animales, el miembro afectado se observó inflamado, caliente y con abscesos.^{1,3,4,5,8,12,23}

La infección se observa lentamente progresiva con destrucción de áreas tales como metáfisis proximal, una gran respuesta del periostio con nueva formación de hueso y la frecuente formación de secuestros, característicos de una osteomielitis crónica.^{2,8,11,12,23,29,37,70}

En el presente estudio la infección fue detectable después de 14 días por los signos radiográficos típicos de osteomielitis tal como lo describen.^{2,12,15,68}

La evaluación histológica después del sacrificio confirmó los resultados radiográficos: destrucción inflamatoria de la cortical y del hueso esponjoso con abscesos y formación periosteal de nuevo hueso, además de la necrosis ósea y formación de secuestros.^{34,67}

El patógeno inoculado pudo cultivarse de todas las tibias infectadas después de 36 días de infección, en contraste con las muestras negativas obtenidas de otros tejidos; lo que indica que los animales hasta ese momento controlaron eficientemente la infección y la concentraron en el hueso infectado; tal y como lo mencionan.^{2,4,12,28}

Así como lo muestran los trabajos realizados por Monzón, A., et al 2001 en donde desarrolla un modelo de infección en hueso de rata; basados en el principio de elegir una cepa altamente productora de biofilm, para no alterar el microambiente celular, nosotros hemos desarrollado un modelo animal basados en la elección de una cepa que expresa altos niveles de proteasas y fosfatasa ácida; si bien se sabe que de acuerdo a los trabajos de Karlsson, A; los niveles de expresión son variables entre los diferentes aislados clínicos.⁴¹

CONCLUSIONES

1. La caracterización de los 12 aislados clínicos de *S. aureus* del cepario del Servicio de Bioquímica del CNR obtenidos de pacientes con alguna infección ósea reveló la expresión de actividad caseinolítica, gelatinolítica y colagenolítica sólo en 3 cepas (76 IQM, 105 IMO y 107 FMR).
2. De las 3 cepas seleccionadas por su expresión de proteinasas, una de ellas, la 76 IQM mostró una actividad de fosfatasa ácida resistente al tartrato particularmente elevada.
3. La cepa *S. aureus* 76 IQM resultó ser muy virulenta. Sin la necesidad de la aplicación de un agente osteonecrosante produjo una infección ósea en ratas inoculadas en la tibia.
4. La caracterización clínica, radiológica e histopatológica del modelo de infección ósea producida en la tibia de ratas inoculadas con la *S. aureus* 76 IQM es de una osteomielitis crónica.

APENDICE

Aspectos de Bioseguridad.

Patogenicidad.

S. aureus es un patógeno oportunista, pertenece a la flora normal, produce una variedad de síndromes, con diferentes manifestaciones clínicas en la comunidad general. La intoxicación alimenticia se caracteriza por cuadros violentos, o abruptos, náuseas, vómito y diarrea de 1 a 2 días de evolución. Las mordidas de animales contaminadas por *S. aureus* pueden resultar en infecciones localizadas, puede causar infecciones superficiales o profundas (sistémicas). Las infecciones superficiales incluyen impétigo, foliculitis, abscesos, furúnculos, laceraciones infectadas. Las infecciones profundas incluyen endocarditis, meningitis, artritis séptica, neumonías, osteomielitis. Las infecciones sistémicas pueden causar fiebre, dolor de cabeza, mialgia, los recién nacidos son susceptibles al síndrome de la piel escaldada (SSS) causada por toxinas exfoliativas, puede contaminarse al nacimiento causando meningitis séptica, síndrome de choque tóxico causado por TSST-1 un superantígeno caracterizado por su presentación súbita, fiebre alta, vómito, diarrea acuosa profusa, mialgia, hipotensión, erupciones eritematosas.

Epidemiología.

Distribución mundial, particularmente en áreas donde la higiene es subóptima, en hospitales por el desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos.

Hospedero. Humanos y en general los animales de sangre caliente.

Dosis infectante. La virulencia de las cepas varía ampliamente.

Mecanismo de transmisión.

El 30-40% de la población se contagia por contacto con secreciones nasales, por contacto con descargas purulentas o fistulas. Se transmite de persona a persona, por ingestión de alimento contaminado que contenga la enterotoxina, alimento contaminado por manejadores de alimentos, de la madre al neonato durante el nacimiento.

Período de incubación.

Es variable e indefinido, comúnmente de 4 a 10 días. La enfermedad puede no ocurrir hasta varios meses después de la colonización. El intervalo entre la ingesta del alimento y la presentación de los síntomas usualmente es de 2- 4 horas (30 minutos a 8 horas).

Mientras las lesiones purulentas continúen drenando persistirá el estado de portador, y el riesgo de diseminar y contaminar el medio ambiente.

Diseminación. A través de aerosoles o secreciones como exudados.

Reservorio. Pacientes humanos con catéteres intravenosos actúan como reservorios para infecciones nosocomiales, alimentos descompuestos, vacas con ubres infectadas.

Medidas de Bioseguridad Nivel II.

Por las características del agente etiológico con el que se trabaja, se tomaron las precauciones correspondientes a la categoría de riesgo que implica el posible riesgo de contagio.

Este nivel es muy similar al nivel 1; los agentes etiológicos (*Staphylococcus aureus*) son de riesgo moderado para el personal que labora. El personal de laboratorio o bioterio está entrenado en el manejo del agente patógeno y deberá ser dirigido por personal competente al respecto.

- El acceso a las áreas de trabajo debe ser limitado, se debe mantener especial cuidado en trabajar con equipo contaminado y extremar precauciones en procedimientos que impliquen la creación de aerosoles.
- El personal deberá lavar sus manos después de trabajar con equipo de riesgo, al retirarse los guantes y antes de dejar el laboratorio.
- Evitar comer, tomar fumar, manejar lentes de contacto, maquillarse en áreas de trabajo. No se deberán almacenar alimentos en gabinetes o refrigeradores del área contaminada.
- Llevar a cabo el pipeteo mecánico.
- Reducir la producción de aerosoles.
- Desinfectar el área de trabajo al terminar el día con desinfectantes específicos al agente patógeno.
- Todo el material de uso rutinario como cristalería, cultivos y otros deberá esterilizarse en autoclave antes de desechar sus contenidos.
- Contar con programas de control de plagas.
- Personal que se encuentre en riesgo de adquirir infecciones, no deberá entrar al bioterio o laboratorio (personas inmunocomprometidas o inmunosuprimidas)

Literatura citada.

- 1 Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects (first of three parts). N Engl J Med 1970; 282:198-206.
- 2 Morgan JP, Leighton RL. Radiology of small animal fracture management. Radiology of osteomyelitis. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995: 43-52.
- 3 Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis: Current concepts Review article. N Engl J Med 1997; 336:999-1007.
- 4 Dernel WS. Treatment of severe orthopedic infections. In: Martínez SA, guest editor. The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice. Fracture management and bone healing. WB Saunders Company, 1999; 29:1261-1274.
- 5 Doige CE, Weisbrode SE. Diseases of bone and joints Chapter 10. In Thomson's special veterinary pathology. Second edition. Edit. Carlton WW. Mosby-year book USA 1995.
- 6 Norden CW. Experimental osteomyelitis. I. A description of the model. The J of Infec Dis 1970; 122: 410-418.
- 7 Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339:520-532.
- 8 Cockshutt JR. Bone Infection. In Bone in Clinical Orthopedics. Sumner-Smith G. AO Publishing. Thieme New York. 2002:205-216
- 9 Wolf AM, Troy GC. Deep mycotic diseases. In Ettinger SJ, Feldman EC. editors: Textbook of veterinary internal medicine, 4th ed. Philadelphia, 1995, WB Saunders.
- 10 Palmer N. Bones and joints. In Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. editors: Pathology of domestic animals. 4th edition. Volume 1, 1993: 4-14. Academic Press, Inc. USA
- 11 Newton CD: Fracture repair. In: Lipowitz AJ, Caywood DD, Newton CD, Schwartz A. editors: Complications in small animal surgery: diagnosis, management, prevention. Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1996: 563-597
- 12 Anderson AA. Osteomielitis. En: Manual de reparación y tratamiento de fracturas en pequeños animales. Coughlan A, Miller A. Harcourt SA, México, DF. 1999; 447-462.

- 13 Thomson MJ, Eger CE. Management of a femoral fracture complicated by clostridium myositis. *J Small Anim Pract* 1997; 38:70-73
- 14 Smith CW, Schiller AG, Smith AR, Dorner JL. Osteomyelitis in the dog: A retrospective study. *JAVMA* 1978; 14:590-592.
- 15 Soontornvipart K, Necas A, Dvorak M. Review article. Effects of metallic implant on the risk of bacterial osteomyelitis in small animals. *Acta Vet Brno* 2003; 72:235-247.
- 16 Mackowiack PA, Jones SR, Smith JW. Diagnostic value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. *JAMA* 1978; 239:2772-5.
- 17 Ciampolini J, Harding KG. Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J* 2000; 76:479-483.
- 18 Norden CW. Experimental osteomyelitis. II. Therapeutic trials and measurement of antibiotic levels in bone. *The J of Infec Dis* 1971; 124: 565-571.
- 19 Norden CW, Dickens DR. Experimental osteomyelitis. III. Treatment with Cephaloridine. *The J of Infec Dis* 1973; 127: 525-528.
- 20 Fischer B, Vaudaux P, Magnin M, Mestikawy YE, Proctor RA, Lew DP, Vasey H. Novel animal model for studying the molecular mechanisms of bacterial adhesion to bone-implanted metallic devices: role of fibronectin in *Staphylococcus aureus* adhesion. *J Orthop Res* 1996; 14:914-920.
- 21 Smeltzer MS, Thomas JR, Hickmon SG, Skinner RA, Nelson CL, Griffith D *et al*. Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res* 1997; 15: 414-421.
- 22 Spagnolo N, Greco F, Rossi A, Ciolli L, Teti A, Posteraro P. Chronic Staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model. *Infect Immun* 1993; 61: 5225-5230.
- 23 Sundaram PM, Bergquist SC, Mader JT. Osteomyelitis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases* 2000; 2:187-199
- 24 Memorias del Simposio Internacional Infectología Aplicada para el Cono Sur 1999.
- 25 Griffiths GL, Bellenger CR. A retrospective study of osteomyelitis in dogs and cats. *Aust Vet J* 1979; 55:587-591.

- 26 Nair SP, Williams R, Henderson B. Review. Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* infection. *Reumathol* 2000; 39: 821-834.
- 27 Chadha HS, Fitzgerald RH, Wiater P, Sud S, Nasser S, Wooley PH. Experimental acute hematogenous osteomyelitis in mice. I. Histopathological and immunological findings. *J Ortho Res* 1999; 17: 376-381.
- 28 Johnson AK. Osteomyelitis in dogs and cats. *JAVMA* 1994; 205: 1882-1887.
- 29 Johnson AK. Osteomyelitis. In: *Small Animal Orthopedics*. Olmstead ML. Mosby-Year Book, 1995:261-275.
- 30 Waldvogel FA, Vasey, H. Osteomyelitis: The past decade. *N Engl J Med* 1980; 303:306-370.
- 31 Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Minireview. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect and Immun* 1996; 64: 2371-2380.
- 32 Henderson B, Nair SP. Hard labour: bacterial infection of the skeleton. *Trends in Microbiology* 2003; 11:570-577.
- 33 Monzón M, García-Alvarez F, Laclériga A and Amorena B. Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. *Acta Orthop Scand* 2002; 73:11-19.
- 34 Littlewood-Evans AJ, Hattenberger MR, Lüscher C, Pataki A, Zak O, O'Reilly T. Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Infect Immun* 1997; 65:3438-3443.
- 35 Jiang Y, Metha CK, Hsu TY, Alsulaimani FFH. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect Immun* 2002; 70: 3143-3148.
- 36 Reid RP. Bone, joint and soft tissue disease. In: Cree IA, editors. *Pathology*. First edition. London: Chapman & Hall, 1997: 548-550.
- 37 Carek PJ, Dickerson LM, Sack, J. Diagnosis and Management of Osteomyelitis. *Am Fam Physician* 2001; 63:2413-20
<http://www.aafp.org/afp>
- 38 Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC, Williams AS, Nousiainen MT. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 1995; 19:409-419.

- 39 Alexander HE, Rivera FA, Marriot I, Anguita J, Kenneth B, Hudson MC. *Staphylococcus aureus* – induced tumor necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts Research article. BMC Microbiology. 2003; 3: 8-11.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/3/5>.
- 40 Rice K, Peralta R, Bast D, Azavedo J, McGavin MJ. Description of *Staphylococcus* serine protease (*ssp*) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of *ssp-A* Encoded serine protease. Infect Immun 2001; 69: 159-169.
- 41 Karlsson A, Arvidson S. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor *sarA*. Infect Immun 2002; 70: 4239-4246.
- 42 Takeuchi S, Saito M, Imaizumi K, Caído T, Higuchi H, Inubushi S. Genetic and enzymatic analyses of metalloprotease (aureolysina) from *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals. Vet Microbiol 2002; 84: 135-142.
- 43 Luna RN, Mena RE, Serrano LJ, Negrete AE. Proteasas microbianas y su identificación con el uso de zimogramas: una técnica sencilla y sensible para identificar y caracterizar proteasas. En Métodos de Investigación en Ambiente y Salud. Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México 2001:159-179.
- 44 Massimi I, Park E, Rice K, Müller-Esterl W, Sauder D, McGavin MJ. Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the SspB cysteine protease of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 2002; 277:41770-41777.
- 45 Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev Sept 1998; 62:597-635.
- 46 Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria Minireview. FEMS Microbiol Let 2000; 183: 201-207.
- 47 Harrington DJ. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. Infect Immun 1996; 64:1885-1891.
- 48 Du Plessis EM, Theron J, Joubert LE, Lotter TC, Watson TG. Characterization of a phosphatase secreted by *Staphylococcus aureus* strain 154, a new member of the bacterial class C family of nonspecific acid phosphatases. Syst Appl 2000

- 49 Popa RE, Stegeman CA, Kallenberg CGM, Tervaert JWC. *Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res* 2002; 4:77-79
- 50 Ek-Rylander B, Barkhem T, Ljusberg J, Öhman L, Andersson K, Andersson G. Comparative studies of rat recombinant purple acid phosphatase and bone tartrate-resistant acid phosphatase. *Biochem J* 1997; 321:305-311.
- 51 Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontina and bone sialoproteína by osteoclastic tartrate resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269:14853-14856.
- 52 Rissing PJ, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun* 1985; 47:581-586.
- 53 Rissing PJ, Buxton TB, Fisher J, Harris R, Shockley RK. Arachidonic acid facilitates experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun* 1985; 49:141-144.
- 54 Fitzgerald RH. Experimental osteomyelitis: Description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone and Joint Surg* 1983; 65-A: 371-380.
- 55 Deysine M, Isenberg HD, Steiner G. Chronic haematogenous osteomyelitis; Studies on an experimental model. *Inter Ortho (SICOT)* 1983; 7: 69-78.
- 56 Martínez CJ. *Staphylococcus aureus*: Caracterización fenotípica y genotípica de aislados clínicos causantes de osteomielitis crónica. Tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en: Biomedicina Molecular. Programa institucional de Biomedicina Molecular. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada CINVESTAV. Insituto Politécnico Nacional. México. Mayo1999.
- 57 Stoscheck CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 1990; 182: 50-69.
- 58 Franco-Bourland RE. *Neurochemical Research* 1998; 23:695-701.
- 59 Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Stemberger A, Haas NP and Raschke M. A New Model of Implant-Related Osteomyelitis in Rats. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2003; 67B; 593-602.

- 60 Arvidson SO. Extracellular enzymes from *Staphylococcus aureus*. In: Easmon CF, Adlam C, editors. *Staphylococci and staphylococcal infections*. London: Academic Press, 1983.
- 61 Sokol PA, Ohman DE, Iglewski HB. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 538-540.
- 62 Arvidson S. The Role of calcium for stability and activity of an extracellular proteolytic enzyme from *Staphylococcus aureus*. *Acta path microbiol scand. Section B*. 1973; 81:545-551.
- 63 Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 2001; 47:74-80.
- 64 Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Naphtol-ASBI phosphate as a preferred substrate for tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b. *J of Bone and Min Res* 2001; 16:788-793.
- 65 Nakanishi M, Yoh K, Uchida K, Maruo S, Matsuoka A. Improved method for measuring tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 1998; 44:221-225.
- 66 Nakanishi M, Yoh K, Miura T, Ohasi T, Rai SK, Uchida K. Development of a kinetic assay for band 5b tartrate resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 2000; 46:469-473.
- 67 Barbour AG. Vaginal Isolates of *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. *Infect Immun*. 33: 442-449.
- 68 Brooks GF, Batel JS, Morse SA. Estafilococos. *Microbiología Médica*. 17a. edición. Edit. El Manual Moderno. México 2002; 243-250.
- 69 Evans RP, Nelson CL, Harrison BH. The effect of wound environment on the incidence of acute osteomyelitis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1993; 286: 289-297.
- 70 Shirliff ME and Mader JT. Imaging in Osteomyelitis and Septic Arthritis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases* 2003; 5:323-335.