



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“Caracterización de los aislamientos de *S. aureus* en infecciones
osteoarticulares en pacientes pediátricos del
Instituto Nacional de Pediatría”**

TESIS
**PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA
Nancy Evelyn Aguilar Gómez

TUTORA PRINCIPAL
Dra. en C. Alejandra Aquino Andrade
Instituto Nacional de Pediatría

Ciudad de México, septiembre 2021



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alejandra Aquino Andrade por su apoyo, guía, enseñanzas y motivación.

A la Dra. Mercedes Macías Parra por su apoyo y motivación para la realización de la maestría.

A Norma y Michel por su amor, comprensión y motivación durante este proceso.

A Carlos mi mejor amigo y compañero de vida por siempre estar, escuchar y motivar todos los días.

Gracias

Índice

Resumen estructurado.....	1
Pregunta de investigación.....	2
Antecedentes.....	2
Aspectos microbiológicos.....	2
Factores de virulencia	3
Resistencia antimicrobiana.....	11
Tipificación mediante secuencia multilocus (MLST)	12
Infecciones osteoarticulares.....	14
Planteamiento del problema	24
Justificación	25
Hipótesis.....	25
Objetivos	25
General.....	25
Específicos	25
Material y métodos	26
Criterios de selección	26
Tipificación molecular a partir de la muestra de secreción.....	29
Extracción de DNA del aislamiento de <i>S. aureus</i>	29
Amplificación de los genes 16S rRNA, <i>nuc</i> , <i>mecA</i> , <i>pvl</i> , <i>hla</i> , <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>cna</i> , <i>tst</i> , <i>fem A</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>SpA</i> , <i>eta</i> , <i>etb</i> y <i>sec</i>	29
Detección de <i>SCCmec</i>	31
Determinación del complejo clonal	32
Determinación de ST.....	33
Análisis estadístico.....	33
Resultados	33
Frecuencia de <i>S. aureus</i> como agente causal de las infecciones osteoarticulares.....	33
Características demográficas.....	36
Hallazgos de laboratorio	39
Evolución hospitalaria	39
Identidad microbiológica.....	46
Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos.....	46
Confirmación de identidad	47
Detección de genes de virulencia	48
Genes de virulencia y manifestaciones clínicas	50
Identificación de CC y MLST	56
Discusión	62
Referencias	77

Índice de Figuras

Figura 1.Descripción gráfica de los factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	4
Figura 2. Modelo de la formación de poros por la citotoxina Hla	8
Figura 3. Descripción gráfica de los factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	9
Figura 4.Disminución de la prevalencia de SAMR en osteomielitis y artritis séptica.....	15
Figura 5. Mecanismos inmunológicos de la persistencia de <i>S. aureus</i> en el contexto de osteomielitis.	22
Figura 6. Internalización de <i>S. aureus</i> dentro de los osteoblastos	23
Figura 7 Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes con infección osteoarticular.....	34
Figura 8. Distribución de los aislamientos de pacientes con infecciones osteoarticulares.....	35
Figura 9 Radiografía AP y reconstrucción 3D de fémur derecho.....	38
Figura 10. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en placa de agar sal y manitol por estría cruzada de la muestra O-57...	46
Figura 11. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>S. aureus</i>	47
Figura 12 Detección del gen nuc y 16S rRNA por PCR	47
Figura 13. Detección del gen mecA por PCR.	48
Figura 14. Detección del gen SCCmec por PCR.....	48
Figura 15. Distribución de los factores de virulencia de lo saislamientos de <i>S. aureus</i>	49
Figura 16. Detección del gen pvl por PCR	50
Figura 17. Factores de virulencia detectados en relación al tipo de infección osteoarticular.	51
Figura 18. Factores de virulencia detectados en relación a la temporalidad en infección osteoarticular	53
Figura 19. Distribución de los complejos clonales.....	56
Figura 20. CC y resistencia antimicrobiana	58

Índice de Tablas

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> implicados en la patogenia	10
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> en infecciones osteoarticulares.....	17
Tabla 3. Estudios solicitados a los pacientes con infección osteoarticular	27
Tabla 4. Valores de interpretación para la susceptibilidad de <i>S. aureus</i>	29
Tabla 5. Iniciadores utilizados para la detección de genes de virulencia de <i>S. aureus</i>	30
Tabla 6. Iniciadores utilizados en la mPCR para la detección de SCCmec.....	31
Tabla 7. Iniciadores utilizados para la detección de complejos clonales	32
Tabla 8. Tamaño esperado de los amplicones de los CC.....	33
Tabla 9. Características demográficas de los pacientes con infección osteoarticular por <i>S. aureus</i>	36
Tabla 10. Características clínicas de los pacientes con infección osteoarticular por <i>S. aureus</i>	37
Tabla 11. Estudios de laboratorio de los pacientes con infección osteoarticular por <i>S. aureus</i>	39
Tabla 12. Evolución en pacientes con infecciones osteoarticulares por <i>S. aureus</i>	40
Tabla 13 Características clínicas y diagnóstico de los pacientes con infección osteoarticular por <i>S. aureus</i> .42	
Tabla 14 Tratamiento y evolución de los pacientes con infección osteoarticular por <i>S. aureus</i>	44
Tabla 15. Factores de virulencia clasificados por mecanismo de acción en infecciones osteoarticulares.....	51
Tabla 16. Frecuencia de factores de virulencia y cuadro clínico en IOA	54
Tabla 17. Frecuencia de factores de virulencia y parámetros de laboratorio.....	55
Tabla 18. Frecuencia de factores de virulencia y estancia hospitalaria en pacientes con IOA.....	55
Tabla 19.Factores de virulencia y complejo clonal	57
Tabla 20. Frecuencia de CC y complicaciones en IOA por <i>S. aureus</i>	59
Tabla 21.Resistencia antimicrobiana, factores de virulencia y complejo clonal.....	60

Resumen estructurado

Introducción: La producción de distintos factores de virulencia por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en las infecciones osteoarticulares (IOA) se ha relacionado con la resistencia a antibióticos, producción de biofilm, formación de variantes patogénicas y persistencia de la infección en los osteoblastos. **Objetivo:** Caracterizar molecularmente los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de muestras de IOA en pacientes pediátricos. **Hipótesis:** *S. aureus* metilcilino sensible (SAMS) con PVL será el principal patógeno responsable de las IOA en pacientes pediátricos. **Material y métodos:** Se incluyeron 54 pacientes con IOA. Se colectaron los datos de las variables clínicas y laboratoriales de los pacientes en los que se detectó a *S. aureus*. De cada aislamiento se confirmó su identidad mediante la detección del gen *nuc* y 16SrRNA, se identificaron 14 genes de virulencia, se realizó el perfil de susceptibilidad, prueba D, detección del gen *mecA* y casete cromosómico SCC*mec* en los aislamientos resistentes a cefoxitina, también se amplificaron los genes relacionados con la resistencia a macrólidos, lincosamida y estreptogramina B (*ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA*). Se determinó el complejo clonal (CC) y la secuencia tipo a través de la tipificación de secuencia multilocus (MLST). **Análisis de datos:** Se describió la frecuencia de los factores de virulencia, resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *S. aureus*, cuadro clínico y tratamiento en pacientes con infección osteoarticular. **Resultados:** En 20 pacientes se aisló a *S. aureus*. Existió un predominio en hombres (55%) con una mediana de edad de 13 (3-17) años y el 50% fueron previamente sanos. El 95% de los aislamientos fueron SAMS, la mayoría se clasificó como CC8. El único aislamiento de *S. aureus* resistente metilcilina (SAMR) tuvo el elemento SCC*mec*-II y perteneció al CC5. El gen *clfA* fue el más frecuente (n=19.95%) seguido de *hla* y *spA* (n=14. 70%), *fnbA* (n=11. 55%), *femA* (n=9. 45%), *fnbB* (n=5. 25%), *pvl* (n=4. 20%), *cna* y ambos *fnb* (n=3.15%), *tst* (n=2.10%), *eta* y *mecA* (n=1.5%). En ningún aislamiento se detectaron los genes *clfB*, *etb* y *sec*. El dolor intenso (EVA >8), duración prolongada de la fiebre y extensión local se presentaron en los pacientes en los que se aisló *S. aureus* con el gen *pvl* y ambos genes *fnb*. La resistencia a clindamicina fue del 15%, la prueba D- fue positiva en 2 aislamientos (10%) y el gen *ermA* se detectó en cuatro aislamientos. **Conclusion:** *S. aureus* fue el agente etiológico principal (40.7%) de las IOA en pacientes pediátricos incluidos. Existe un predominio de SAMS (95%) sin relación clonal. El único aislamiento de SAMR fue elemento SCC*mec* tipo II y CC5 asociado a infecciones hospitalarias. Los pacientes con SAMS con *pvl* y ambos genes *fnb* presentaron datos clínicos de gravedad y su detección es prioritaria para dar tratamiento antibiótico dirigido, disminuir complicaciones y secuelas asociadas. En este estudio al existir un predominio de SAMS la gravedad e invasividad de las cepas de *S. aureus* se puede explicar por la producción de distintos factores de virulencia y no con la presencia de resistencia a metilcilina. **Consideraciones éticas:** La participación del paciente en el estudio involucró el riesgo habitual en el abordaje diagnóstico. Se solicitó consentimiento y en mayores de 12 años, asentimiento informado para autorizar el análisis de una alícuota de la secreción de IOA. Se protegió la integridad de los datos, resguardando la intimidad de los individuos y la confidencialidad de la información del paciente.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son las características moleculares de los *S. aureus* que causan las infecciones osteoarticulares en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría?

Antecedentes

Aspectos microbiológicos

S. aureus es un microorganismo descubierto en 1880, por el cirujano escocés Alexander Ogston quien encontró que la pus producida en las heridas quirúrgicas era generada por esta bacteria, al observar un absceso de uno de sus pacientes al microscopio.¹ Posteriormente, en 1882, Ogston le dio el nombre de “*Staphylococcus*”, del griego “*Staphylo*” que significa “racimo de uvas”.¹

Es una bacteria Gram positiva, pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, se agrupa en racimos, es β - hemolítico, las pruebas catalasa y coagulasa son positivas, tiene morfología circular de 0.5 a 1.8 μm de diámetro.¹ Coloniza piel, zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas en el 20% de manera persistente y 30% intermitente de la población general, 50-60% en los trabajadores de la salud, diabéticos y usuarios de drogas intravenosas.^{2,3} *S. aureus* es un patógeno frecuente a nivel hospitalario y comunitario; se transmite entre las personas por contacto estrecho y es responsable de infecciones de piel, mucosas, asociadas a dispositivos médicos e invasivas como bacteriemia, neumonía, endocarditis y osteomielitis.²

Los microorganismos que se aíslan mediante técnicas de cultivo son cruciales para el diagnóstico fenotípico y para determinar la resistencia antibiótica. Se han descrito diversas técnicas para el cultivo y la identificación de los estafilococos.⁴ Las muestras deben de inocularse en medios de agar sangre de carnero al 5%, sal y manitol y medios líquidos enriquecidos como el caldo de Mueller- Hilton.⁵ *S. aureus* tiene un crecimiento abundante, normalmente a las 18-24 h; no obstante, las variantes morfológicas pueden requerir períodos de crecimiento prolongados y las placas se deben mantener durante dos a tres días para detectarlas.³ Las células se tiñen con tinción de Gram, se subcultivan y se evalúan respecto al género, la especie y la sensibilidad antimicrobiana.⁶

El diagnóstico molecular desempeña un papel cada vez más importante en la detección rápida de los patógenos (en la actualidad se pueden obtener a las pocas horas, en lugar de 1-3 días en el caso de los métodos de cultivo bacteriano) y en la identificación de los determinantes de la resistencia a los antibióticos.⁶ Los métodos moleculares también permiten detectar la presencia de microorganismos de cultivo difícil, principalmente en los pacientes que han tomado antibióticos antes de la obtención de las muestras.⁶

Factores de virulencia

S. aureus es portador de 20 adhesinas y más de 30 genes de toxinas;⁷ establece infección por la expresión de diferentes factores de virulencia, lo cual le ayuda a promover la adhesión, invasión, colonización, producir lesión tisular, evadir la respuesta inmune y la diseminación a múltiples órganos.^{4,5} Los factores de virulencia de *S. aureus* se dividen en: polisacáridos capsulares, proteínas de la superficie, exotoxinas, superantígenos y enzimas.⁸ Al establecerse una infección, *S. aureus* regula la expresión de genes que codifican para proteínas de la superficie involucradas en la adhesión y defensa contra el sistema inmune del huésped. En fases tardías de la infección, toxinas bacterianas son expresadas y facilitan la diseminación.⁶

(Figura 1)

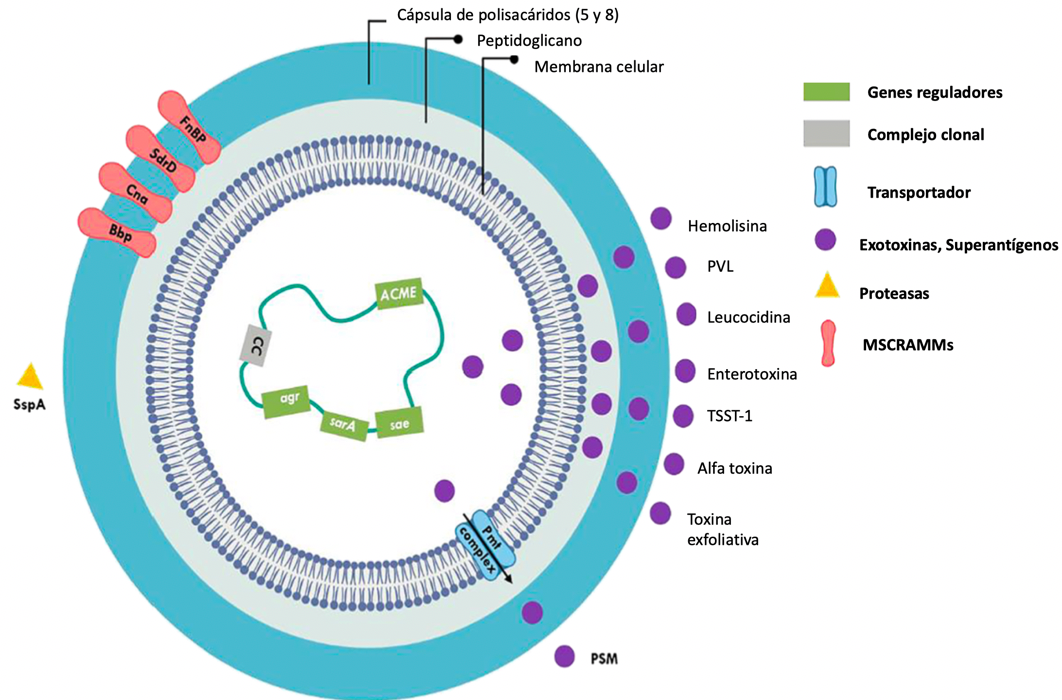


Figura 1. Descripción gráfica de los factores de virulencia de *S. aureus*.

Esquema de los factores de virulencia de *S. aureus*. Proteínas de la superficie, polisacáridos capsulares, factores secretados; hemolisinas, superantígenos y enzimas. SspA: proteína A, Cna: proteína de unión A colágeno, FnBP: proteínas de unión a fibronectina A y B, ACME: Elemento móvil catabólico de arginina, CC: complejo clonal, *agr*: gen regulador accesorio, *sarA*: regulador accesorio estafilocócico, *sae*: regulador de respuesta, PSM: modulinas solubles en fenol, PMT complex: transportador de PSM, MSCRAMMs: *Microbial Surface Component Reacting with Adherence Matrix Molecules*.⁹

Polisacáridos capsulares: Aproximadamente el 90% de las cepas clínicas de *S. aureus* presentan una cápsula de polisacáridos entre los cuales se han definido 11 serotipos. Los *S. aureus* de serotipos 5 (CP5) y 8 (CP8) son responsables del 75-80% de las infecciones clínicas.³ CP8 es menos virulento que CP5 ya que este último ha demostrado causar bacteriemia en modelos experimentales.³ La cápsula reduce la fagocitosis por los neutrófilos, facilita la colonización y persistencia en la superficie mucosa y se expresa en etapas tempranas de la infección.¹⁰

Pared celular: Está formada por una capa de 20-30 nm de peptidoglicano.³ Es una barrera de protección para la bacteria y permite la adherencia las estructuras fundamentales para la virulencia del microorganismo.³ La estructura de cadenas de glicanos está formada por residuos alternados de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico unidos por enlaces β 1-4.³

Proteínas de superficie: Las proteínas ancladas a la pared celular tienen diversas funciones desde adhesión, invasión a las células huésped y evasión del sistema inmune. Estos componentes de la superficie microbiana reaccionan con moléculas de la matriz de adherencia y son designados bajo el acrónimo MSCRAMM (*Microbial Surface Component Reacting with Adherence Matrix Molecules*).¹⁰ *S. aureus* contiene más de 20 genes que codifican a las proteínas de superficie.¹¹ Entre las MSCRAMMs relevantes en la patogenia se encuentran los factores de aglutinación A y B (ClfA y ClfB, respectivamente), proteínas A (SpA), factor de unión a fibronectina A (FnBPA) y factor de unión a fibronectina B (FnBPB) de unión a fibronectina y la proteína de unión a colágeno (Cna).^{4, 7}

- **Proteína A:** es una proteína de 42-kDa que se une covalentemente a la capa de peptidoglicano de la pared celular de *S. aureus*.¹¹ Su expresión está regulada por el gen *agr*, que es un regulador global que altera la expresión de varios genes de *S. aureus*, incluyendo los que codifican a hemolisinas y enterotoxinas. La SpA une a la porción Fc de todas las subclases de IgG, excepto la IgG₃.¹¹ También se une a los receptores Fc de polimorfonucleares e interfiere con la fagocitosis y opsonización.¹¹ Es el único superantígeno de las células B que produce *S. aureus*.¹² Además la SpA se puede unir a al receptor del factor de necrosis tumoral (α -TNF), ampliamente distribuido en el epitelio de la vía respiratoria superior y estimular la respuesta inflamatoria sistémica en las células epiteliales superiores, lo cual se ha asociado a la patogénesis de la neumonía por *S. aureus*.¹³
- **Factor de unión a fibrinógeno A y B:** Una de las características más importantes de *S. aureus* es su capacidad de formar acúmulos en presencia de plasma, que está dada por proteínas de adhesión al fibrinógeno que le permiten crear una red entre la bacteria y el fibrinógeno, lo que a su vez ocasiona aglutinación celular. La afinidad que presenta este

factor es muy alta ya que se puede producir aglutinación en bajas concentraciones de fibrinógeno. Este factor está dado por dos proteínas la ClfA y la ClfB.¹⁴ Se ha visto que estas proteínas pueden tener una implicación directa en la endocarditis invasiva y colonización nasal por *S. aureus* al unirse al fibrinógeno presente en el cuerpo del huésped.¹⁴

La importancia de esta proteína está dada por ser el precursor de la fibrina, la cual interviene en los procesos de coagulación y su posible participación en enfermedades aterotrombóticas.¹⁴ Las proteínas de unión al fibrinógeno son expresadas en diferentes etapas del desarrollo bacteriano dándose la expresión de la proteína ClfA durante todo proceso de crecimiento, mientras que la proteína ClfB sólo es expresada en la fase temprana de crecimiento exponencial.^{14,15}

- **Proteína de unión a fibronectina A y B (FnBPA y FnBPB):** El reconocimiento de la fibronectina presente en la matriz extracelular de los humanos por parte de *S. aureus* es de gran importancia, ya que ayuda a la colonización, invasión, proliferación y motilidad de las bacterias.¹⁶ Estas proteínas tienen la capacidad de unirse a ligandos como fibronectina, fibrinógeno, elastina, plasminógeno e histonas; por el dominio N-terminal seguido por una región que contiene 11 repeticiones de aminoácidos en el caso de FnBA y 10 repeticiones para la FnBB.^{10,17} La fibronectina es una glicoproteína que se puede encontrar en el plasma sanguíneo u otros fluidos (forma soluble), y tisularmente se ensambla en la matriz celular.¹⁷ Dentro de sus funciones en las superficies bióticas y abióticas se ha visto que juega un papel importante en la adhesión e internalización de las células a la matriz y con lo anterior ayuda a la formación del biofilm.¹⁷ Además, actúa como guía de las migraciones celulares que tiene lugar en los embriones de los vertebrados.

Se ha visto que la fibronectina ayuda a incrementar la coagulación de la sangre, así como también está presente en la cicatrización y en la fagocitosis.¹⁴ La expresión de fibronectina está dada en la fase exponencial de crecimiento y se encuentra limitada en la fase estacionaria (modificado por proteasas) mediado por los locus reguladores *sar* (regulador positivo) y *agr* (regulador negativo).¹⁶

La FnBPA es indispensable para la internalización de las bacterias a la célula huésped mientras que la FnBPB estimula la fagocitosis.¹⁰ La mayoría de los *S. aureus* es portador

de ambos *fnb*, y parece no existir diferencia en la adhesividad entre las cepas que portan uno o ambos genes.¹³ Sin embargo se ha asociado a que ambos se expresan en enfermedad invasiva.¹³

- **Proteína de unión a colágeno (Cna):** Se une al colágeno tipo I, el cual es uno de los principales componentes del cuerpo humano.¹⁶ Es el principal prototipo de las MSCRAMMs, actúa evadiendo al sistema inmune y como factor de adhesión.¹⁶

Factores de virulencia secretados (Exotoxinas)

Estos factores son producidos durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento; interfieren con la respuesta inmune y facilitan la diseminación bacteriana.⁷ Las exotoxinas representan el 10% del total del secretoma. Existen más de 40 exotoxinas que se producen por *S. aureus*, la mayoría con funciones y estructura similares, se clasifican con base a sus funciones en citotoxinas, superantígenos y enzimas citotóxicas.

Las citotoxinas actúan en la membrana celular, resultando en la lisis de las células y en inflamación. Los superantígenos median la producción masiva de citocinas estimulan la proliferación de células T y B. Las citotoxinas secretadas dañan las células. De forma colectiva estas exotoxinas modulan la respuesta inmune del huésped y son críticas para la infección por *S. aureus*.¹²

Citotoxinas

- **Hemolisinas:** *S. aureus* posee un mínimo de cuatro hemolisinas denominadas: α , β , δ y γ -hemolisina. Estas enzimas pueden inducir la lisis de los eritrocitos y de otras células eucariotas.⁶

La **α -hemolisina** (Hla) Es una citotoxina secretada como monómero. Al unirse a su receptor en la membrana, ADAM-10 (desintegrina y metaloproteasa 10), la toxina se oligomeriza para formar heptámeros, poros e inducir citotoxicidad celular.¹² Esta toxina causa lisis de varias células: eritrocitos, plaquetas, leucocitos, células endoteliales y epiteliales; a bajas concentraciones modula la respuesta inflamatoria al estimular la

producción de citocinas proinflamatorias¹² (**Figura 2**).

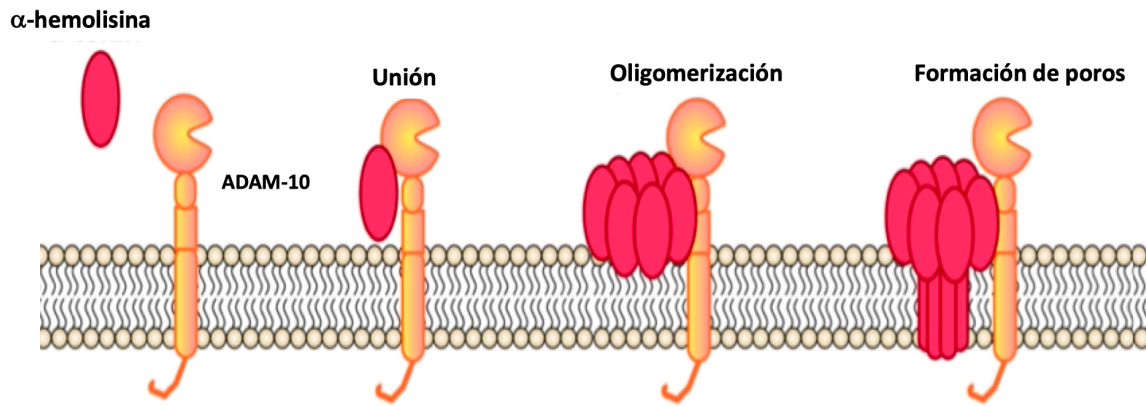


Figura 2. Modelo de la formación de poros por la citotoxina Hla

Unión y oligomerización de la α -hemolisina (Hla) con la formación de poros en la membrana.¹²

- **La leucocidina de Pantón Valentine** es una citotoxina codificada por dos genes: *lukS-PV* y *lukF-PV*, localizados en un bacteriófago.⁴ Los receptores celulares son C5aR1 y C5aR2 presentes en conejos y humanos.¹² Estos genes son responsables de la producción de dos proteínas secretoras las cuales actúan juntas ensamblándose en la membrana de las células de defensa del huésped, particularmente en los macrófagos, neutrófilos y monocitos, causando su lisis, liberación de mediadores inflamatorios, dermonecrosis, infección crónica y la pérdida de la acción fagocítica.¹⁷ La liberación de mediadores inflamatorios provoca vasodilatación, producción de iones superóxido y necrosis tisular (actúan como superantígenos) (**Figura 3**).^{4, 18} La toxina se ha detectado tanto en los aislamientos de SAMS como SAMR.⁴

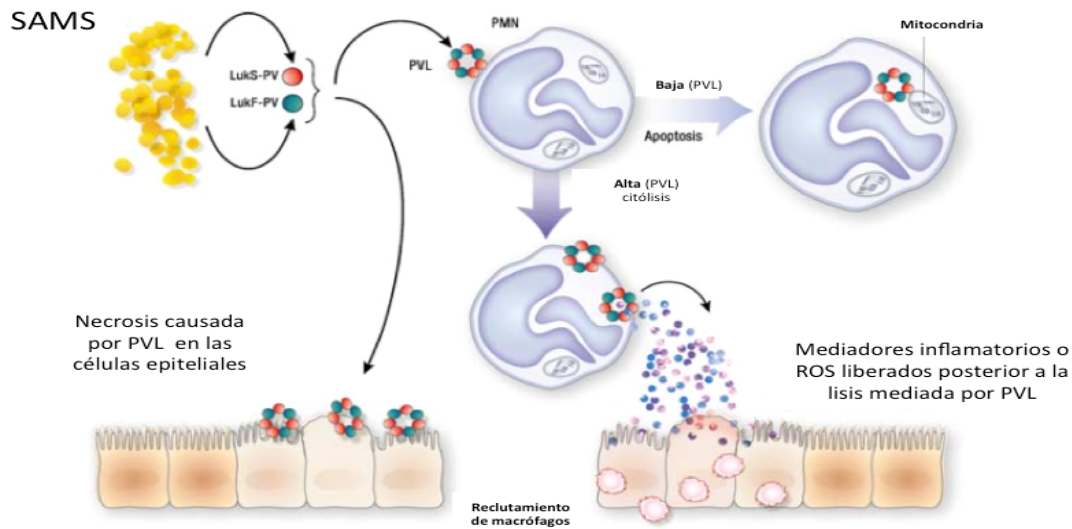


Figura 3. Descripción gráfica de los factores de virulencia de *S. aureus*.

Los dos componentes LukS- PV y LukF- PV son secretadas por *S. aureus* antes de ser ensambladas en un heptámero formador de poro en la membrana de los polimorfonucleares (PMN). Elevadas concentraciones de PVL causan lisis y en bajas concentraciones produce apoptosis al unirse directamente a las mitocondrias.¹⁹

Superantígenos

Todos los *S. aureus* producen uno o más superantígenos; actualmente, se han identificado 22 diferentes incluyendo enterotoxina estafilococcica, proteína similar a enterotoxina, síndrome de choque tóxico. Esta familia de toxinas se caracteriza por la capacidad de inducir inflamación sistémica descontrolada por la sobreproducción de citocinas.²⁰

- **Enterotoxinas:** Existen seis diferentes enterotoxinas (SEs): SEA a SEE y SEG. Reciben este nombre por la capacidad de producir emesis y diarrea; que son datos característicos de la intoxicación alimentaria por *S. aureus*.¹² Existe una similitud en la secuencia de DNA entre toxinas del 75-99% con la excepción de SED la cual tiene un 55%.¹¹ Actúan como superantígeno y estimulan la expresión de los genes IL-4 e IL-10 con una activación subsecuente de células TH2, resultando en una supresión de la eliminación de los patógenos invasores.¹⁵
- **Toxina 1-Síndrome de choque tóxico (TSST-1):** es uno de los más potentes

superantígenos de *S. aureus* y está relacionado en humanos con el síndrome de choque tóxico. La enfermedad ocurre cuando la liberación de TSS-1 activa la producción de TNF- α , IL-1 e IL -2. El síndrome de choque tóxico se asocia a elevada mortalidad y morbilidad, afectá comunmente a mujeres durante la menstruación, presentando síntomas sistémicos y gastrointestinales como: fiebre, cefalea, vómito, dolor abdominal, diarrea y mialgias.¹⁵

- **Toxina exfoliativa:** Bioquímicamente es una serinproteasa. Está relacionada con el síndrome de piel escaldada. La toxina destruye la desmogleína-1.¹⁵

Enzimas: lipasa, estafilococinasa, múltiples proteasas (toxina exfoliativa). Su función presuntiva es la de alterar los tejidos e inactivar los mecanismos antimicrobianos del huésped, así como facilitar la diseminación bacteriana.⁷ **Proteínas miscelánea:** proteínas secretadas como: Coagulasa (CoA) y la reciente identificada proteína de unión al factor de von Willebrand (VwBP) la cual promueve la activación no específica de protrombina (**Tabla 1**).⁷

El gen *femA* es característico de los *S. aureus* y su función es la biosíntesis del peptidoglicano, se ha relacionado con la adición de residuos de glicina en la cadena lateral de la pared celular, crucial para la función de PBP2A y la alteracion de este elemento disminuye la expresión de meticilina a pesar de la presencia de PBP2A.⁶

Tabla 1. Factores de virulencia de *S. aureus* implicados en la patogenia

<i>Factores</i>	<i>Gen</i>	<i>Función</i>
Polisacáridos capsulares		
Polisacárido capsular tipo 5	<i>cap5</i>	Antifagocitosis/Fase aguda de la enfermedad
Polisacárido capsular tipo 8	<i>cap8</i>	Antifagocitosis/ Fase aguda de la enfermedad
Proteínas de adhesión		
Proteína de unión a Fibronectina A (FnBPA)	<i>fnbA</i>	Unión a fibronectina y elastina / Adhesión inicial al epitelio, internalización en la célula
Proteína de unión a Fibronectina B (FnBPB)	<i>fnbB</i>	Unión a fibronectina y elastina / Adhesión inicial al epitelio, estimula la fagocitosis

Factor de aglutinación A (ClfA)	<i>clfA</i>	Unión a fibrinógeno/ Inhibe fagocitosis por neutrófilos y macrófagos/Todas las fases de crecimiento. SAMR
Factor de aglutinación B (ClfB)	<i>clfB</i>	Unión a fibrinógeno y citoqueratina 10 (CK10) en células escamosas/ Colonización/Fase exponencial de crecimiento. SAMR
Proteína A (SpA)	<i>spa</i>	Unión a IgG, IgM, vWF/Antifagocitosis, Superantígeno células B. SAMR
Proteína de unión a colágeno	<i>cna</i>	Unión a colágeno tipo 1
Exotoxinas		
-Citotoxina		
α - hemolisina (Hla)	<i>hla</i>	Toxina formadora de poros
Leucocidina de Pantón Valentine (PVL)	<i>lukS, lukF</i>	Toxina formadora de poros
-Superantígenos		
Enterotoxinas (SEA-SEE, SEG)	<i>sea-see, seg</i>	Enterotoxinas, Superantígeno células T/ Intoxicación alimentaria
Toxina 1- Síndrome de choque tóxico (TSST-1)	<i>tst</i>	Superantígeno células T
Toxina exfoliativa A	<i>eta</i>	Serin proteasa / Dermatitis exfoliativa estafilocócica
Toxina exfoliativa B	<i>etb</i>	Serin proteasa/ Dermatitis exfoliativa estafilocócica
-Enzimas extracelulares		
Coagulasa		
Citoplásmico:		
Fem A	<i>femA</i>	Factor citoplásmico

Polisacáridos capsulares, proteínas de adhesión, exotoxinas, enzimas extracelulares y citoplásmicos.^{7, 6, 10, 13, 21,22}

Resistencia antimicrobiana

La principal complicación asociada a las infecciones por *S. aureus* es el nivel de resistencia que adquiere contra múltiples antimicrobianos, lo cual dificulta su tratamiento.²³ Previo al descubrimiento de la penicilina en 1942, el 80% de los pacientes fallecían debido a infección por *S. aureus*; dos años después del descubrimiento de la penicilina se reportaron los primeros casos de *S. aureus* resistente, dada por un plásmido que codifica una β - lactamasa capaz de hidrolizar el anillo β - lactámico e inactivarlo. El gen para β - lactamasa (*blaZ*) es

parte de un elemento móvil que se transfiere por transducción o conjugación y es causante del 90-95% de la resistencia a penicilina en esta especie y de manera adicional se asocia a resistencia a otros antibióticos (gentamicina y eritromicina).^{23,24}

En 1959, se introdujo la metilcilina para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* productor de β -lactamasas y a un año de su introducción emergió el primer aislamiento de SAMR.²³ La resistencia a metilcilina en *S. aureus* no es endógena y se encuentra integrada al cromosoma bacteriano. Está mediada por una proteína transpeptidasa de unión a la penicilina adquirida: PBP2a, codificada por el gen *mecA*, que confiere menor afinidad a los β -lactámicos (penicilina, cefalosporinas) además de resistencia a otros antibióticos (eritromicina) en transposones o copias integradas de plásmidos.^{21, 24} El gen *mecA* se encuentra en el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), un elemento genético móvil que se integra a un sitio específico dentro del cromosoma de *S. aureus* y del que se han descrito 13 tipos (I-XIII).^{21, 23} SAMR de adquisición hospitalaria (HA-SAMR) usualmente es portador de SCC*mec* tipos I, II o III, VIII mientras que los tipos IV, V, VI, VII son más comunes en infecciones comunitarias (CA-SAMR).²¹

De 1950 a 1960 ocurrió una de las pandemias bacterianas más importantes del siglo XX, por una cepa de *S. aureus* resistente a la penicilina, la clona es conocida como fago tipo 81/80 de *S. aureus*, portadora de PVL, que afectó de forma inicial el ámbito hospitalario y posteriormente comunitario. Esta clona se dispersó rápidamente y se reportaron casos en Australia, Londres, Canadá y EE. UU. La clona *S. aureus* fago tipo 81/80 produce varios síndromes incluyendo infecciones en piel (carbúnculos, pústulas), sepsis y neumonía. Estas infecciones fueron de difícil tratamiento debido a la severidad y su resistencia a la penicilina.²⁵

Tipificación mediante secuencia multilocus (MLST)

Es un método basado en la secuencia que permite la asignación de la filogenia ancestral de la población estafilocócica. La técnica consiste en la secuenciación de un total de siete genes constitutivos (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL*) con envío de las secuencias a una base de datos central (ww.mlst.net) que las compara con las secuencias de otras cepas.⁶ La

diferenciación está fundamentada en la diversidad alélica basada en fragmentos internos de genes de aproximadamente 500 pares de bases. Existen miles de secuencias en esta base de datos, lo que ha generado numerosas secuencias tipo (ST). Los microorganismos que comparten los siete alelos son definidos como clonas, los que comparten cinco de siete alelos idénticos son definidos como CC y los que comparten menos de cinco alelos son definidos como no relacionados.⁶

Dado que los genes constitutivos son independientes de los elementos génicos móviles, la MLST permite poner en relación los estafilococos resistentes con sus últimos ancestros comunes. De los siete clones pandémicos mencionados, seis han podido ser puestos en relación con tres cepas ancestrales de *S. aureus* sensible a la meticilina (CC5, CC8 y CC30). Por tanto, la adquisición posterior de elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a los antibióticos o de genes de virulencia facilitó una adaptación adicional a las nuevas condiciones, lo que ha dado lugar a un nuevo patrón correspondiente a microorganismos ancestrales similares.⁶

Existen más de 100 complejos clonales de *S. aureus*. CC1, CC5, CC8, CC9, CC12, CC15, CC22, CC25, CC30, CC45 y CC51 son los que se han asociado principalmente con infección en humanos.^{9,26} Los linajes que han adquirido *mecA* y se han dispersado en ambientes hospitalarios son: CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 y CC239.²⁶ Los linajes que han adquirido *mecA* y se han dispersado en ambientes comunitarios son: CC1, CC8, CC30, CC59 y CC80.²⁶

En úlceras de pie diabético, los SAMS CC5, CC8 y CC15 se han considerado cepas colonizantes con una evolución favorable mientras que el CC45 se ha asociado a peor pronóstico.⁹ Además de que CC45 y CC30 se han asociado a enfermedad grave.⁹

S. aureus CC30 es el linaje principal asociado a portador nasal y a infecciones autólogas; se relaciona a complicaciones hematógenas incluyendo endocarditis, artritis séptica, osteomielitis vertebral; así como a bacteriemia e infección persistente. Las infecciones ocurren a nivel hospitalario en individuos con factores predisponentes, su asociación con bacteriemia sugiere que se adaptan a colonización por tiempo prolongado y persistencia.²⁰

Infecciones osteoarticulares

Las infecciones osteoarticulares (osteomielitis, artritis séptica y osteoartritis) son patologías invasivas graves en la población pediátrica. Tienen elevada morbilidad, especialmente si el tratamiento antimicrobiano no es adecuado y tardío. Con base en algunas series pediátricas los pacientes con osteomielitis requieren esquemas de antibióticos prolongados, larga estancia hospitalaria (promedio 13.5 días), tratamiento quirúrgico (20%) y desarrollan secuelas a largo plazo (2.3%); generando elevados costos hospitalarios.²⁷

Las infecciones osteoarticulares son enfermedades bacterianas invasivas comunes en niños y *S. aureus* es el agente etiológico en el 38-75% de los casos y se ha reportado también como agente asociado a infección de dispositivos implantables del 30-35%.^{25,28,29} Aún con tratamiento óptimo la falla al tratamiento o recurrencias ocurren en el 10-20% de los casos, y estas complicaciones ocurren por la formación de biofilm.³⁰

Weiss y colaboradores al estudiar una cohorte retrospectiva de pacientes con IOA; de 15 días a 18 años, admitidos de 2009 al 2016, en dos hospitales de tercer nivel en Atlanta, observaron que SAMS fue el principal patógeno identificado (45.5%) seguido de (31.2%) de SAMR. En la **(Figura 4)** se muestra que el porcentaje de cultivos positivos de SAMR incrementó de 35.9% en 2009 a 54.5%, en 2016 (< 0.005), lo contrario a lo ocurrido con SAMS el cual disminuyó de 43.6%, en 2009 a 18.2%, en 2016.³¹

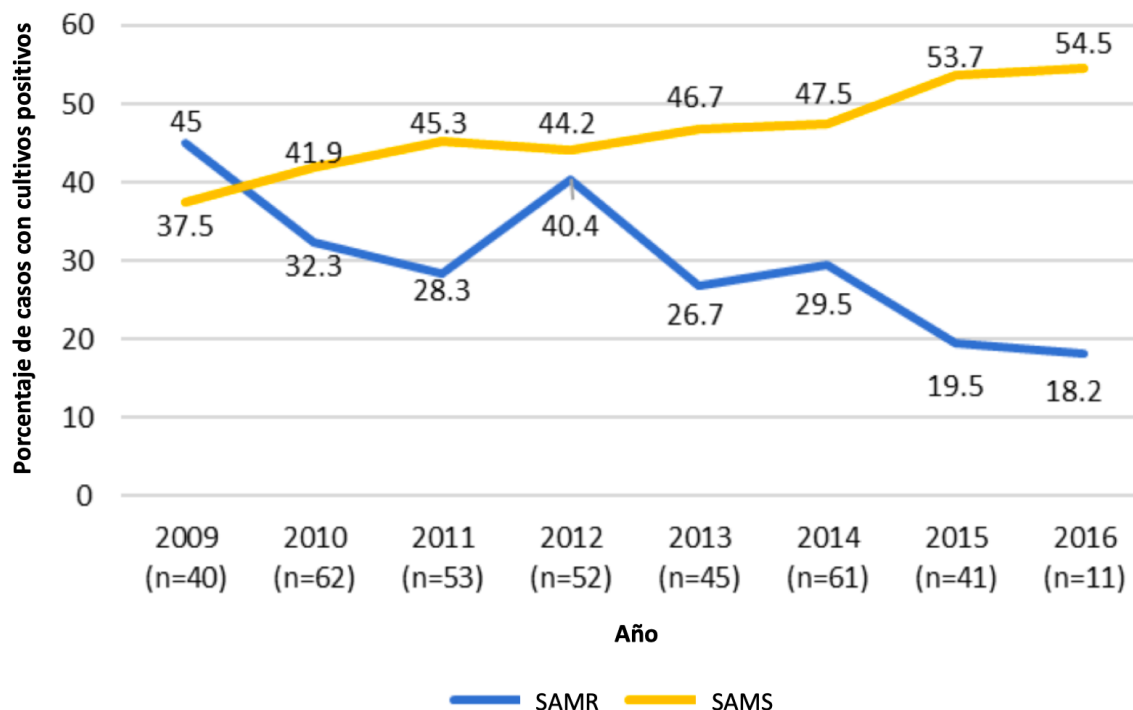


Figura 4. Disminución de la prevalencia de SAMR en osteomielitis y artritis séptica

Incremento en la prevalencia de *S. aureus* metilino sensible (SAMS) y disminución de *S. aureus* metilino resistente (SAMR).³¹

La infección se puede presentar como una inflamación aguda o crónica y se caracteriza por una destrucción progresiva, inflamación y neoformación ósea.²⁸ El tratamiento de osteomielitis incluye antimicrobianos y desbridamiento quirúrgico; hoy en día con el incremento de la resistencia antimicrobiana se ha convertido en una enfermedad difícil de tratar y en ocasiones requiere antibioticoterapia combinada por tiempo prolongado y múltiples intervenciones quirúrgicas.¹⁸

Durante la osteomielitis, *S. aureus* puede sobrevivir en distintos microambientes incluyendo hueso necrótico (sequestro), abscesos, periostio de hueso intacto o en el sistema canalicular. Además del nicho preciso en el hueso, *S. aureus* existe en estructuras multicelulares, conocida como microcolonias, donde *S. aureus* puede adaptarse y responder a las fluctuaciones de la densidad bacteriana.³²

El éxito de *S. aureus* como patógeno oportunista en el tejido óseo ocurre por la capacidad de producir diversos factores de virulencia que le permiten adherirse, invadir los tejidos, evadir la respuesta inmune del huésped y evitar la penetración de los antibióticos a las células.^{22,33} Un número variable de factores de virulencia se han implicado directamente en la patogénesis de la infección ósea incluyendo factores de adherencia como la proteína A (SpA); exoproteínas como PVL; coagulasa (CoA) y hemolisinas.³⁴ Lo anterior sugiere que ciertas cepas de *S. aureus* pueden tener mayor capacidad de producir infección ósea que otras basado en la expresión de factores diversos de virulencia. Sin embargo, lo que permanece desconocido es si la expresión se mantiene en los diferentes tipos de infecciones.²⁹ Por ejemplo, los factores de virulencia en osteomielitis hematógena son considerablemente diferentes a los que se presentan en infecciones posquirúrgicas.²⁹ **(Tabla 2).**

Peacock y colaboradores sugirieron que el tener cierta combinación de genes de virulencia estaba asociado con enfermedad invasiva e incremento de severidad de la infección al estudiar 334 aislamientos de *S. aureus* por PCR, se detectaron siete genes de virulencia, incluyendo los de adhesión (*fnbA*, *cna*), toxigénicos (*eta*, *hla*, *sec*) que están involucrados en la formación de biofilm.³²

La capacidad de *S. aureus* de infectar el hueso, y en específico el osteoblasto, está correlacionado con la unión del componente de la matriz extracelular ósea (BEM) al complejo de adhesinas MSCRAMM, la más estudiada es la Cna que permite la adhesión al colágeno tipo 1, la cual representa el 90-95% del BEM.³²

Las MSCRAMMs se han implicado directamente en la patogénesis de las infecciones osteoarticulares.³⁵ Estos componentes, que específicamente reconocen e interactúan con la matriz extracelular del huésped y las proteínas plasmáticas, han mostrado tener un rol crucial en el desarrollo de osteomielitis.⁶¹ ClfA predominó en SAMS.³⁵ La expresión de factores de unión a fibrinógeno potencian la inducción de inflamación localizada en las articulaciones y contribuyen a las lesiones erosivas en el cartílago y el hueso.³⁶

Tabla 2. Factores de virulencia de *S. aureus* en infecciones osteoarticulares

Factores	Función	Artritis séptica	Osteomielitis	Biofilm
Proteínas de adhesión				
<i>Proteína de unión a Fibronectina A (FnBPA)</i>	Adhesión a fibrinógeno y elastina e invasión celular	X	X	Formación de biofilm Internalización de <i>S. aureus</i>
<i>Proteína de unión a Fibronectina B (FnBPB)</i>	Adhesión a fibrinógeno y elastina e invasión celular	X	X	Infecciones asociadas a dispositivos ortopédicos Formación de biofilm Internalización de <i>S. aureus</i>
<i>Factor de aglutinación A (ClfA)</i>	Inhibe fagocitosis	X		
<i>Factor de aglutinación B (ClfB)</i>	Unión a fibrinógeno y citoqueratina 10 (CK10) en células escamosas/ Colonización/Fase exponencial de crecimiento. SAMR			
<i>Proteína de unión a colágeno (Cna)</i>	Unión a colágeno del cartílago	X	X	
<i>Proteína A (SpA)</i>	Inhibe fagocitosis Superantígeno células B	X		
Exotoxinas				
-Citotoxina				
<i>α- hemolisina</i>	Toxina formadora de poros	X	X	
<i>Leucocidina de Panton Valentine (PVL)</i>	Toxina formadora de poros	X	X	
-Superantígenos				
<i>Enterotoxinas (SEA-SEE, SEG)</i>	Enterotoxinas, Superantígeno células T/ Intoxicación alimentaria			
<i>Toxina 1- Síndrome de Choque Tóxico (TSS-1)</i>	Superantígeno células T	X		
<i>Toxina exfoliativa A (ETA)</i>	Serin proteasa / Dermatitis exfoliativa estafilocócica			
<i>Toxina exfoliativas B (ETB)</i>	Serin proteasa/ Dermatitis exfoliativa estafilocócica			
Citoplasmico:				
<i>Fem A</i>				

(Proteínas de superficie, polisacáridos capsulares, hemolisisnas y enzimas), genes reguladores y patología implicada.^{7, 6, 10, 21,22, 31, 61}

Polisacáridos capsulares: Las cepas de *S. aureus* que expresan CP5 incrementan la frecuencia y severidad en artritis séptica.²³

La **proteína A** *in vitro*, se ha observado que previene la proliferación de los osteoblastos, induce apoptosis, inhibe la capacidad de mineralización de los osteoblastos e incrementa la resorción ósea durante la osteomielitis por *S. aureus*.

La **Cna** ha demostrado ser importante en la patogénesis de osteomielitis y artritis séptica. *In vitro* se ha observado que todos los aislamientos de pacientes con osteomielitis y artritis séptica lo poseen, a diferencia de la expresión en una tercera parte de los pacientes con infección de tejidos blandos.¹¹ Esta proteína es un iniciador necesario para el desarrollo de osteomielitis y se expresa en la fase de crecimiento exponencial de *S. aureus*, se asocia con la formación de biofilm lo cual puede tener relación con osteomielitis asociadas a dispositivos.²² Cna se ha asociado a 46% de los aislamientos de infecciones osteoarticulares y es la única necesaria para causar daño en el cartílago articular.^{16, 32}

Las **proteínas de unión a fibronectina A y B** son componentes importantes que permiten la internalización de *S. aureus* por células no fagocíticas y en modelos animales se ha observado, que esto ocurre en los osteoblastos.¹³ La internalización de *S. aureus* por los osteoblastos es un elemento clave en la diseminación de la infección, ya que le permite persistir dentro de estos de 5-7 días (protegido del sistema inmune) y brinda la oportunidad a *S. aureus* de mantener la infección.^{13,22,38} En los aislamientos clínicos obtenidos de infecciones óseas, los genes *fnbA* y *fnbB* se han reportado en 98% y 99%, respectivamente y se han asociado con mayor virulencia (> producción de IL-6) en osteomielitis.³² Las FnBP contribuyen a inflamación sistémica caracterizada por pérdida de peso, IL-6 y mortalidad.³⁶ Finalmente, son factores importantes en la formación de biofilm y en la fase aguda de la enfermedad.^{13, 16} No se ha observado que afecte las articulaciones en los distintos modelos experimentales.³⁶

Las enterotoxinas estafilococcicas son un grupo de siete proteínas (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE). Existe una similitud en la secuencia de DNA entre ellas del 75-99% con

la excepción de SED la cual tiene 55% de similitud.¹¹ Actúan como superantígenos y la patogenesis en las infecciones osteoarticulares no es clara.¹¹ En un estudio realizado por Sourek y colaboradores, se estudiaron 264 cepas de *S. aureus* de pacientes con osteomielitis crónica y se identificó en el 30% una o más enterotoxinas de ahí que no se considere un factor patogénico mayor.¹¹

La **TSST-1** tiene importancia en artritis séptica.¹¹ Este superantígeno ha mostrado un papel potencial en úlceras diabéticas, a pesar de que su presencia es baja, se encuentra en mayor número en úlceras que en osteomielitis asociada a diabetes.^{33,37}

La **α -hemolisina (Hla)** Basado en estudios *in vitro*, se presume que la producción de estas citocinas pro-inflamatorias contribuyen al daño tisular en el hueso y músculo.³⁹ Adicionalmente, durante la infección por *S. aureus*, existe un incremento sistémico de la IL-6 dependiente de Hla, conocido por la activación de osteoclastos.³⁹ Por lo tanto, la IL-6 origina una gran cantidad de resorción ósea, se ha implicado como una potente toxina en el condrocito, causando muerte del cartilago particularmente durante la artritis séptica.³⁹ Hla se ha implicado como una toxina potente para el condrocito y origina una muerte rápida para estas células en el cartílago articular.³⁹

El papel sinérgico y secuencial de Hla y PVL se han observado en modelos animales, reflejando la complejidad de la patogénesis de *S. aureus*.⁴⁰ *In vitro* Hla y la proteína A tienen un pico máximo de expresión de 4 h posterior a la infección, mientras que el pico de PVL ocurre 72 hs posinoculación, debido a que la mayoría de los estudios experimentales de sepsis son agudos con una media de supervivencia menor a cuatro días, la contribución secuencial de los factores de virulencia son difícil de estudiar en esos modelos.⁴⁰

Hla puede contribuir a las manifestaciones sistémicas de la infección y tiene un impacto directo en la mortalidad, mientras que la función de PVL es menor durante la fase aguda bacteriémica de la enfermedad y podría ser causante de lesión localizada tardía como la observada en los abscesos óseos.⁴⁰

Coagulasa: *S. aureus* produce tres coagulasas ClfA, Coa y Wbp; estas enzimas se unen y activan protrombina para convertir fibrinógeno en fibrina. En el hueso inhiben la proliferación e induce apoptosis de los osteoblastos.³⁹ ClfA y ClfB inducen inflamación localizada y contribuyen a la erosión del cartilago y el hueso. Se asocian a la patogenia de artritis séptica.³⁹

Otra característica, es la capacidad de *S. aureus* de cambiar de forma dinámica a variantes de colonias pequeñas (SCVs) con distintas características fenotípicas que se adaptan a los cambios del microambiente en el hueso y tejido blando adyacente siendo este, el mecanismo clave que origina la persistencia de *S. aureus* en un huésped con infección crónica.¹⁸

Se ha observado que los pacientes con osteomielitis aguda tienen poblaciones homogéneas de *S. aureus* en muestras clínicas de múltiples sitios. Controversialmente, una mayor población heterogénea de *S. aureus* compuesta por SCVs se ha encontrado en muestras de múltiples sitios de un mismo paciente con osteomielitis crónica, sugiriendo la necesidad de realizar guías adecuadas para el diagnóstico bacteriológico en osteomielitis (lo anterior, plantea la hipótesis de tomar más de una muestra de tejido infectado del mismo paciente).²¹ Por lo tanto, en función de seleccionar un tratamiento antimicrobiano apropiado para un paciente con osteomielitis crónica, se deben de realizar pruebas de susceptibilidad en los aislamientos representativos de cada muestra realizada con cultivo positivo para *S. aureus*.²¹

Otros estudios experimentales han demostrado que *S. aureus* con PVL, CoA y SpA inhibe la proliferación de los osteoblastos, induce apoptosis, inhibe la expresión de las proteínas asociadas con la osteogénesis (colágeno 1, osteopontina y osteocalcina) y evita la mineralización ósea.⁴¹

Varios estudios han reportado la asociación entre la producción de la toxina PVL e infecciones óseas y de tejidos blandos en pacientes pediátricos inmunocompetentes,¹⁸ todo lo anterior encontrado en la mayoría de los casos en asociación con SAMR, implicando que PVL es un marcador epidemiológico de síndrome de infección grave (bacteriemia, respuesta inflamatoria sistémica e ingreso a la UTIP).⁴² En algunos países esto ha provocado que se realicen medidas de salud pública para los pacientes infectados con cepas PVL positivo,

como: terapia de descolonización, detección de portadores en los contactos, adecuada higiene de manos, desinfectar las superficies y precauciones de contacto.^{18, 30}

Finalmente, las diferencias fenotípicas en múltiples aislamientos de *S. aureus* de un paciente con osteomielitis tiene relevancia en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.⁵ La presencia de poblaciones heterogéneas de *S. aureus* en las infecciones crónicas plantea la hipótesis de utilizar tratamiento combinado en osteomielitis crónicas según los patrones de resistencia identificados o inclusive independientemente del patrón de resistencia a meticilina; ya que actualmente las guías de tratamiento para osteomielitis recomiendan la terapia combinada ante la presencia de SAMR.²⁹

Estrategias de evasión inmune y persistencia en osteomielitis

Existen cuatro mecanismos inmunológicos de la persistencia de *S. aureus* en el contexto de osteomielitis. 1) formación de absceso 2) biofilm 3) invasión del sistema osteocito lacuno-canalicular (OLCN) del hueso 4) colonización intracelular.⁴¹ (**Figura 5**).

En poco tiempo la bacteria puede evadir el ataque del sistema inmune innato y sobrevivir en abscesos localizados en la médula ósea y los tejidos blandos. En la progresión de la infección aguda del hueso, el tejido se desvasculariza y secuestra la infección para aislarse del tejido sano. El tejido secuestrado se convierte en la persistencia de la bacteria en forma de biofilm y con el OLCN del hueso. Finalmente, la internalización es un mecanismo adicional de la persistencia en osteomielitis.

En conjunto estos mecanismos de defensa adaptativos permiten al *S. aureus* infectar crónicamente el hueso a pesar de los esfuerzos por la erradicación.⁴¹

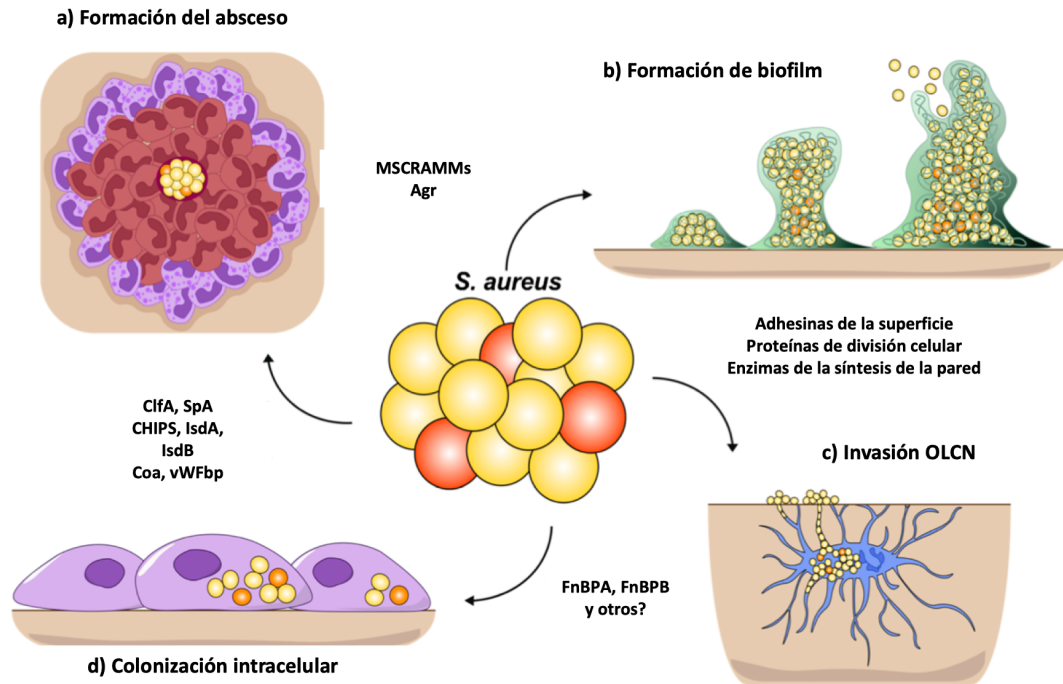


Figura 5. Mecanismos inmunológicos de la persistencia de *S. aureus* en el contexto de osteomielitis.

1) Formación de absceso, 2) Formación de biofilm, 3) Invasión del sistema osteocito lacuno-canalicular (OLCN) del hueso. 4) Colonización intracelular. Proteínas proinflamatorias acarreadoras de hierro (IsdB, IsdA, IsdH) Coagulasa (Coa), Factor von Willebrand (WFbp).⁴¹

a) Fases para la formación de abscesos: **Adhesión** mediante la expresión de MSCRAMMs los cuales facilitan la unión a fibrina o fibrinógeno permitiendo la agregación de colonias de *S. aureus* resistentes a la fagocitosis. **Inflamación:** expresión de proteínas proinflamatorias acarreadoras de hierro (IsdB, IsdA, IsdH). **Maduración:** expresión de SpA, Emp, Coagulasa (Coa), Factor von Willebrand (vWFbp) permiten la formación de la capa protectora de fibrina “pseudocapsula”. **Persistencia:** con la posterior diseminación de *S. aureus* a nuevos sitios.⁴¹

b) Fases para la formación de biofilm: Inicia con la adhesión mediada por las MSCRAMMs, lo cual estimula a la síntesis de sustancias que previenen el ataque del sistema inmune, favorecen la adhesión, provee estabilidad mecánica y retiene nutrientes esenciales y

enzimas. *S. aureus* activa el sistema del gen regulador accesorio (*agr*) el cual permite la expresión de factores de virulencia.⁴¹

c) Invasión del sistema osteocito lacuno- canalicular (OLCN) del hueso: da protección del ataque del sistema inmune, permite la supervivencia de la bacteria por años y podría ser un factor de falla al debridamiento quirúrgico de un hueso infectado.⁴¹

d) Colonización intracelular: Se ha descrito que *S. aureus* se internaliza por la unión a FnBPA y FnBPB a la $\alpha 5\beta 1$ integrinas. (**Figura 6**). Este proceso se ha descrito *in vitro* en osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. La persistencia intracelular es un mecanismo de evasión inmune y protege del tratamiento con antimicrobianos.⁴¹

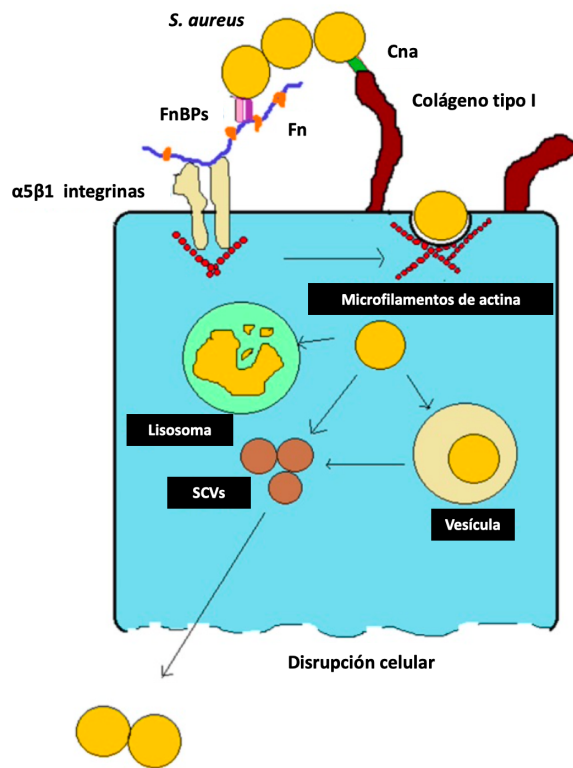


Figura 6. Internalización de *S. aureus* dentro de los osteoblastos

La internalización de *S. aureus* dentro de los osteoblastos representa un reto en el tratamiento de osteomielitis.⁴³ En la primera etapa de la infección, las proteínas MSCRAMMs son antígenos potenciales que pueden ser utilizados para el desarrollo de vacunas contra la infección de *S. aureus*.⁴³

La capacidad de que el antibiótico recomendado elimine a *S. aureus* intracelular es la pieza clave para el tratamiento.⁴³ En este contexto, estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento con gentamicina, vancomicina o daptomicina disminuye el número de bacterias en los osteoblastos, sin la erradicación total del microorganismo contrario a esto, la rifampicina, cloranfenicol y clindamicina son los antibióticos más activos a nivel intracelular.^{43,44} La mayoría de los antibióticos utilizados en la actualidad son inactivos a nivel intracelular (lincomicina) o son incapaces de penetrar a las células (penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos).⁴⁵ Sin embargo, ante la presencia de una cápsula polisacárida gruesa, son resistentes a la rifampicina (por lo que siempre se recomienda utilizarla como terapia combinada). Los antibióticos como teicoplanina, tigeciclina, dicloxacina y linezolid tienen una efectividad intermedia a nivel intracelular.⁴⁵ Todos estos estudios muestran la importancia de la penetración intraosteoblástica de los antibióticos siendo esta propiedad esencial para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para osteomielitis.²²

Planteamiento del problema

S. aureus es el microorganismo más virulento de las especies de estafilococos y es el agente causal en el 38-75% de los casos de osteomielitis en pediatría además se ha asociado a infección de dispositivos implantables en el 30-35%. El éxito de *S. aureus* como patógeno oportunista en el tejido óseo ocurre por la capacidad de producir diversos factores de virulencia que le permiten adherir, invadir los tejidos, evadir la respuesta inmune del huésped y evitar la penetración de los antibióticos a las células. Con base en estudios experimentales un número variable de factores de virulencia se han implicado directamente en la patogénesis de la infección ósea incluyendo: factores de adherencia como la proteína A (SpA), exoproteínas como PVL, coagulasa (CoA), y hemolisinas. Lo anterior sugiere que ciertas cepas de *S. aureus* pueden tener mayor capacidad de producir infección ósea que otras basadas en la expresión de diversos factores de virulencia, por otra parte, estas diferencias convierten a estas infecciones en un reto terapéutico debido a la resistencia a antibióticos, persistencia de la infección en los osteoblastos y a la formación de variantes patogénicas.

En México y en el INP, no existen datos disponibles sobre la epidemiología de *S. aureus* y

sus factores de virulencia en las infecciones osteoarticulares en pediatría. En el INP, en el departamento de patología se reportaron con diagnóstico de osteomielitis por biopsia, los siguientes números de pacientes: **2018** (11), **2017** (13), **2016** (8), **2015** (2) y **2014** (4). Por expediente electrónico se encuentran 137 pacientes con diagnóstico de osteomielitis del 2007-2018.

Justificación

En el INP que es un hospital de tercer nivel, centro de referencia del país de infecciones osteoarticulares y que cuenta con los departamentos de Infectología y Ortopedia, no se conoce la frecuencia de *S. aureus* como agente causal de las infecciones osteoarticulares; por lo que este estudio permitirá conocer las características fenotípicas y moleculares de los aislamientos de *S. aureus* en las infecciones osteoarticulares en pediatría.

Por otro lado permitirá detectar y administrar de forma temprana tratamiento antimicrobiano según los patrones de resistencia y factores de virulencia, con la finalidad de disminuir la elevada morbilidad asociada.

Hipótesis

S. aureus metilcilino sensible con PVL será el patógeno más frecuente responsable de las infecciones osteoarticulares en pacientes pediátricos.

Objetivos

General

- Caracterizar molecularmente los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de muestras de infecciones osteoarticulares en pacientes pediátricos.

Específicos

- Describir las manifestaciones clínicas y tratamiento de los pacientes con infecciones osteoarticulares por *S. aureus*.
- Describir la frecuencia de *S. aureus* como agente causal de las infecciones osteoarticulares.

- Determinar el perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *S. aureus*.
- Identificar los factores de virulencia de las cepas de *S. aureus*.
- Clasificar los complejos clonales de las cepas de *S. aureus*.

Material y métodos

- **Diseño del estudio:** Estudio descriptivo, observacional, transversal, y prospectivo.
- **Población objetivo:** Pacientes pediátricos con diagnóstico de infección osteoarticular.
- **Población elegible:** Pacientes hospitalizados en el INP de enero 2019 a diciembre 2020.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Pacientes menores de 17 años, de género femenino o masculino.
- Hospitalizados en el INP con diagnóstico de infección osteoarticular.
- Pacientes que contaron con el consentimiento informado por parte del padre o madre o tutor.

Criterios de exclusión

- Pacientes a los que por cualquier motivo no se les pudo tomar las muestras biológicas respectivas para el análisis.
- Pacientes cuyo padre y madre o tutor decidió retirar al paciente del estudio.

Variables del estudio

- En el **anexo 1** se presentan las variables que fueron analizadas en el estudio.

Muestreo y tamaño de muestra

- La muestra fue a conveniencia, se incluyeron todos los individuos hospitalizados que cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo del estudio. Este protocolo fue aprobado por los comites de ética, bioseguridad e investigación en el Instituto Nacional de Pediatría con el registro 2019/007.

Se integró un grupo interdisciplinario para la detección de pacientes con infecciones osteoarticulares conformado por personal adscrito al INP de los siguientes servicios: Departamento de Infectología Pediátrica (DIP), Traumatología y Ortopedia (TyO) y el Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM). A continuación, se describen las actividades de cada uno de los integrantes en cada una de las etapas.

- **Etapla I. Detección de infecciones osteoarticulares**

Como parte del cuidado estándar, el DIP detectó los pacientes con sospecha de infección osteoarticular en el servicio de urgencias, se valoró por parte del DIP y el servicio de TyO; si fue requerido que el paciente ingresará a quirófano se realizó la solicitud del consentimiento informado y asentimiento en pacientes mayores de 12 años, para su inclusión en el proyecto.

- **Etapla II. Diagnóstico**

Si el padre, madre o tutor consintieron la inclusión de su hijo, adicional a las muestras microbiológicas del diagnóstico de rutina (**Tabla 3**), se tomó una muestra de 1 mL de secreción y/o exudado y se envió al LMM. El responsable del DIP colectó las variables clínicas y diagnósticas. El servicio de TyO fue el responsable de realizar el procedimiento quirúrgico y el DIP de garantizarla calidad de la toma de muestra de secreción.

Tabla 3. Estudios solicitados a los pacientes con infección osteoarticular

Estudio	Laboratorio	Muestra	Volumen (mL)
1. Hemocultivo anerobios	LBC	Secreción	3
2. Cultivo de secreción	LBC	Secreción	1
3. PCR para <i>S. aureus</i>	LV	Secreción	Hisopado
4. Diagnóstico de patología	Patología	Secreción y hueso	1
5. Caracterización *	LMM	Secreción	1

*1-4: Muestras de cuidado estándar, 5: Muestra adicionales del proyecto de investigación. LBC: Laboratorio de Bacteriología Clínica, LV: Laboratorio de Virología, LMM: Laboratorio de Microbiología Molecular. PCR Reacción en cadena de la polimerasa.

El LMM recibió la muestra y se analizó como se describe en el apartado Tipificación Molecular, los hallazgos fueron informados al DIP y al servicio de TyO.

Identificación de las cepas a partir de la muestra de secreción

En el LMM se recibió una muestra de 1 mL de secreción , exudado y/o hueso de infección osteoarticular transportado en tubo estéril en refrigeración, el cual fue colectado durante procedimiento quirúrgico abierto en el caso de osteomielitis y/o exudado articular en artritis séptica. Se asignó una clave en la bitácora Proyecto de infecciones osteoarticulares. La clave estuvo formada por las letras O- y el número consecutivo que le correspondía.

Las muestras se sembraron en placas de agar sal y manitol (ASM), caldo Infusión Cerebro corazón (BHI) y Agar Soya Tripticasa (TSA) por la técnica de estría cruzada y fueron incubadas a 37 °C durante 18-24 h. Finalizado el periodo de incubación una colonia se seleccionó para realizar una tinción de Gram y prueba de catalasa, posteriormente fueron conservados a -70°C.

Confirmación de resistencia a cefoxitina y otros antimicrobianos

A partir del cultivo se realizó una suspensión bacteriana en solución salina isotónica al 0.5 de la escala de McFarland. Esta suspensión se sembró en una placa de agar Mueller Hinton (AMH) y fueron colocados sensidiscos de cefoxitina (FOX), clindamicina (CC), gentamicina (GM), eritromicina (E), Trimetroprima Sulfametoxazol (TMP/SX), ciprofloxacino (CIP) y linezolid (LZD). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera aeróbica de 16-18 h. Una vez finalizada la incubación, se midieron los halos y fueron interpretados y categorizados siguiendo los lineamientos del CLSI 2020.⁷

En cuanto a la susceptibilidad a vancomicina (VA) y teicoplanina (TEI) se recopilaron los datos del expediente médico electrónico.

(Tabla 4).

Tabla 4. Valores de interpretación para la susceptibilidad de *S. aureus*

Tipificación molecular a partir de la muestra de secreción

Extracción de DNA del aislamiento de *S. aureus*

Antimicrobia	Contenido	Abreviatura	Sensible	Intermedio	Resistente
no					
Cefoxitina	30 µg	FOX	≥22	-	≤21
Linezolid	20 µg	LZD	≥21	-	≤20
Gentamicina	10 µg	GM	≥15	13-14	≤12
Eritromicina	15 µg	E	≥23	14-22	≤13
Ciprofloxacina	5 µg	CIP	≥21	16-20	≤15
Clindamicina	2 µg	CC	≥21	15-20	≤14
Trimetoprima	1.25 /23.75µg	STX	≥16	11-15	≤10
Sulfametoxazol					
Vancomicina	CMI µg/mL	VA	≤2	4-8	≥16
Teicoplanina	CMI µg/mL	TE	≤4	8-16	>32

CMI: Concentración mínima inhibitoria

A partir de cultivo puro se seleccionarán cinco colonias de cada aislamiento y se realizó la extracción DNA utilizando el kit QIAGEN. El DNA se conservó a -20°C hasta su uso.

Amplificación de los genes 16S rRNA, *nuc*, *mecA*, *pvl*, *hla*, *fnbA*, *fnbB*, *cna*, *tst*, *fem A*, *clfA*, *clfB*, *SpA*, *eta*, *etb* y *sec*

En cada uno de los aislamientos de *S. aureus* se detectaron 16 genes de *S. aureus*: dos para confirmar identidad (*nuc* y 16S rRNA)²⁰, uno para confirmar resistencia a β-lactámicos (*mecA*), también los genes relacionados con la resistencia a macrólidos, lincosamida y estreptogramina B (*ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA*) y 13 genes de virulencia incluyendo los de adhesión (*fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *spa*), invasión (*hla*, *pvl*), toxigénicos (*eta*, *etb*, *sec*), super antígenos (*tst*) y *femA*.

El gen 16S rRNA se amplificó y analizó como se describió en el apartado de tipificación molecular con la finalidad de confirmar la especie. Los genes *nuc*, *mecA*, *pvl*, *hla*, *spa*, *fnbA*, *fnbB*, *cna*, *tst*, *femA*, *femB*, *clfA*, *clfB*, *eta* y *sec* se amplificaron con iniciadores reportados por Azimian A y colaboradores (2012) (**Tabla 5**). La identificación de estos genes se llevó a cabo a través de PCR punto final. Para la mezcla de reacción se utilizó 21 µL de agua, 25 µL de AmpliTaq Gold® 360 Master Mix, 0.5mM de cada iniciador y 1 µL DNA, para alcanzar un volumen final de 50 µL. La reacción se realizó en un termociclador AB9700 con las siguientes condiciones: 95°C- 2 min, 30 ciclos formados por 95°C-30 s, 50°C (*cna*) (*fnbA*) (*spa*)(*tst*) 51°C (*clfB*) 52°C (*hla*) (*clfA*) (*fnbB*) 52°C (*sec*) 53°C (*femA*) 54°C (*eta*) 55°C (*etb*) 58°C (*pvl*) 60°C (*mecA*) -30s , 72°C- 45s y una extensión final de 72°C-7 min. 95°C- 2 min, 30 ciclos formados por 94°C-30 s, 57°C (*nuc*) -30s, 72°C- 30s y una extensión final de 72°C- 10 min.

Los productos se analizaron a través de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TE 1X a 100V por 30 min. Posteriormente, se revelaron en un fotodocumentador con luz UV.

Tabla 5. Iniciadores utilizados para la detección de genes de virulencia de *S. aureus*

Nombre	Secuencia de iniciador (5' → 3')	Tamaño
<i>spa</i> directo	TAG TST TGC AAT ACA TAA TTC G	1519 pb
<i>spa</i> reverso	TAT AGT TCG CGA CGA CGT C	
<i>hla</i> directo	CGG TAC TAC AGA TAT TGG AAG C	744 pb
<i>hla</i> reverso	TGG TAA TCA TCA CGA ACT CG	
<i>tst</i> 1 directo	TTA TCG TAA GCC CTT TGT TG	398 pb
<i>tst1</i> reverso	TAA AGG TAG TTC TAT TGG AGT AGG	
<i>sec</i> directo	GGG AAT GTT GGA TGA AGG	900 pb
<i>sec</i> reverso	AGG CAA GCA CCG AAG TAC	
<i>femA</i> directo	CTT ACT TAC TGC TGT ACC TG	648 pb
<i>femA</i> reverso	ATC TCG CTT GTT GTG TGC	
<i>eta</i> directo	GCA GGT GTT GAT TTA GCA TT	93 pb
<i>eta</i> reverso	AGA TGT CCC TAT TTT TGC TG	
<i>etb</i> directo	ACA AGC AAA AGA ATA CAG CG	226 pb
<i>etb</i> reverso	GTT TTT GGC TGC TTC TCT TG	
<i>fnbA</i> directo	CAC AAC CAG CAA ATA TAG	1362 pb
<i>fnbA</i> reverso	CTG TGT GGT AAT CAA TGT C	

<i>fnbB</i> directo	GGA GAA GGA ATT AAG GCG	813 pb
<i>fnbB</i> reverso	GCC GTC GCC TTG AGC GT	
<i>clfA</i> directo	GTA GGT ACG TTA ATC GGT T	1581 pb
<i>clfA</i> reverso	CTC ATC AGG TTG TTC AGG	
<i>clfB</i> directo	TGC AAG ATC AAA CTG TTC CT	596 pb
<i>clfB</i> reverso	TGC AAG ATC AAA TAA AGG TA	
<i>cna</i> directo	AGT GGT TAC TAA TAC TG	1178 pb
<i>cna</i> reverso	CAG GAT AGA TTG GTT TA	

Modificado de Boye *et al.*, 2007 ⁶²

Detección de SCCmec

Para la determinación del SCCmec se utilizaron iniciadores reportados por Boye y colaboradores (2007), la identificación de estos genes se llevó a cabo a través de PCR multiplex. Los iniciadores utilizados se presentan en la **(Tabla 6)**. Para la mezcla de reacción se utilizaron 44 µL de agua, 75 µL de AmpliTaq Gold® 360 Master Mix, 1µL B, 1µL α3, 1.25µL ccrCF, 1.25µL ccrCR, 0.4 µL 1272F1, 0.4 µL 1272R1, 0.5 µL 5RmecA, ,0.5 µL 5R431. La reacción se realizó en un termociclador AB9700 con las siguientes condiciones: 95°C- 2 min, 30 ciclos formados por 94°C-30 s, 55°C -30s, 72°C- 1 min y una extensión final de 72°C-7 min. Los productos se analizaron a través de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TE 1X a 100V por 30 min. Posteriormente, se revelaron en un fotodocumentador con luz UV.

Tabla 6. Iniciadores utilizados en la mPCR para la detección de SCCmec

Nombre	Secuencia de iniciador (5'→ 3')	Tamaño	Blanco	Tipo SCCmec				
				I	II	III	IV	V
B	ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT	937 pb	<i>ccrA2-B</i>		X	X		
α3	TAAAGGCATCAATGCACAAACT							
ccrCF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT	518 pb	<i>ccrC</i>			X	X	
ccrCR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT							
1272F1	GCCACTCATAACATATGGAA	415 pb	IS1272	X		X		
1272R1	CATCCGAGTGAAACCCAAA							
5RmecA	TATACCAAACCCGACAACACTAC	359 pb	<i>mecA</i> - IS431					X
5R431	CGGCTACAGTGATAACATCC							

Modificado de Boye *et al.*, 2007 ⁶²

Determinación del complejo clonal

Para la determinación del complejo clonal se utilizaron iniciadores reportados por Cockfield y colaboradores (2007). La identificación de estos genes se llevó a cabo a través de PCR multiplex. Los iniciadores utilizados se presentan en la **(Tabla 7)**, esta técnica permitió detectar la presencia de seis CC: CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45. Para las mezclas de reacción se utilizaron 9 µL de agua, 12.5 µL de AmpliTaq Gold® 360 Master Mix, y 0.5µL de AF, AR30, ARR 22 (mezcla 1), 0.5µL de AF, AR45, AR1 (mezcla 2), 0.5µL de BF, BR8, BR 5 (mezcla 3). La reacción se realizó en un termociclador AB9700 con las siguientes condiciones: 95°C- 2 min, 30 ciclos formados por 95°C-30 s, 55°C -30s, 72°C- 90 seg y una extensión final de 72°C-7 min.

Las cepas ATCC que se utilizaron como control positivo para los resultados fueron las siguientes: ATCC -25923 *S. aureus*, BAA-2094 *S. aureus*, BAAA-41 *S. aureus*, BAA-2313 *S. aureus*, BAA-44 *S. aureus*, BAA-1683 *S. aureus*, ATCC-33592 *S. aureus* y BAA-42 *S. aureus*.

Tabla 7. Iniciadores utilizados para la detección de complejos clonales

Nombre	Secuencia
AF	5' AGGGTTTGAAGGCGAATGGG 3'
AR30	5' CAACAGAATAATTTTTTAGTTC 3'
AR22	5' TCAGAGCTCAACAATGATGC 3'
AR45	5' GGAGCATTATCTGGTGTTC 3'
AR1	5' GGGTTGCTCCTTGCATCATA 3'
BF	5' CCCAAAGGTGGAAGTGAAA 3'
BR8	5' CCAGTTGCACCATAGTAAGGGTA 3'
BR5	5' TCGTCCGACTTTTGAAGATTG 3'

Modificado de Cockfield *et al.*, 2007.³⁶

Los productos se analizaron a través de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TE 1X a 100V por 30 min. Posteriormente, se revelaron en un fotodocumentador con luz UV y se identificaron los complejos clonales según el tamaño de los productosde PCR **(Tabla 8)**.

Tabla 8. Tamaño esperado de los amplicones de los CC.

Complejo clonal	Predicción del tamaño de los productos de PCR (pb)		
	Iniciadores AF, AR30, AR22	Iniciadores AF, AR45, AR1	Iniciadores BF, BR8, BR5
CC1		1037	680
CC5			1071
CC8			680
CC22	990		
CC30	203		
CC45		722	

Modificado de Cockfield *et al.*, 2007.³⁶

Determinación de ST

Se amplificaron y se secuenciaron siete genes constitutivos: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiI*. El análisis de estas secuencias se realizó en el sitio <https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>

Análisis estadístico

Como resumen descriptivo de las variables se reportó frecuencia absoluta y relativa con las variables cualitativas y medidas de tendencia central, dispersión (media y desviación estándar o mediana y rango intercuartil, de acuerdo con la forma de distribución observada) en caso de variables cuantitativas.

Las prevalencias y la proporción de positividad estimada se reportaron con el intervalo de confianza de 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron por el uso estadístico comercial SPSSv27.

Resultados

Frecuencia de *S. aureus* como agente causal de las infecciones osteoarticulares

Durante el periodo de estudio, 71 niños ingresaron al INP por sospecha de infección osteoarticular y en 54 casos se confirmó el diagnóstico mediante exámenes de laboratorio y gabinete. Los 17 pacientes excluidos presentaron infección de tejidos blandos, enfermedad inmunológica, oncológica, fractura y bursitis.

En 22 (40.7%) casos se identificó a *S. aureus* de los cuales dos, fueron excluidos por no contar con muestra microbiológica para su análisis (**Figura 7**).

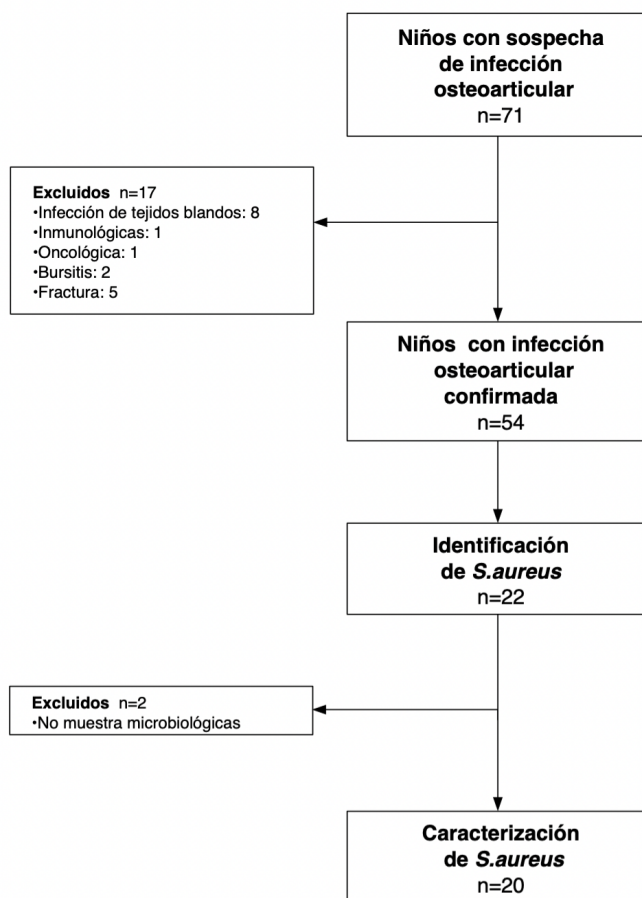


Figura 7 Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes con infección osteoarticular.

En 50 (92%) pacientes con infección osteoarticular se obtuvo muestra de secreción para su estudio microbiológico. Se obtuvo aislamiento en 40 (80%) de los cuales 10 (25%) fueron polimicrobianos.

El género *Staphylococcus* fue el principal y se identificaron 25 aislamientos: SAMS (n=21), *S. epidermidis* (n=3) y SAMR (n=1). El género *Enterococcus* se identificó en nueve muestras predominando *Enterococcus faecium* (n=6) y *Enterococcus faecalis* (n=3). Las

enterobacterias ocuparon el tercer lugar de frecuencia con siete aislamientos: *Escherichia coli. coli* (n= 1), *E. coli* con beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE, n=2), *Klebsiella* spp. BLEE (n=2), *P. mirabilis* (n= 1) y *Serratia. marcescens* (n= 1). Se aislaron tres microorganismos anaerobios: *Clostridium perfringens*, *Bacteroides tectus* y *Pasteurella multocida*. Los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) se recuperaron de dos muestras: *Acinetobacter* spp. (n= 1) y *Pseudomonas aeruginosa* (n= 1). Otros microorganismos identificados fueron *Streptococcus agalactiae* (n= 1), *Streptococcus pyogenes* (n= 1) y *Mycobacterium tuberculosis* (n= 1) (**Figura 8**).

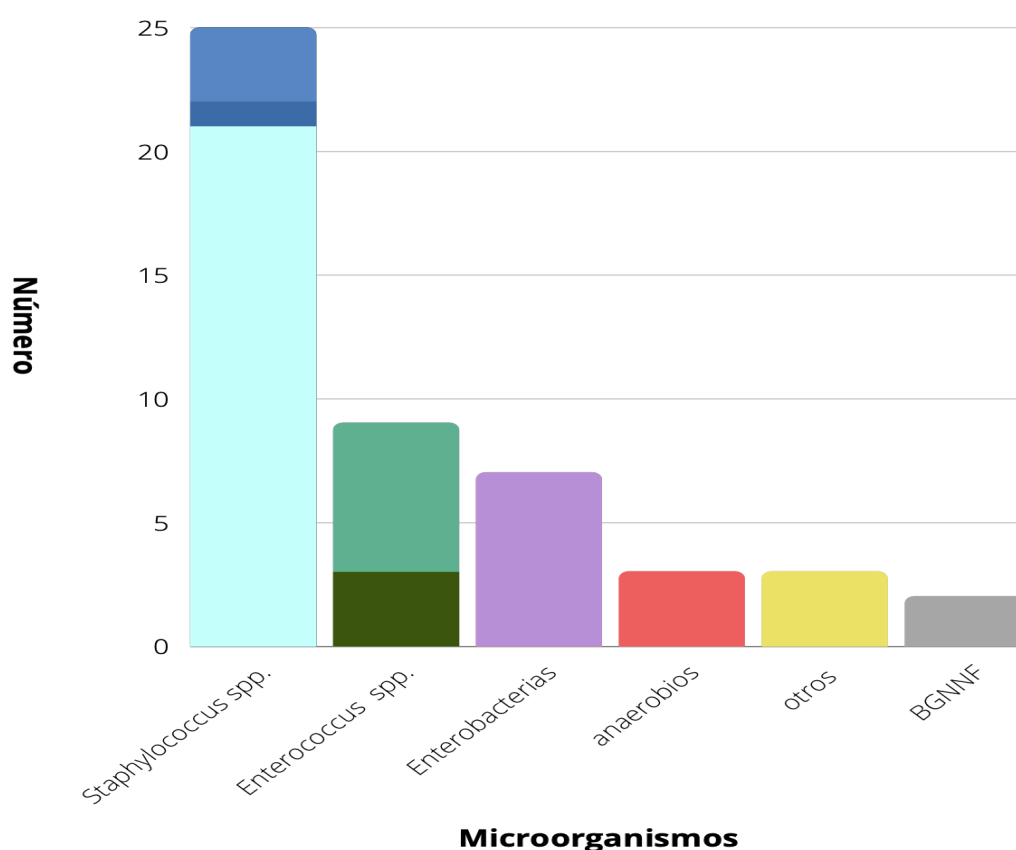


Figura 8. Distribución de los aislamientos de pacientes con infecciones osteoarticulares.

Genero *Staphylococcus* spp.: 25 (*S. aureus* meticilino sensible, 21; *S. aureus* meticilino resistente, 1; *S. epidermidis*, 3) *Enterococcus* spp: 9 (*E. faecium*;6, *E faecalis*; 3), enterobacterias: 7 (*E. coli*,1; *E. coli* BLEE, 1; *Klebsiella* spp. BLEE, 2; *P. mirabilis*,1 y *S. marcescences*,1). anaerobios: 3 (*C. perfringers*;1, *B. tectus*; 1, *P multocida*;1), BGNNF: Bacilos Gram negativos no fermentadores, 2 (*Acinetobacter* spp., 1 y *P. aeruginosa*, 1); otros: 3 (*S. agalactiae*, 1; *S. pyogenes*,1 y *M. tuberculosis*, 1).

Características demográficas

Las características demográficas de los pacientes se describen en la **Tabla 9**. La distribución en esta serie fue de 11 (55%) hombres y nueve (45%) mujeres. La mediana de edad fue de 13 años con un rango de (3- 17 años). Por grupo etario existió un predominio en el grupo de adolescentes (12-18 años), seguido de escolares (6-12 años) y preescolares (2-5 años). La mayoría de los pacientes fueron previamente sanos 10 (50%) y el resto tenían comorbilidades; genética, cinco (25%); ortopédica, tres (15%); neurológica y hematológica en un caso (5%), respectivamente.

La mayoría de los pacientes fueron originarios de la Ciudad de México (n=8.40%) seguido del Estado de México (n=5.25%), Guerrero (n=3,15%), Chiapas (n=2.10%), Puebla y San Luis Potosí un caso (5%) cada uno.

La mediana de evolución previa al ingreso fue de 10 días (1-270 días). Siete pacientes (35%) recibieron antibiótico antes de su ingreso con una mediana de cinco días con un rango de 2-11 días. La principal vía de adquisición de la infección fue comunitaria y solo un caso (5%) fue hospitalario.

El diagnóstico de ingreso fue osteomielitis en 13 (65%) y artritis séptica en siete (35%). Por la temporalidad de las manifestaciones clínicas predominaron los cuadros agudos en 13 (65%), seguido de subagudo en cinco (25%) y crónico en dos (10%) casos.

Tabla 9. Características demográficas de los pacientes con infección osteoarticular por S. aureus.

Características	n (%)
	20 (100)
Género	
Masculino	11 (55)
Femenino	9 (45)
Grupo etario	
Preescolar	3 (15)

Escolar	6 (30)
Adolescente	11 (55)
Patología de base	
Previo sano	10 (50)
Genética	5 (25)
Ortopédica	3 (15)
Neurológica	1 (5)
Oncológica	1 (5)
Tipo de infección	
Osteomielitis	13 (65)
Artritis séptica	7 (35)

En 10 casos (50%) se presentó antecedente de traumatismo (golpe directo y caída de propia altura en cinco casos cada uno). La mediana de presentación del traumatismo fue de 11 días (5-129). Cuatro casos (20%) presentaron el antecedente de celulitis: tres (15%), cirugía local; dos (10%) fractura; infección de vías respiratorias superiores, úlcera, desgarró muscular y artritis séptica ocurrieron en un paciente, respectivamente. Los principales signos y síntomas clasificados por sitio se describen en la **(Tabla 10)**. Ningún paciente presentó sepsis o irritabilidad.

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes con infección osteoarticular por S. aureus.

	Osteomielitis n=13 (100%)	Artritis séptica n=7 (100%)
Cuadro clínico		
Dolor local	8 (61.5)	6 (85.7)
Limitación del movimiento	8 (61.5)	6 (85.7)
Edema local	9 (69.2)	6 (85.7)
Eritema	9 (69.2)	5 (71.4)
Aumento de la temperatura local	9 (69.2)	6 (85.7)
Fiebre	5 (38.4)	5 (71.4)
Pico máximo °C mediana (rango)	38.3 (37.8-42)	38.9 (38.2-39.2)

Duración en días mediana (rango)	7 (2-20)	6 (2-10)
----------------------------------	----------	----------

El signo más frecuente fue edema local en 15 (75%), seguido de limitación del movimiento, eritema en 14 (70%), fiebre en cinco (50%) y fractura en un (15%) caso.

El síntoma más frecuente fue dolor en 14 pacientes (70%) por clasificación con base a la escala de EVA fue leve en siete (50%), intenso seis (43%) y moderado en uno (7%). Debido a la magnitud de la lesión ósea a su llegada a urgencias, tres pacientes fueron valorados de forma inicial por oncología por sospecha de osteosarcoma (**Figura 9**). Los pacientes con dolor intenso ameritaron tratamiento farmacológico intravenoso como morfina o ketamina durante su hospitalización.

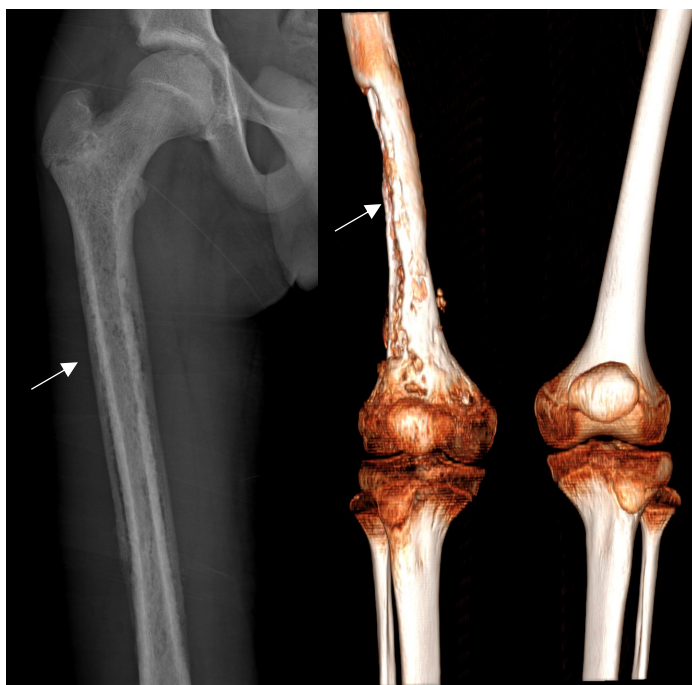


Figura 9 Radiografía AP y reconstrucción 3D de fémur derecho

Se observa reacción perióstica y destrucción ósea extensa (Flechas blancas).

La localización fue única en 14 casos (70%) y múltiple en seis (30%). Existió un predominio de afectación del hemicuerpo derecho 14 (70%), seguido del izquierdo en tres (15%) y esqueleto axial en dos (10%). Los principales huesos afectados fueron tibia en seis (30%),

fémur cinco (25%), húmero dos (10%) y el peroné, cúbito, astrágalo, coxis, sacro, calcáneo, rótula en un caso, respectivamente. Las principales articulaciones afectadas fueron rodilla tres (15%), seguida de cadera y codo con dos (10%) y un paciente (5%) con afectación de la articulación del hombro.

Hallazgos de laboratorio

Los valores de biometría hemática, neutrófilos, proteína C reactiva (PCR) y velocidad de sedimentación globular (VSG) de cada grupo de pacientes se encuentra en la **(Tabla 11)**. Tres pacientes con osteomielitis (23.1%) presentaron leucocitosis; cuatro (30.8%), neutrofilia; ocho (61.5%), PCR elevada y 10 (76.9%), VSG elevada.

En artritis séptica, dos pacientes (28.6%) presentaron leucocitosis; dos (28.6%), neutrofilia; cinco (71.4%), PCR elevada y seis (85.7%), VSG elevada.

Tabla 11. Estudios de laboratorio de los pacientes con infección osteoarticular por S. aureus

	Osteomielitis	Artritis séptica
	n=13	n=7
Laboratorios	mediana (rango)	mediana (rango)
Leucocitos uL/mm ³	9,210 (6,800-24,000)	9,500 (7,400-31,700)
Neutrófilos uL/mm ³	6,380 (3,600-21,100)	5,500 (4,400-27,100)
Plaquetas uL/mm ³	346,000 (220,000-656,000)	505,000 (118,000-656,000)
PCR mg/dL	2 (0,02-11,3)	2,510 (0,3-33,0)
VSG mm ³	50 (2-72)	56 (6-77)

PCR: proteína C reactiva y VSG: Velocidad de sedimentación globular.

Evolución hospitalaria

La evolución hospitalaria y complicaciones de los pacientes se describe en la **Tabla 12**. La mediana de estancia hospitalaria fue de 17 días con un rango de 4-47 en osteomielitis y una mediana de 27 días (rango 6-46) en artritis séptica. Todos los pacientes recibieron tratamiento antiestafilococo intravenoso con una mediana de 15 días con un rango de 2-46 en osteomielitis y mediana de 26 días (5-46) en artritis séptica. El tratamiento quirúrgico se llevó a cabo en

19 pacientes (95%), sin complicaciones con una mediana de 2 con un rango de 0-3 en osteomielitis y mediana de 2 (1-3) procedimientos en artritis séptica.

A un año de la toma de cultivo para análisis microbiológico y molecular, en ocho casos (40%) se presentaron complicaciones: osteomielitis crónica en ocho (40%), piomiositis en cinco (25%), fractura en terreno patológico en cuatro (20%), TVP en dos (10%) y émbolos sépticos y amputación en uno (5%).

En la paciente que se realizó amputación tenía antecedente de neurofibromatosis tipo 1 y pseudoartrosis congénita de tibia, con múltiples antecedentes quirúrgicos en años previos secundarios a colocación de fijador externo, recolocación de clavo de tibia izquierda y matriz ósea. Ingresó con diagnóstico de osteomielitis crónica con múltiples secuelas de procedimientos quirúrgicos previos (acortamiento de extremidad, limitación del movimiento y dolor local) debido a la evolución clínica con extensión y hallazgos clínicos y radiológicos compatibles con extensión local y en un tejido óseo muy lesionado se decide realizar amputación de la extremidad al ser la mejor opción terapéutica para la paciente.

En cinco pacientes se sospechó de producción de la toxina PVL por lo que se agregó al tratamiento inicial antiestafilocócico, clindamicina por su efecto inhibitorio en la liberación de la toxina. La producción de PVL se corroboró en cuatro casos los cuales presentaron complicaciones como piomiositis; dos casos presentaron TVP y un paciente émbolos sépticos pulmonares. Nueve pacientes recibieron tratamiento local por su efecto inhibitorio de crecimiento bacteriano: bonalive en cinco (25%); sulfato de calcio tres (15%) y glassbone en un paciente (5 %). Los 20 pacientes egresaron por mejoría clínica con esquema antimicrobiano oral. Las secuelas se presentaron en 11 (55%) las más frecuentes fueron limitación del movimiento en nueve pacientes (45%) seguido de dolor local en siete (35%) y acortamiento de la extremidad en seis (30%).

Tabla 12. Evolución en pacientes con infecciones osteoarticulares por S. aureus

Evolución y complicaciones	Osteomielitis	Artritis séptica
Tratamiento	mediana (rango)	mediana (rango)
Antibiótico (días)	15 (2-46)	26 (5-46)
Quirúrgico (número)	2 (0-4)	2 (0-3)
Hospital		
Estancia hospitalaria (días)	17 (4-47)	27 (6-46)
Complicaciones	N=13 (%)	N=7 (%)
Piomiositis	2 (15.4)	3 (42.9)
Embólos sépticos (pulmón)	1 (7.7)	0 (0)
Trombosis venosa profunda	0 (0)	2 (28.6)
Fractura en terreno patológico	3 (23)	1 (14.3)
Amputación	1 (7.7)	0 (0)
Bacteriemia con o sin otras complicaciones	1 (7.7)	0 (0)
Osteomielitis crónica	5 (38.4)	3(42.9)
Secuelas	N=13 (%)	N=7 (%)
Limitación movimiento	6 (46)	3 (42.9)
Dolor local	4 (30)	3 (42.9)
Acortamiento de extremidad	4 (30)	2 (28.6)

Ningún paciente presentó sepsis ni ameritó ingreso a UTIP. El cuadro clínico, diagnóstico evolución y tratamiento de los pacientes con IOA por *S. aureus* se describen en la **Tablas 13 y 14.**

Tabla 13 Características clínicas y diagnóstico de los pacientes con infección osteoarticular por *S. aureus*

Aislamiento	Grupo etario	Género	Comorbilidad	Tipo de infección		Temporalidad			Localización	Diagnóstico microbiológico			Diagnóstico radiológico			
				OM	AS	A	S	C		Hemocultivo	Exudado	Biopsia de hueso	Rx	USG	RMN	GM
O1	Adolescente	M	Ninguno	+			+		Fémur,tibia	-	++	+	+	NA	+	+
O2	Preescolar	M	Genético	+				+	Calcáneo	-	++	-	+	NA	NR	+
O11	Escolar	M	Ninguno	+		+			Tibia	-	++	+	+	NA	+	+
O13	Escolar	F	Neurológico	+			+		Coxis, sacro	NR	+	-	+	NA	+	+
O14	Adolescente	M	Ortopédico	+		+			Fémur	NR	+	+	+	NA	NR	+
O19	Escolar	M	Ninguno		+				Rodilla	NR	+	-	+	+	NR	NR
O23	Adolescente	F	Ninguno	+				+	Tibia, perone	NR	++	+	+	NA	+	+
O35	Adolescente	F	Genético	+				+	Tibia	NR	+	+	+	NA	+	+
O36	Adolescente	M	Oncológico	+		+			Fémur	NR	++	+	+	NA	+	+
O38	Adolescente	F	Ortopédico	+		+			Fémur	NR	++	+	+	NA	-	-
O42	Adolescente	F	Ninguno	+			+		Cúbito	NR	++	+	-	NA	NR	+
O43	Preescolar	F	Ninguno	+		+			Tibia	NR	++	+	+	NA	NR	+
O46	Preescolar	F	Ortopédico		+				Cadera	NR	++	NR	+	+	+	+
O48	Adolescente	M	Genético		+				Codo	-	++	-	+	+	NR	NR
O49	Adolescente	M	Genético	+				+	Húmero	-	++	-	+	NA	+	-
O52	Adolescente	F	Genético	+		+			Rótula	NR	++	-	+	NA	NR	+
O55	Escolar	M	Ninguno		+		+		Hombro, húmero, codo	NR	++	+	+	+	+	+
O58	Adolescente	M	Ninguno		+		+		Tobillo ,Tibia, astrágalo,calcáneo	NR	++	+	+	NA	+	+

O59	Escolar	F	Ninguno		+				Cadera	NR	+	+	+	+	NR
O61	Escolar	M	Ninguno		+				Rodilla	NR	+	+	+	NR	NR

*Cultivo de secreción inoculado en botella de hemocultivo aeróbico pediátrico

O, aislamiento; M, masculino; F,femenino; OM, osteomielitis; AS, artritis séptica; A, agudo; S, subagudo; C, crónico; H, hemocultivo; Rx, radiografía AP y lateral; USG, ultrasonido; RMN, resonancia magnética; GM, gammagrama con ciprofloxacino; NR, no realizado; NA, no aplica; +, positivo; -, negativo.

Tabla 14 Tratamiento y evolución de los pacientes con infección osteoarticular por *S. aureus*.

Aislamiento	Días de tratamiento IV					Tratamiento oral (días)	Procedimiento quirúrgico realizado				Tx	Tratamiento local	El H (días)	Complicación						Secuela		
	DC	CEF	CC	VA	CRO			Biopsia hueso	Desbridamiento quirúrgico	Escarificación				Artrocentesis y/o artrotomía	Qx (#)			Piomas	E. sépticos pulmon	TV	Fractura En terreno patológico	Amputación
O1	+6-+48	0-+5	+13-+34*			150*	+	+	+	NA	3	Sulfato de calcio	47	+	+	-	+	-	+	+	-	+
O2	+2-+14	0+1				60	+	+	-	NA	2	Glasbone	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O11	+2-+27	0-+1	+3-+27*			120*	+	+	-	NA	2	Vidrio bioactivo	28	+	-	-	-	-	-	-	-	-
O13		+2-+15		0-+1	0-+1	120	-	-	-	NA	0	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O14		0-+5				30	+	-	-	NA	1	Vidrio bioactivo	7	-	-	-	-	-	+	+	-	+
O19		0-+15				15	-	-	-	++	2	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O23		0-+8				180	+	+	-	NA	2	-	8	-	-	-	-	-	+	+	+	-
O35		-4-+25				7	+	+	+	NA	3	-	41	-	-	-	-	+	-	-	+	-
O36		0-+21				90	+	+	+	NA	3	Vidrio bioactivo	22	-	-	-	-	-	+	-	+	+
O38		0-+14				15	+	+	-	NA	2	Vidrio bioactivo	16	-	-	-	+	-	-	+	+	+
O42		0-+15				30	+	+	-	NA	2	Vidrio bioactivo	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O43		0-+16				30	+	-	-	NA	1	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-

O46		0-+5				25	-	-	-	+	1	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
O48		0+32				0	-	-	-	+++	3	-	33	-	-	-	-	-	-	-	-
O49		0+20				60	+	+	+	NA	3	-	27	-	-	-	+	-	+	-	-
O52		0-+3				30	+	-	.	NA	1	-	4	-	-	-	-	-	+	-	-
O55		0-+44	+15- +45*			120*	+	+	-	+	3	Sulfato de calcio	46	+	-	+	-	-	+	+	+
O58		0-+29				180	+	+		+	3	Sulfato de calcio	30	+	-	+	-	-	+	+	-
O59		-4- +38	-4- +26*			42	-	-	-	+	1	-	39	+	-	-	+	-	+	+	+
O61		0-+5				35	-	-	-	+	1	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-

El día de la toma del cultivo de exudado y/o líquido articular fue considerado como día cero. *Pacientes con detección del gen *pvl*.

O, aislamiento DC: dicloxacilina, CEF: cefalotina, CC: clindamicina, VA: Vancomicina, CRO: Ceftriaxona, OM: osteomielitis, M: masculino, F: femenino, Ex.

Local: Extensión local, Fx: Fractura, E. sépticos pulmón: émbolos sépticos pulmón, TVP: Trombosis venosa profunda, EIH estancia intrahospitalaria, TxQx: tratamiento quirúrgico, IV: intravenoso, NA: no aplica.

Identidad microbiológica

En los 20 aislamientos se confirmó la identidad microbiológica, dos de las cepas de *S. aureus* no fermentaron manitol (**Figura 10**).



Figura 10. Crecimiento de *S. aureus* en placa de agar sal y manitol por estría cruzada de la muestra O-57.

Los estafilococos positivos a la coagulasa (*S. aureus*) habitualmente fermentan manitol y producen el viraje de color amarillo del medio.

Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos

El perfil de susceptibilidad antibiótica de los 20 aislamientos de *S. aureus* se muestra en la (**Figura 11**). Existió un predominio de SAMS en 19 cepas (95%). En tres aislamientos (15%) se documentó resistencia a clindamicina, ciprofloxacino y eritromicina. Una cepa (5%) fue resistente a gentamicina. En dos aislamientos (10%), se identificó una resistencia inducible a clindamicina (Prueba D positiva). Todos los aislamientos fueron susceptibles a STX, LZD, VA y TEL.

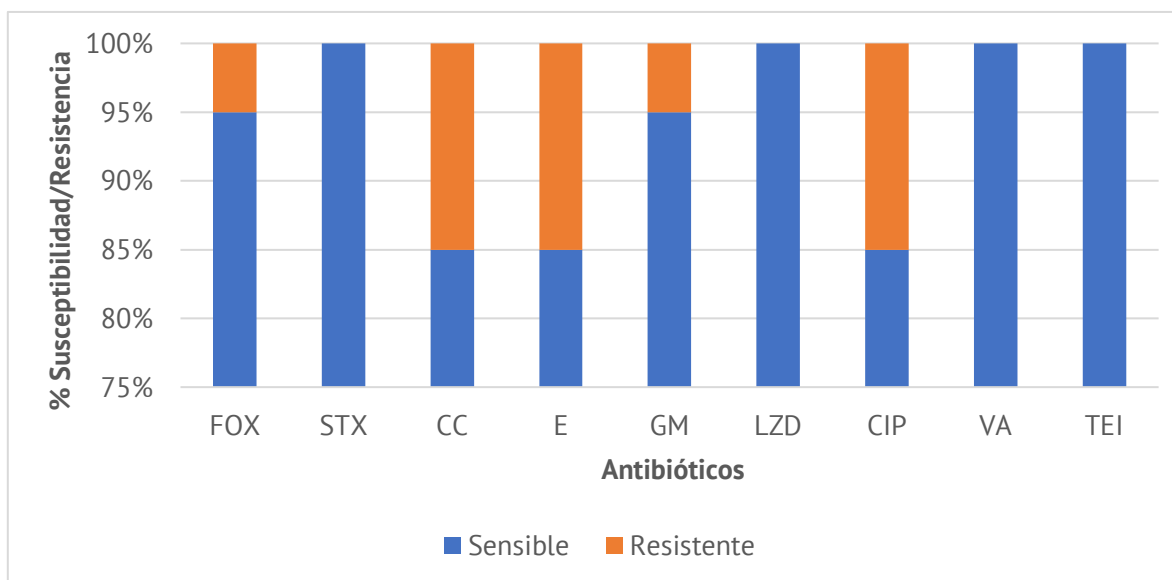


Figura 11. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *S. aureus*

FOX: cefoxitina, STX: trimetoprima/ sulfametoxazol, CC: clindamicina, E: eritromicina, GM: gentamicina, LZD: linezolid, CIP: ciprofloxacino, VA: vancomicina, TEI: teicoplanina.

Confirmación de identidad

Se incluyeron 20 aislamientos en los que se confirmó la identidad de *S. aureus*, se detectó el gen *nuc* y se analizó el gen 16S rRNA (Figura 12).

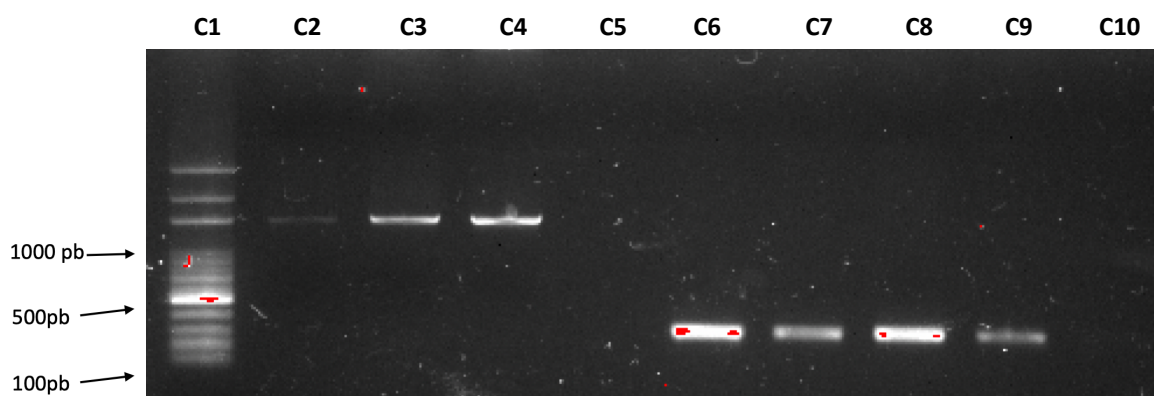


Figura 12 Detección del gen *nuc* y 16S rRNA por PCR

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb, carril 2: O-57 *nuc*, carril 3: O-58 *nuc*, carril 4: control positivo, carril 5: control negativo, carril 6: O-57 16SrRNA, carril 7: O-59 16SrRNA, carril 8: O-55 16SrRNA, carril 9: control testigo positivo, carril 10: testigo negativo.

En cuanto a la resistencia a betalactámicos, en un aislamiento se detectó el gen *mecA* categorizándose como SAMR, contenido en el casete tipo II (Figura 13 y 14).

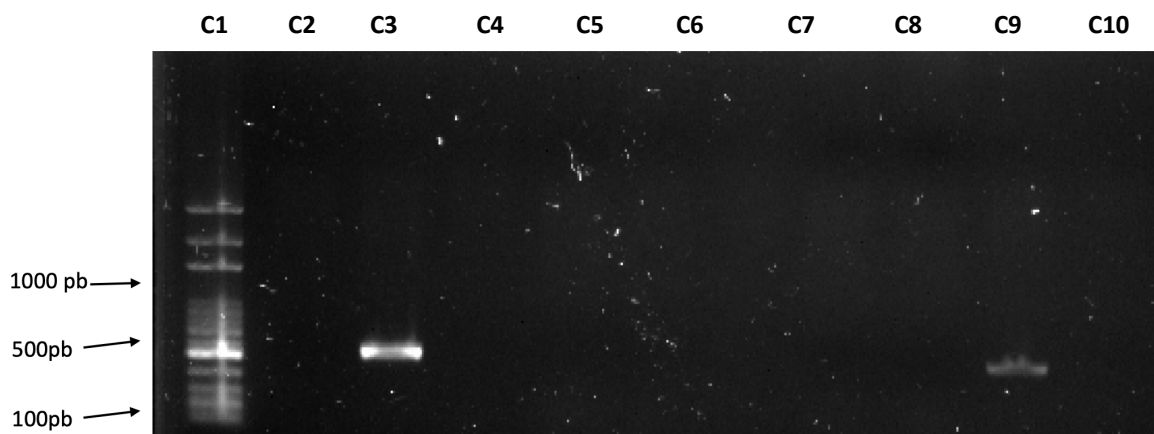


Figura 13. Detección del gen *mecA* por PCR.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: O-23, carril 3: O-35, carril 4: O-36, carril 5: O-38, carril 6: O-42, carril 7: O-43, carril 8: O-46, carril 9: O-48, carril 10: testigo positivo, carril 11: testigo negativo.

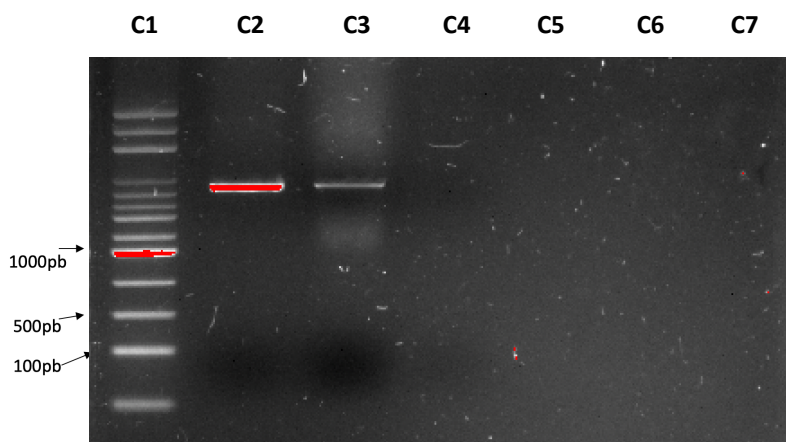


Figura 14. Detección del gen *SCCmec* por PCR.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: O-35, carril 3: testigo positivo, carril 4: testigo negativo.

Deteccion de genes de virulencia

La distribución de los genes de virulencia se observa en la (**Figura 15**). El gen *clfA* fue el más frecuente (n=19, 95%), seguido *hla* y *spA* (n=14, 70%), *fnbA* (n=11, 55%), *femA* (n=9, 45%), *fnbB* (n=5, 25%), *pvl* (n=4, 20%) (**Figura 16**), *cna* y ambos *fnb* (n=3, 15%), *tst* (n=2, 10%), *eta* y *mecA* (n=1, 5%). En ningun aislamiento se detectaron los genes *clfB*, *etb* y *sec*.

La distribución por mecanismos de acción fue la siguiente: los genes de factores de adhesión (*clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *cna*, *spA*) se identificaron en todos los aislamientos; los de invasión (*hla*, *pvl*) en =15 (75%), *femA* en 9 (45%); superantígeno (*tst*) en 2(10%), toxigénicos (*eta*) en un aislamiento (5%).

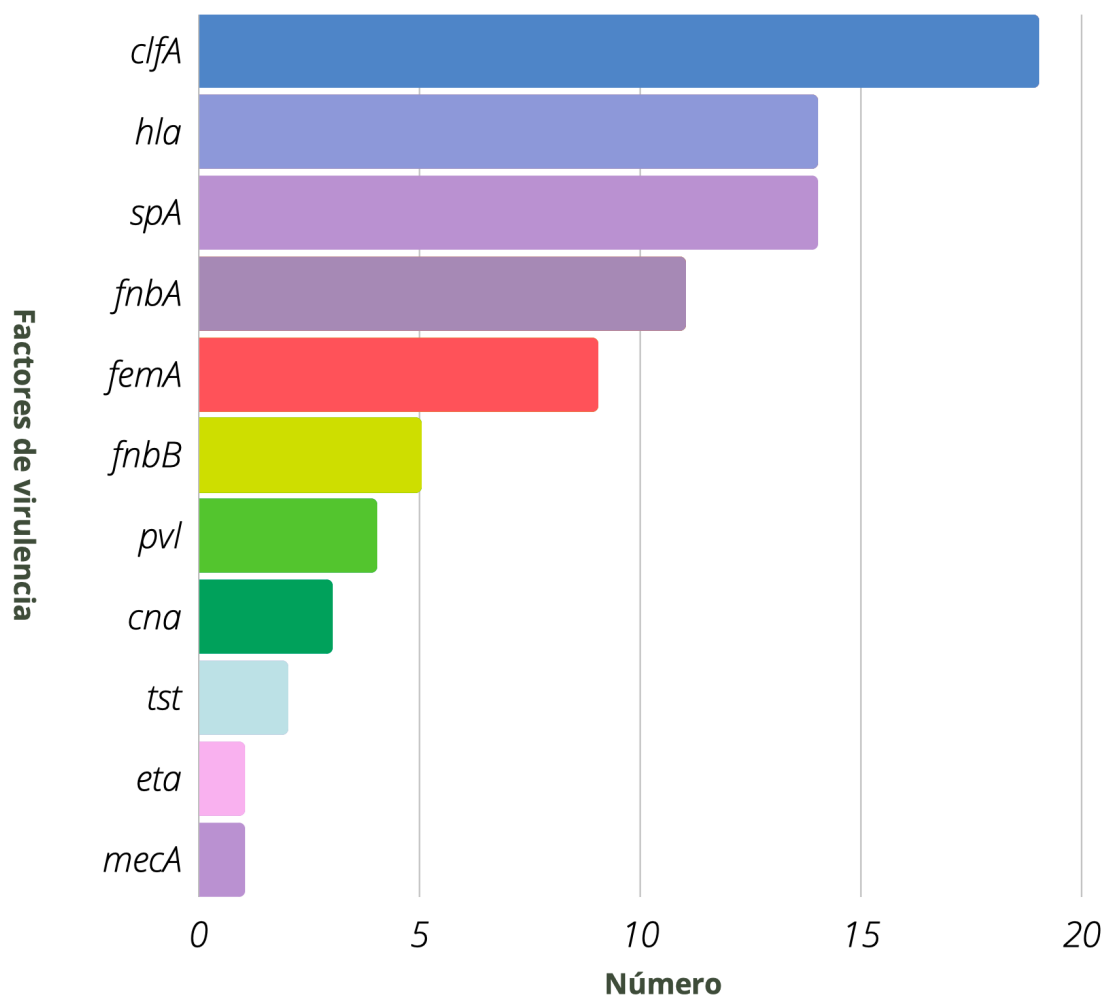


Figura 15. Distribución de los factores de virulencia de los aislamientos de *S. aureus*

clfA: factor de aglutinación A, *hla*: α -hemolisina, *spA*: proteína A, *fnbA*: proteína de unión a fibronectina A, *femA*: FemA, *fnbB*: proteína de unión a fibronectina B, *cna*: proteína de unión a colágeno, *pvl*: proteína de Pantón Valentine, *tst*: toxina de choque tóxico-1, *eta*: enterotoxina A.

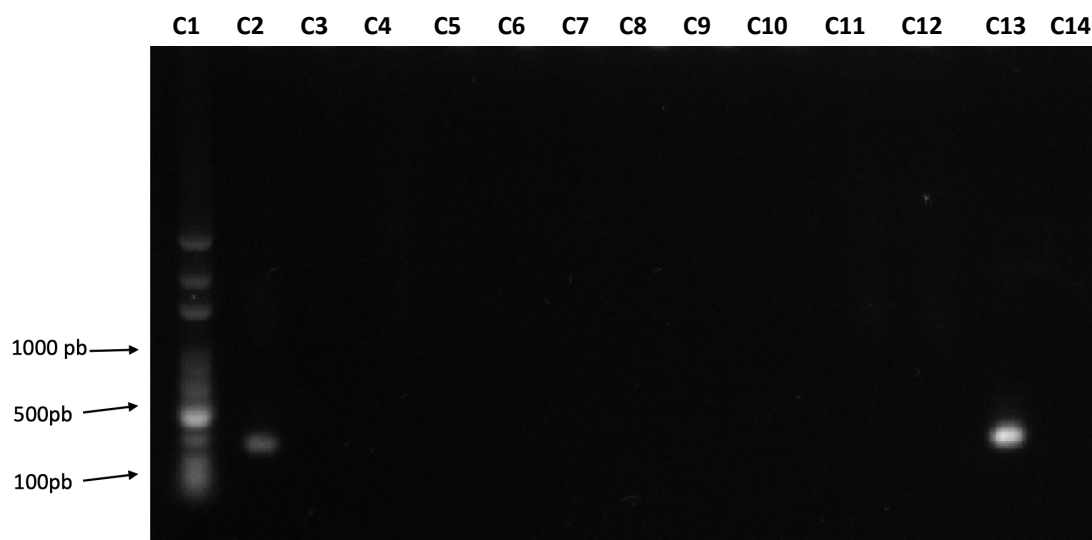


Figura 16. Detección del gen *pvl* por PCR

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: O-1, carril 3: O-2, carril 4: O-3, carril 5: O-4, carril 6: O-5, carril 7: O-6, carril 8: O-7, carril 9: O-10, carril 10: O-3, carril 11: O-14, carril 12: O-19, carril 13: testigo positivo, carril 14: testigo negativo.

Genes de virulencia y manifestaciones clínicas

La detección de factores de virulencia en relación con el tipo de infección osteoarticular como se observa en la (Figura 17). En los aislamientos de pacientes con osteomielitis se identificaron los genes *clfA* (n=12 .92%), *spa* (n=11. 84%), *hla* (n=9. 69%), *fnbA* (n=7.53%), *femA* (n=6. 46%), *fnbB* (n=3.23%), *pvl* (n=2. 15%), *mecA* (n= 1.7%), *cna* (n=1. 7%), ambos *fnb* (n=1.7%) y *eta* (n=1.7%). No se detectaron los genes *tst*, *clfB*, *sec* y *etb*.

En los aislamientos de artritis séptica, la distribución de factores de virulencia fue *clfA* (n=7. 100%), *spa* (n=3. 42%), *hla* (n= 5. 71%), *fnbA* (n=4. 57%), *femA* (n=3. 42%), ambos *fnb*

fnbB (n=2.28%), *pvl* (n= 2. 28 %), *cna* y *tst* (n= 2. 28%). No se detectaron *mecA*, *eta*, *etb*, *clfB* y *sec*.

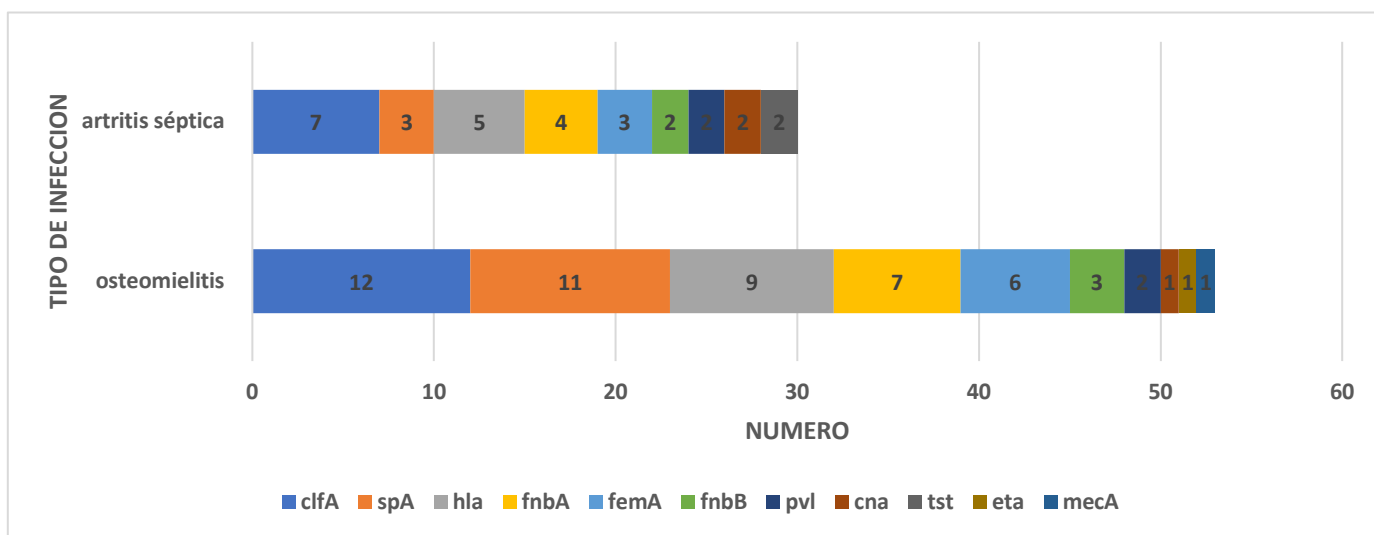


Figura 17. Factores de virulencia detectados en relación al tipo de infección osteoarticular.

clfA: Factor de aglutinación A, *hla*: α -hemolisina, *fnbA*: proteína de unión a fibronectina A, *femA*: femA, *fnbB*: proteína de unión a fibronectina B, *cna*: proteína de unión a colágeno, *pvl*: proteína de Pantón Valentine, *tst*: Toxina de choque tóxico-1, *eta*: enterotoxina A, *spa*: proteína A.

Por mecanismo de acción existió un predominio de los genes que codifican para factores de adhesión (n=13.100%), principalmente (*clfA*, *fnbA* y *spa*) en osteomielitis y en todos (n=7.100%) los de artritis séptica. (Tabla 15).

Tabla 15. Factores de virulencia clasificados por mecanismo de acción en infecciones osteoarticulares

	Osteomielitis	Artritis séptica	Total
Factores de adhesión	(n=13)	(n=7)	(n=20)
<i>clfA</i>	=2	-	2
<i>fnbB</i> , <i>spa</i>	1	-	1

<i>clfA, spa</i>	1	2	3
<i>clfA, cna</i>	-	1	1
<i>clfA, fnbA</i>	-	1	1
<i>clfA, fnbA, spa</i>	6	-	6
<i>clfA, fnbA, fnbB</i>	-	1	1
<i>clfA, fnbB, spa</i>	1	-	1
<i>clfA, fnbA, cna</i>	-	1	1
<i>clfA, cna, spa</i>	1	-	1
<i>clfA, fnbA, fnbB, spa</i>	1	1	2
Invasión	(n=10)	(n=5)	(n=15)
<i>pvl</i>	1	-	1
<i>hla</i>	8	3	11
<i>pvl, hla</i>	1	2	3
Superantígeno	(n=1)	(n=2)	(n=3)
<i>tst</i>	-	=2	2
<i>eta</i>	1	-	1
Citoplásmico	(n=6)	(n=3)	(n=9)
<i>femA</i>	6	3	9
Resistencia	(n=1)	(n=0)	(n=1)
<i>mecA</i>	1	-	-

clfA: factor de aglutinación A, *hla*: α -hemolisina, *SpA*: proteína A, *fnbA*: proteína de unión a fibronectina A, *femA*: FemA, *fnbB*: proteína de unión a fibronectina B, *cna*: proteína de unión a colágeno, *pvl*: proteína de Panton Valentine, *tst*: toxina de choque tóxico-1, *eta*: enterotoxina A.

La distribución de los factores de virulencia por la clasificación temporal de la infección se observa en la **(Figura 18)**. En las cepas aisladas en la presentación aguda se detectaron la mayoría de los factores de virulencia: 13 genes de adhesión por orden de frecuencia se encuentran *clfA*, *fnbA*, *spa*, seguido de 10 exoenzimas *hla* (n=9) y *pvl* (n=1) y *femA* (n=6). Los tres aislamientos con *fnbA* y *fnbB* se encontraron en los pacientes que cursaban por la fase aguda.

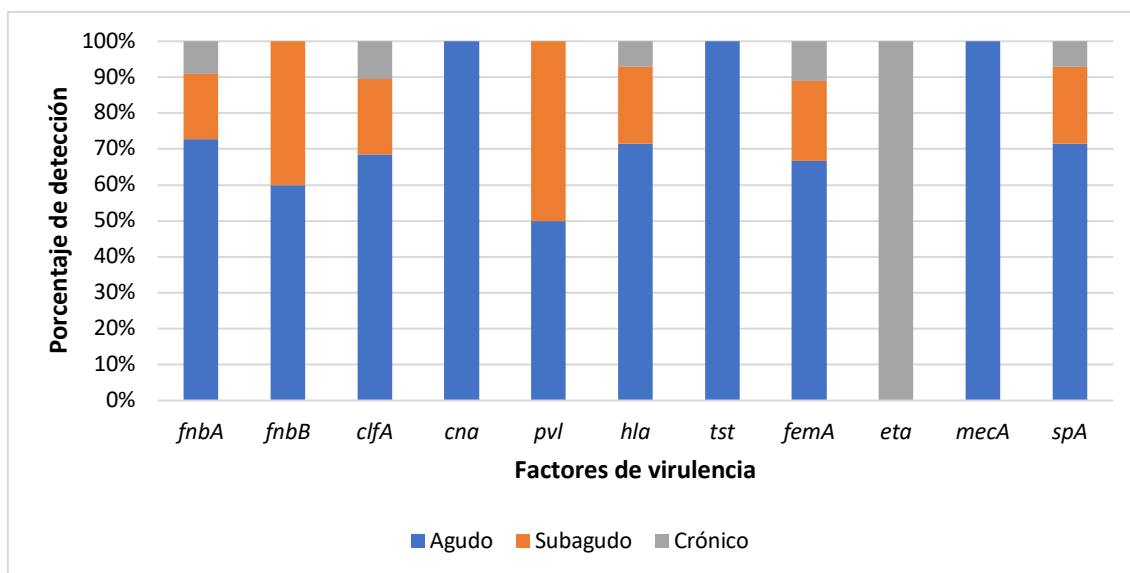


Figura 18. Factores de virulencia detectados en relación a la temporalidad en infección osteoarticular

clfA: Factor de aglutinación A, *hla*: α -hemolisina, *fnbA*: proteína de unión a fibronectina A, *femA*: FemA, *fnbB*: proteína de unión a fibronectina B, *cna*: proteína de unión a colágeno, *pvl*: proteína de Pantón Valentine, *tst*: toxina de choque tóxico-1, *eta*: enterotoxina A, *spA*: proteína A.

En la temporalidad subaguda representaron el segundo lugar con cinco factores de adhesión detectados por orden de frecuencia se encuentran: *clfA*, *fnbA* seguido de *hla* (n=3), *pvl* y *femA* (n=2) No se detectaron los genes *cna*, *tst* y *mecA*. En la presentación crónica solo se detectaron dos genes de adhesión *clfA* y *fnbA* seguido de dos exoenzimas *hla*, *eta* y en un aislamiento *femA*.

Se describió la frecuencia de los 11 factores de virulencia en relación con las variables clínicas. El dolor intenso se identificó en 75% de los pacientes con las cepas con *pvl* y 66% con ambos factores de unión a fibronectina. Los aislamientos de los pacientes con fiebre fueron los que tenían ambos *fnb*, *pvl* y *mecA*. Los síntomas locales como edema, eritema, aumento de la temperatura local se registraron en los niños en los que se aislaron las cepas con *cna*, *fnbB* y ambos *fnb*. La limitación del movimiento se presentó en todos los pacientes con aislamientos con *cna*, *fnbB*, *pvl*, *eta*, *tst*, *mecA* y ambos *fnb*. La fractura asociada se observó en dos niños con aislamientos portadores de los genes, *pvl*, *hla*, *clfA*, *fnbA*. La fiebre más alta se registró los pacientes con las cepas que tenían el gen *pvl*, este signo tuvo una mediana 39.5 °C (38.8-42) (Tabla 16).

Tabla 16. Frecuencia de factores de virulencia y cuadro clínico en IOA

	Adhesión y colonización						Invasión		Toxigénicos	Superantígeno	Resistencia	Citoplásmico
Manifestaciones clínicas	<i>spa</i> n=14 (100%)	<i>cna</i> n=3 (100%)	<i>clfA</i> n=19 (100%)	<i>fnbA</i> n=11 (100%)	<i>fnbB</i> n=5 (100%)	<i>fnb</i> n=3 (100%)	<i>pvl</i> n=4 (100%)	<i>hla</i> n=14 (100%)	<i>eta</i> n=1 (100%)	<i>tst</i> n=2 (100%)	<i>mecA</i> n=1 (100%)	<i>femA</i> n=9 (100%)
Dolor	9 (64)	3 (100)	13 (68)	7 (63)	5 (100)	3 (100)	4 (100)	9 (64)	1 (100)	2 (100)	1 (100)	6 (66)
Leve	7 (50)	1 (33)	6 (31)	3 (27)	2 (40)	1 (33)	1 (25)	4 (28)	1 (100)	1 (50)	1 (100)	4 (44)
Moderado	1 (7)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11)
Intenso	1 (7)	2 (66)	6 (31)	4 (36)	2 (40)	2 (66)	3 (75)	4 (28)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (11)
Sin dolor	5 (35)	0 (0)	6 (31)	4 (36)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (35)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (33)
Fiebre	5 (35)	2 (66)	10 (52)	7 (63)	3 (60)	3 (100)	4 (100)	8 (57)	0 (0)	1 (50)	1 (100)	3 (33)
Limitación del movimiento	9 (64)	3 (100)	13 (68)	7 (63)	5 (100)	3 (100)	4 (100)	9 (64)	1 (100)	2 (100)	1 (100)	5 (55)
Edema local	10 (71)	3 (100)	14 (73)	7 (63)	5 (100)	3 (100)	4 (100)	9 (64)	1 (100)	2 (100)	0 (0)	6 (66)
Eritema	9 (64)	3 (100)	13 (68)	7 (63)	5 (100)	3 (100)	3 (75)	10 (71)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	4 (44)
Aumento de la temperatura local	10 (71)	3 (100)	14 (73)	7 (63)	5 (100)	3 (100)	3 (75)	10 (71)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	5 (55)
Fractura	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (9)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Temperatura pico máximo	38.2 (37.8-39.9)	39 (37.8-39.2)	38.5 (37.8-42)	38.6 (38-39.9)	39 (38.5-39.9)	39 (38.5-39.9)	39.5 (38.8-42)	38.6 (37.8-39.9)	-	-	-	38.3 (38.2-39)
Mediana (rango)												
Duración fiebre	7 (2-8)	2 (2-5)	7 (2-20)	7 (2-12)	8 (7-12)	8 (7-12)	9.5 (5-20)	6 (2-12)	-	-	-	7 (2-7)
Mediana (rango)												

clfA: factor de aglutinación A, *hla*: α -hemolisina, *spa*: proteína A, *fnbA*: proteína de unión a fibronectina A, *femA*: FemA, *fnbB*: proteína de unión a fibronectina B, *cna*: proteína de unión a colágeno, *pvl*: proteína de Pantón Valentine, *tst*: toxina de choque tóxico-1, *eta*: enterotoxina A. *fnb*: proteína de unión a fibronectina A y B.

Todos los pacientes con aislamientos de MSSA y el gen *pvl* desarrollaron complicaciones como piomiositis (100%), extensión de la infección (75%), fractura asociada (50%), en un caso embólos sépticos y TVP. La extensión de la infección se presentó en los niños con las cepas con *pvl*, *mecA* y *cna*; en tanto que en aquellos con embólos sépticos se identificaron los genes *pvl*, *hla*, *clfA*, *cna* y ambos *fnb*. En los aislamientos de pacientes con fractura asociada se detectaron los genes *spa*, *clfA*, *fnbA*, *hla*, *mecA* y *femA* y en la amputación se presentó en aislamientos con *clfA*, *fnbA*, *hla*, *mecA* y *femA*. Finalmente, las cepas con *mecA*, *cna*, *spa*, *clfA*, *pvl*, *tst* y *hla* presentaron osteomielitis crónica.

De los 11 factores de virulencia se determinó la relación entre su frecuencia y datos de laboratorio. La leucocitosis con neutrofilia (mediana 17,000 rango:14,400-31,700) uL/mm3)

se presentó en los pacientes con las cepas que poseían el gen *mecA* y ambos *fnb*. La PCR elevada se identificó en aquellos con *S. aureus* portador de *cna* 2.5 (1.05- 17) y *tst* 9.34 (1.68- 17) mg/dL. La VSG elevada se detectó en los niños con aislamientos portadores de los genes *cna* (mediana 62, rango 33-64), *fnbB*, ambos *fnb* 53 (50-77), *pvl* 61 (40-77) mm³ y *mecA* (Tabla 17).

Tabla 17. Frecuencia de factores de virulencia y parámetros de laboratorio

	Adhesión y colonización						Invasión		Toxigénicos	Superantígeno	Resistencia	Citoplásmico
Laboratorio	<i>spa</i> n=14 (100%)	<i>cna</i> n=3 (100%)	<i>clfA</i> n=19 (100%)	<i>fnbA</i> n=11 (100%)	<i>fnbB</i> n=5 (100%)	<i>fnb</i> n=3 (100%)	<i>pvl</i> n=4 (100%)	<i>hla</i> n=14 (100%)	<i>eta</i> n=1 (100%)	<i>tst</i> n=2 (100%)	<i>mecA</i> n=1 (100%)	<i>femA</i> n=9 (100%)
Leucocitosis	4 (28)	0 (0)	5 (26)	4 (36)	3 (60)	3 (100)	2 (50)	4 (28)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (11)
Neutrofilia	1 (7)	0 (0)	6 (31)	5 (45)	3 (60)	3 (100)	2 (50)	5 (35)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (11)
Linfopenia	1 (7)	1 (33)	2 (10)	1 (9)	1 (20)	1 (33)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)
PCR elevada	10 (71)	3 (100)	12 (63)	5 (45)	3 (60)	1 (33)	1 (25)	8 (57)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	8 (88)
VSG elevada	11 (78)	3 (100)	15 (78)	7 (77)	5 (100)	3 (100)	4 (100)	12 (85)	1 (50)	1 (50)	1 (100)	6 (66)

clfA: factor de aglutinación A, *hla*: α -hemolisina, *SpA*: proteína A, *fnbA*: proteína de unión a fibronectina A, *femA*: FemA, *fnbB*: proteína de unión a fibronectina B, *cna*: proteína de unión a colágeno, *pvl*: proteína de Panton Valentine, *tst*: toxina de choque tóxico-1, *eta*: enterotoxina A, *spa*: proteína A, *fnb*: proteína de unión a fibronectina A y B.

La frecuencia de procedimientos quirúrgicos con respecto a la detección de los genes por orden ascendente fue *spa*, *fnbA*, *fnbB* con una mediana 2 (0-3), *clfA* 2 (0-4), ambos *fnb* 3 (2-3), *cna* 3 (1-3) y *pvl* 3 (2-4) (Tabla 18).

Tabla 18. Frecuencia de factores de virulencia y estancia hospitalaria en pacientes con IOA

Factores de virulencia	DEIH Mediana (rango)	Días de antibiótico Mediana (rango)	Procedimientos Mediana (rango)
<i>spa</i> n=14	16.5 (4-41)	15 (2-41)	2 (0-3)
<i>cna</i> n=3	22 (6-30)	15 (6-31)	3 (1-3)
<i>fnbA</i> n=11	17 (6-46)	16 (6-46)	2 (0-3)
<i>fnbB</i> n=5	17 (4-46)	17 (2-46)	2 (1-3)
<i>fnb</i> n=3	16.5 (4-41)	27 (17-46)	3 (2-3)

<i>pvl</i> n=4	42 (28-47)	40 (27-46)	2.5 (1-3)
<i>hla</i> n=14	20 (6-46)	15 (6-46)	2 (0-3)
<i>femA</i> n=9	14 (6-41)	14 (-5-41)	1 (0-3)
<i>tst</i> n=2	18 (6-30)	18 (5-31)	1.5 (0-3)

DEIH: días de estancia intrahospitalaria, *hla*: α -hemolisina, SpA: proteína A, *fnbA*: proteína de unión a fibronectina A, *spa*: proteína A, *femA*: FemA, *fnbB*: proteína de unión a fibronectina B, *cna*: proteína de unión a colágeno, *pvl*: proteína de Pantón Valentine, *tst*: toxina de choque tóxico-1, *eta*: enterotoxina A. *fnb*: proteína de unión a fibronectina A y B.

Identificación de CC y MLST

En 16 aislamientos se identificó el CC. El más frecuente fue CC8 (n=5) seguido de CC45 y CC5 (n=4), CC30 (n=2) y CC15 (n=1) (**Figura 19**). El MLST se realizó en 11 aislamientos y se clasificaron en las siguientes secuencias tipo ST2, ST8, ST15, ST278, ST1930, ST1011, ST4767, ST 94, ST6184, ST3994 y ST152.

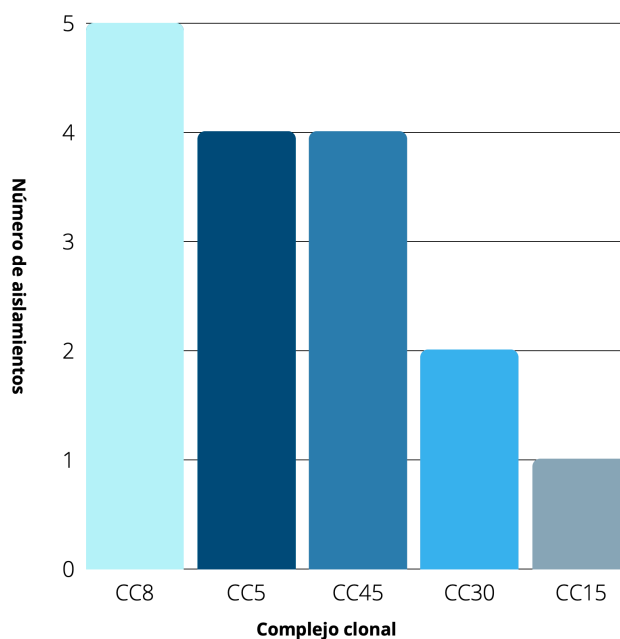


Figura 19. Distribución de los complejos clonales.

El CC8 fue el más frecuente, seguido de CC5, CC46 y CC30.

La relación de los factores de adhesión y los complejos clonales detectados se observa en la **Tabla 19**. En los aislamientos CC8 y CC30 predominaron los factores de adhesión como *clfA*, *fnbA* y *spa*. Los superantígenos (*hla*, *pvl* y *femA*) se detectaron en los aislamientos MSSA-CC8. En el CC5, los principales factores detectados fueron los asociados con adhesión y exoenzimas como *hla* y *femA*. El único aislamiento MRSA se clasificó como CC5. En los aislamientos MSSA-CC45 se amplificaron los factores de adhesión (*clfA*, *fnbA*, *fnbB* y *spa*) además de los genes codificantes para las exoenzimas *hla* y *pvl* y en CC15 únicamente se detectó *fnbB* y *spa*.

Tabla 19. Factores de virulencia y complejo clonal

CC							
	CC15	CC30	CC45	CC5	CC8	ND	Total
No. aislamiento	1	2	4	4	5	4	20
Factores de adhesión							
<i>fnbA</i>	-	1	2	2	4	2	11
<i>fnbB</i>	1	-	3	-	1	-	5
<i>fnb</i>	-	-	2	-	1	-	3
<i>clfA</i>	-	2	4	4	5	4	19
<i>spa</i>	1	1	3	4	4	1	14
<i>cna</i>	-	1	-	1	-	1	3
Exoenzimas							
<i>pvl</i>	-	-	2	-	1	1	4
<i>hla</i>	-	1	2	4	3	4	14
<i>eta</i>	-	-	-	-	1	-	1
Superantígeno							
<i>tst</i>	-	1	-	-	-	1	2
Citoplásmico							
<i>femA</i>	-	2	1	3	3	-	9
Resistencia							
<i>mecA</i>	-	-	-	1	-	-	1
<i>ermA</i>	-	2	-	1	-	1	4
<i>ermC</i>	-	-	-	-	-	1	1

clfA: factor de aglutinación A, *hla*: α -hemolisina, *spa*: proteína A, *fnbA*: proteína de unión a fibronectina A, *femA*: FemA, *fnbB*: proteína de unión a fibronectina B, *cna*: proteína de unión a colágeno, *pvl*: proteína de Pantón Valentine, *tst*: toxina de choque tóxico-1, *eta*: enterotoxina A. Complejo clonal 8 (CC8), Complejo clonal 5 (CC5), Complejo clonal 45 (CC45), Complejo clonal 30 (CC30), Complejo clonal 15 (CC15).

La relación de los CC y la resistencia antimicrobiana se resume en la (**Figura 20**). En *S. aureus* del CC8 se detectaron aislamientos con resistencia a clindamicina (n=2), ciprofloxacino (n=2) y gentamicina (n=1). El CC5 mostró resistencia a cefoxitina (n=1), clindamicina (n=1), eritromicina (n=1) y ciprofloxacino (n=1). Dos aislamientos resistentes a eritromicina pertenecieron al CC30. No se encontraron aislamientos con resistencia antimicrobiana en CC45 (n=4), CC15 (n=1) y en los que no se determinó el CC (n=5).

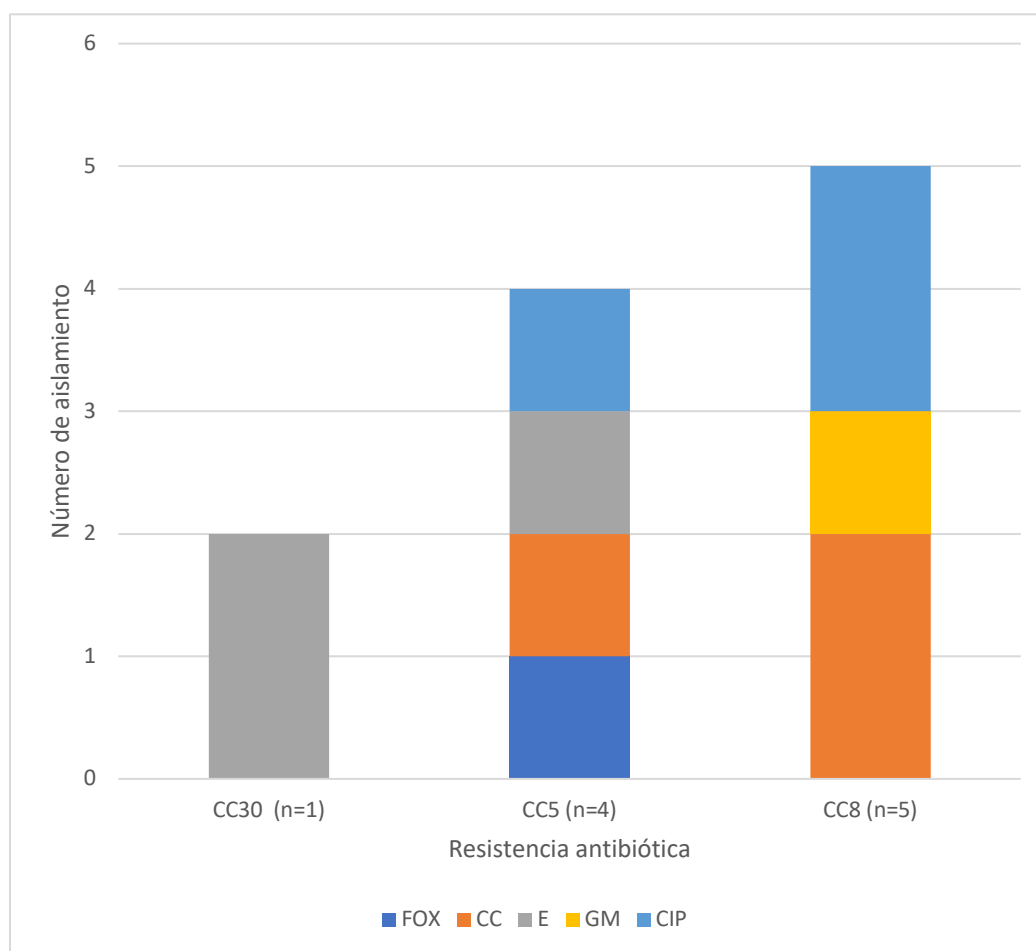


Figura 20. CC y resistencia antimicrobiana

CC: complejo clonal, FOX: cefoxitina, CC: clindamicina, E: eritromicina, GM: gentamicina, CIP: ciprofloxacino.

En la **Tabla 20** se describen los CC y las complicaciones. Los pacientes con *S. aureus* CC15 y CC30 no presentaron complicaciones. La piomiositis se observó en los pacientes con *S.*

aureus CC8 (n=1), CC45 (n=2) y ND (n=2). La extensión de la OM en aquellos con *S. aureus* CC8 (n=3), CC5 (n=2) y CC45 (n=1). La OM crónica se presentó en *S. aureus* CC8 (n=2), CC5 (n=2), CC45 (n=1) y ND (n=1).

Tabla 20. Frecuencia de CC y complicaciones en IOA por *S. aureus*

Complicaciones	CC8 n=5 (%)	CC5 n=4 (%)	CC45 n=4 (%)	ND n=4 (%)
Piomiositis	1 (20)	0 (0)	2 (50)	2 (50)
Extensión de la infección	3 (60)	2 (50)	1 (25)	2 (50)
Embólos sépticos (pulmón)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)
Trombosis venosa profunda	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (25)
Fractura	1 (20)	0 (0)	1 (25)	1 (25)
Amputación	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
Osteomielitis crónica	2 (40)	2 (50)	1 (25)	1 (25)

Complejo clonal 8 (CC8), complejo clonal 5 (CC5), complejo clonal 45 (CC45), complejo clonal 30 (CC30), complejo clonal 15 (CC15), ND no determinado.

La resistencia antimicrobiana, factores de virulencia y CC de los aislamientos se detalla en la **Tabla 21**. La resistencia a antimicrobianos se identificó en seis aislamientos; FOX (n=1), CC (n=3), E (n=3), CP (n=3), GM (n=1). El gen *mecA* se identificó en un aislamiento, *ermA* (n=4) y *erm C* (n=1). La prueba D fue positiva en dos cepas. El fenotipo MLS_B inducible se documentó en dos aislamientos y MLS_B constitutivo en una cepa. Los aislamientos con mayor número de genes de virulencia detectados fueron O-11, O-13, O14, O-23, O-35, O-42, O-46, O-55. Las complicaciones que se presentaron fueron extensión local (n=8), piomiositis (n=5), TVP (n=2), embólos sépticos (n=1) y fractura (n=3). Los CC más frecuentes fueron CC8 (n=5) y CC5 (n=4).

Tabla 21. Resistencia antimicrobiana, factores de virulencia y complejo clonal

Aislamiento	Perfil de resistencia	Perfil de resistencia MLS _B				Factores adhesión					Invasinas		Exotoxina	Superantígeno	Complejo clonal
		<i>erm</i> A	<i>erm</i> C	Prueba D	Fenotipo	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>cna</i>	<i>spA</i>	<i>pvl</i>	<i>hla</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>	
O1	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	-	-	-	-	+	-	-	-	45
O2	Ninguno	+	+	-	Ninguno	+	-	-	-	-	-	+	-	-	ND
O11	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	+	-	+	+	+	-	-	45
O13	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	-	-	+	-	+	-	-	5
O14	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	-	-	+	-	+	-	-	5
O19	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	+	-	+	-	-	-	-	45
O23	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	-	-	+	-	-	+	-	8
O35	FOX*, CC, E, CP	+	-	-	cMLS _B	+	-	-	-	+	-	+	-	-	5
O36	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	-	-	+	+	-	+	-	-	5
O38	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	-	-	+	-	+	-	-	ND
O42	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	-	-	+	-	+	-	-	45
O43	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	-	-	+	-	+	-	-	8
O46	E	+	-	+	iMLS _B	+	+	-	+	-	-	+	-	-	30
O48	CC, CP	-	-	-	Ninguno	+	-	-	-	+	-	+	-	-	8
O49	CC, CP	-	-	-	Ninguno	+	+	-	-	+	-	-	-	-	8

O52	Ninguno	-	-	-	Ninguno	-	-	+	-	+	-	-	-	-	15
O55	GM	-	-	-	Ninguno	+	+	+	-	-	+	+	-	-	8
O58	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	-	-	+	-	-	+	-	+	ND
O59	Ninguno	-	-	-	Ninguno	+	+	-	-	-	+	+	-	-	ND
O61	E	+	-	+	iMLSB	+	-	-	-	+	-	-	-	+	30

En ninguno de los aislamientos se detectaron los genes *ermB*, *clfB*, *sec* y *etb*.

* mec A Contenido en el casete tipo II

O, aislamiento; FOX, cefoxitina; CC, clindamicina; E, eritromicina; GM, gentamicina; CIP, ciprofloxacino; ermA, erythromycin ribosomal methylase A; ermB, erythromycin ribosomal methylase B; iMLSB, MLSB inducible; cMLSB, MLSB constitutivo; *clfA*, factor de aglutinación A; *hla*, α -hemolisina; SpA, proteína A; *fnbA*, proteína de unión a fibronectina A; *femA*, FemA; *fnbB*, proteína de unión a fibronectina B; *cna*, proteína de unión a colágeno; *pvl*, proteína de Panton Valentine; *tst*, toxina de choque tóxico-1; *eta*, enterotoxina A; *spa*, proteína A; CC8, Complejo clonal 8; CC5, complejo clonal 5; CC45, complejo clonal 45; CC30, complejo clonal 30; CC15, complejo clonal 15, ND no determinado; +, positivo; -, negativo.

Discusión

Este es el primer estudio en México de las características clínicas, microbiológicas y factores de virulencia de aislamientos de *S. aureus* en infecciones osteoarticulares en población pediátrica.

En esta serie existió un predominio en hombres, similar a lo reportado en otros estudios en un rango de 56-66%.^{35,46,47} Los adolescentes fueron el grupo más afectado, distinto a lo que informa la literatura donde el 50% de los casos ocurren en menores de cinco años; en pacientes con IOA por *S. aureus* la mediana de edad reportada fue de 7.5 años.^{35,46,47}

La mayoría de los pacientes de este trabajo fueron previamente sanos, dato no registrado con anterioridad, lo cual sugiere que otros factores de riesgo como colonización transitoria o definitiva de *S. aureus*, pérdida de integridad de la piel, traumatismo, deportes de alto contacto y hacinamiento pueden estar relacionados en el desarrollo de IOA en pacientes sin comorbilidades.

La frecuencia del antecedente de trauma se registró del 11-43%.^{35,46} En este estudio el antecedente de traumatismo se documentó en el 50% de los casos siendo golpe directo y caída de propia altura los predominantes. De acuerdo con Cunningham y colaboradores, el traumatismo local origina hematomas y necrosis, incrementando la susceptibilidad a la infección durante una bacteremia transitoria, específicamente en IOA por *S. aureus* se ha relacionado con la propensión de esta bacteria a colonizar la piel lesionada.¹¹ Lo anterior refleja la necesidad de interrogar de forma rutinaria este antecedente que no es reportado de forma rutinaria en los estudios de IOA en pacientes pediátricos.

La mayoría de los pacientes con IOA por *S. aureus* se presentaron con osteomielitis en 65%, comparable a lo descrito en India de 66%.⁴⁶ En tanto, que la artritis séptica se diagnosticó en el 35%, este dato fue similar a lo reportado en estudios previos 33%.⁴⁶ En la literatura, no se define de forma rutinaria el sitio de infección de las IOA por *S. aureus*, los datos obtenidos en este trabajo explican la detección de ciertos factores de virulencia y la fisiopatología según el tipo de IOA, cuadro clínico y temporalidad de la enfermedad.

En la actualidad existen más de 13 clasificaciones de osteomielitis, una de las más utilizadas es la que las clasifica de acuerdo a su temporalidad.¹⁸ En esta serie existió predominio de los cuadros agudos (65%), seguido de subagudos (25%) y en menor frecuencia los crónicos (10%). Muchos de los reportes de casos y las series no identifican la temporalidad de las osteomielitis, lo cual refleja la necesidad de crear guías de diagnóstico de esta patología y un abordaje multidisciplinario; ya que *in vitro* se ha documentado que la presencia de los distintos factores de virulencia se modifican según la fase del crecimiento de *S. aureus*,¹¹ por lo que es necesario realizar estudios clínicos para correlacionar lo previamente descrito, e identificar su relación con la fisiopatología y gravedad de esta enfermedad.

En este trabajo, la mediana de evolución de los síntomas previa al ingreso fue de 10 días a diferencia de trabajos que reportan (mediana de 4.2 días).^{37,46} En osteomielitis la presentación es insidiosa y se asocia a un retraso en el diagnóstico, por lo que se requiere de una elevada sospecha clínica con referencia temprana para realizar una identificación oportuna, dar tratamiento antibiótico dirigido y disminuir las complicaciones asociadas.

Los principales signos y síntomas en IOA fueron edema, aumento de temperatura local, dolor y limitación al movimiento similar a lo reportado en otros estudios en donde estos signos y síntomas se presentaron en el 100%.⁴⁶ El dolor intenso (EVA >8) fue un dato clínico observado en los pacientes con *S. aureus* productores de la toxina PVL por lo que ante la presencia de este síntoma debemos considerar brindar un tratamiento dirigido de antibiótico combinado a base de penicilina antiestafilocócica y clindamicina este último para inhibir la síntesis de toxina PVL con la finalidad de disminuir las complicaciones asociadas.

La fiebre es un signo clínico tardío y su ausencia no descarta IOA. En este estudio la fiebre se presentó en el 38.4% (mediana de 38.3 °C) y 71.4% (mediana de 38.9°C) de los casos en osteomielitis y artritis séptica, respectivamente. La magnitud de la fiebre se ha relacionado con el patógeno identificado, predominando los reportes de su asociación con SAMR; sin embargo, en esta serie donde existió un predominio de SAMS; los picos más altos de temperatura y duración prologada se presentaron con los aislamientos en los que se detectaron los factores de virulencia como PVL y ambos factores de unión a fibronectina; lo

que podría suponer que estos factores tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria y producción de fiebre.

En cuanto a la duración de la fiebre, se ha documentado que los pacientes con IOA por SAMR presentan mayor número de días con fiebre al compararse con SAMS.⁴⁸ En este trabajo la mediana fue de 7 y 6 días en osteomielitis y artritis séptica, respectivamente. El factor de virulencia PVL y ambos *fnb* se identificaron en las cepas de los pacientes con fiebre prolongada por lo que podría considerarse un marcador de enfermedad grave y ante este signo clínico la confirmación de diagnóstica de PVL amerita la administración de tratamiento con clindamicina y procedimiento quirúrgico inmediato para disminuir la producción de toxinas, limitar el daño local y complicaciones asociadas.

La relación de fractura en la presentación inicial se observó en dos pacientes y se identificaron los factores (ClfA, FnbA, PVL y Hla). Las infecciones por SAMS productores de PVL se han asociado a necrosis, apoptosis de las células y gravedad lo cual podría explicar el daño óseo en la presentación inicial.⁴⁹ La toxina Hla es un factor asociado con gravedad en la fase aguda de la enfermedad y su papel en las infecciones osteoarticulares no está aún establecido. El *fnbA* se encontró en ambos aislamientos y es un factor que se asocia a la internalización y persistencia de la infección ósea. La combinación de estos factores y los mecanismos de invasión osteoarticular pueden explicar el daño óseo importante, sin embargo, son necesarios más estudios para evaluar la combinación de estos factores y la gravedad en IOA. Estudios previos han reportado la fractura patológica en el 5% de los casos de osteomielitis por *S. aureus* del pulsotipo USA300.0114.⁵⁰ El dato anterior no fue observado en nuestro estudio, lo cual podría explicarse diferencias en la epidemiología molecular de *S. aureus* en nuestro país y por el número limitado de pacientes.

En este estudio, los principales huesos afectados fueron tibia y fémur (25-30%) comparable a datos registrados en la India.³⁷ En un estudio en Grecia, los principales huesos fueron cadera y fémur en 17.9-20.3%.³⁵ Lo anterior podría asociarse a que en estos pacientes el antecedente de traumatismo ocurrió en el 50% de los casos y la elevada vasculatura en los huesos largos ocasiona la predilección por la lesión en estos sitios.

La biometría hemática es el paraclínico inicial que debe de realizarse en todos los pacientes con sospecha de IOA. La leucocitosis no es un hallazgo característico de osteomielitis (12-36%) y su ausencia no la descarta.¹¹ En nuestro estudio, el 23.1% de los pacientes tuvieron leucocitosis en otras series de IOA, la leucocitosis puede alcanzar 79%; sin embargo, no se realiza la diferenciación de la patología osteoarticular.⁴⁶ En esta serie la leucocitosis con neutrofilia se presentó en los aislamientos con *fnb* y *mecA* siendo factores a considerar en pacientes con enfermedad grave. La literatura reporta que los pacientes con infección por *S. aureus* con PVL pueden presentar leucopenia;² en esta serie, la linfopenia se documentó en un aislamiento sin relación con la producción de la toxina PVL, lo cual sugiere que otros factores de virulencia pueden estar relacionados por orden de frecuencia en *tst*, *hla*, *clfA*, *fnb* y *spa*.

La PCR es un reactante de utilidad en la fase aguda de la osteomielitis. Se debe de solicitar previo a la realización del procedimiento quirúrgico y su disminución respecto al valor inicial permite evaluar la respuesta óptima al tratamiento además de ser un auxiliar para determinar una transición temprana a la vía oral del antimicrobiano con la finalidad de disminuir las complicaciones asociadas como una estancia hospitalaria prolongada y la resistencia antimicrobiana.³⁸ En este estudio, el 61.5% de los pacientes presentó una PCR inicial elevada (mediana 2 mg/dL), similar a lo reportado en la literatura en donde su elevación se presenta en el 43.7-80.5% de los casos.³⁸

En los pacientes con cepas portadoras de *cna* y *tst* se presentó PCR inicial elevada con valores de 2.5 y 9.34 mg/dL, respectivamente. Este dato puede dar una elevada sospecha diagnóstica de la producción de estos factores de virulencia ya que se asocian a elevada respuesta inflamatoria.

La VSG es el mejor parámetro diagnóstico de OM (S 70-100% E 60-96%)³⁸ en este estudio, el 76.9% de los pacientes tuvieron VSG elevada (mediana de 51.500 mm³). El pico máximo se ha asociado a SAMR y artritis séptica asociada.²⁹ La VSG elevada se detectó en los pacientes infectados con aislamientos en los que se detectaron *cna*, *pvl*, *mecA*, *fnbA* y *fnbB*. Lo anterior sugiere que este marcador se encuentra con mayor elevación con factores de virulencia asociados a gravedad de la infección.

En un estudio realizado por Davis y colaboradores, en 2018, las IOA por SAMR presentaron al inicio del padecimiento marcadores inflamatorios elevados como PCR, VSG, temperatura y conteo total de neutrófilos.⁴⁸ En esta serie al existir un predominio de cepas de SAMS, la elevación de parámetros inflamatorios se detectó en pacientes con *S. aureus* que tenían genes de factores de virulencia (*cna*, *tst*, *pvl*, *mecA*, *fnbA* y *fnbB*) reportados en la literatura en asociación con una respuesta inflamatoria elevada, internalización de la bacteria en los osteoblastos y gravedad.⁴⁸

Establecer el agente etiológico de la IOA es importante para administrar el tratamiento antimicrobiano adecuado. El estándar de oro para el diagnóstico de estas patologías es el cultivo; sin embargo, a pesar de la toma adecuada de hemocultivo, cultivo de líquido articular, secreción y hueso durante el abordaje diagnóstico de las infecciones osteoarticulares, en el 20-70% de los casos no se logra identificar el agente etiológico.⁵¹ En este estudio se obtuvo identificación del agente etiológico en el 80% de los casos gracias a la utilización de técnicas de biología molecular y la inoculación de la muestra en frascos de hemocultivo anaerobios lo cual permitió identificar los microorganismos a pesar del uso de antibiótico previo.

Las complicaciones en pacientes con IOA por *S. aureus* se han reportado en 9.4% si bien se ha descrito que el origen es multifactorial; la fiebre prolongada, el grupo *agr* III y el retraso en el control del proceso infeccioso se han asociado a su desarrollo.⁵⁰ En este estudio el 40% de los pacientes desarrollaron complicaciones, en estas cepas se identificaron *pvl* y ambos *fnb*. Estudios previos han descrito un predominio de complicaciones, estancia hospitalaria prolongada y costos elevados en IOA por SAMR al compararse con SAMS.^{35,48} Sin embargo, en nuestro estudio, las complicaciones también se observaron en los pacientes con aislamientos de SAMS, en aquellos que se detectó SAMS con *pvl*, los datos de gravedad fueron mayores como extensión local, piomiositis y émbolos sépticos. A diferencia de lo reportado en la literatura ningún paciente con SAMS con *pvl* presentó bacteriemia o ingreso a Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP), lo anterior puede ser explicado ya que la mayoría de los pacientes no contaban con comorbilidades y fueron aislamientos adquiridos

en la comunidad. Otros genes como *hla*, *cna* y ambos *fnb* se identificaron en cepas de pacientes con extensión local; en la actualidad se están desarrollando futuros blancos terapéuticos para factores de unión a fibronectina A para prevenir la gravedad de las infecciones por *S. aureus* por lo que los datos de este estudio podrían ser de utilidad para valorar la utilidad de estos tratamientos según la detección de los genes en pacientes con IOA.

Como expresan Davis y colaboradores, los pacientes con IOA por SAMR ameritan mayor número de procedimientos quirúrgicos al compararlos con aquellos infectados por SAMS (35.89 vs 31.46%).⁴⁸ En este estudio, los pacientes con SAMS con *pvl*, *fnb* y *cna* tuvieron un mayor número de procedimientos quirúrgicos lo cual podría explicarse por la gravedad, internalización a osteoblastos y predilección por la presentación con infecciones articulares. Son necesarios más estudios clínicos para apoyar la presencia de estos factores con gravedad clínica.

La estancia hospitalaria reportada en la literatura es mayor en los pacientes con aislamientos de SAMR con una mediana de 6.59 (6.25-6.92) y 5.21 (4.99-5.42) días en SAMS.⁴⁸ En esta serie, la estancia hospitalaria fue de 17 días con un rango de (4-47) en osteomielitis y de 27 días (6-46) en artritis séptica, lo anterior es multifactorial (huésped, microorganismo y respuesta al tratamiento médico y quirúrgico); sin embargo es necesario la identificación de factores de virulencia como PVL y estudiar otros que sólo o en conjunto pudieran estar relacionados con gravedad y estancia hospitalaria prolongada. En estudios experimentales, la mayoría de los factores han provocado una respuesta inflamatoria elevada, alteración de la respuesta inmune del huésped, estos datos sugieren que pueden contribuir a la gravedad de estas infecciones independientemente de la resistencia a meticilina.

En este trabajo, la fractura posterior se presentó en dos pacientes. Con base en lo descrito por McNeil y colaboradores, a mayor número de procedimientos quirúrgicos ocurren más fracturas patológicas siendo más evidente cuando se realizan más de tres procedimientos.⁵⁰ En este estudio, solo un paciente con fractura posterior requirió cuatro procedimientos quirúrgicos. Estos hallazgos requieren más investigación ya que pueden no ser el único factor

asociado, la realización de múltiples debridamientos quirúrgicos en el hueso podría debilitar la corteza, así como el grado de enfermedad pueden predisponer a fractura.

S. aureus es el principal agente etiológico de infecciones osteoarticulares en pediatría, la expresión de diversos factores de virulencia le permite invadir los tejidos, evadir la respuesta inmune del huésped y evitar la penetración de los antibióticos a las células.⁹ En este estudio existió un predominio de *S. aureus* como agente causal de IOA (40%); parecido a lo reportado en Argentina (62%)⁶¹, España (63%)²⁷ y Fiji (81-86%).⁵³

El 95% de los aislamientos en esta serie fueron de SAMS; sin embargo, existen variaciones geográficas en su prevalencia. Datos similares muestran un predominio de SAMS en las IOA, como lo reportado en trabajos realizados en Finlandia y Fiji 100%,^{53, 35} España 98%,²⁷ EE.UU. 72.6%,⁵⁶ Grecia 67.3%³⁵ y Australia en 60%.⁵⁸ En otros países se han informado frecuencias menores de SAMS como en la India, donde la prevalencia de SAMS fue menor de 45%,⁴⁶ Argentina 20%⁶¹ e Italia 16.5%⁵⁴. En el INP utilizamos como tratamiento empírico en las IOA dicloxacilina o cefalosporinas de primera generación (C1G), esta estrategia terapéutica es la adecuada debido al predominio que existe de SAMS; lo anterior refleja la importancia de individualizar el esquema antimicrobiano empírico según la epidemiología presente en cada centro hospitalario.

El único aislamiento identificado en esta serie como SAMR tuvo el elemento SCCmec tipo II que se asocia a infecciones por HA-SAMR y en el análisis epidemiológico fue una IAAS, este hallazgo es distinto a lo reportado en Grecia, Suecia y Suiza en donde el elemento SCCmec tipo IV,³⁵ (88%), se relacionó con la emergencia de CA-SAMR.³⁵ En los últimos años, CA SAMR ha emergido como un patógeno de importancia en la comunidad a nivel mundial.⁵⁷ Distintos estudios han demostrado que las infecciones por SAMR son más virulentas e invasivas que las de SAMS.⁶⁷ Las infecciones osteoarticulares por SAMR se asocian a estancia hospitalaria prolongada, mayor número de intervenciones quirúrgicas, complicaciones y mortalidad.⁶⁷ En este estudio se observó un predominio de SAMS y la gravedad e invasividad de las cepas de *S. aureus* se puede explicar por la producción de distintos factores de virulencia contrario a lo reportado en la literatura donde la gravedad se

relaciona con la resistencia a meticilina. La producción de los factores de virulencia por SAMS favorece a la evasión del sistema inmune, internalización en los osteoblastos y formación de biofilm convirtiendo a estas infecciones en un reto terapéutico.

La clindamicina es un antibiótico efectivo contra *S. aureus* y su utilización como tratamiento empírico es limitado ya que algunas series revelan porcentajes de resistencia variable del 2.1-40%.^{35, 46} Su utilización como tratamiento empírico se recomienda en regiones con elevada prevalencia de SAMR, pero con una resistencia <10-15% a clindamicina, de ahí la importancia de considerar los datos de la epidemiología local. La resistencia en este estudio fue del 15%, tomando en cuenta que el fenotipo iMLS_B se identificó en dos aislamientos y cMLS_B en uno; la utilización rutinaria empírica de clindamicina en nuestro centro puede asociarse a falla terapéutica, por lo tanto los esfuerzos deben dirigirse a la correcta detección de todos los cultivos resistentes a MLS_B utilizando pruebas de laboratorio adecuadas. Finalmente, es una excelente opción terapéutica en los aislamientos de *S. aureus* que son susceptibles debido a su excelente penetración a tejido óseo, actividad en la inhibición de las toxinas como PVL y efectividad intracelular.⁴⁹

La resistencia a eritromicina en *S. aureus* se reporta del 13-67%^{35, 46}. En este estudio fue del 15% (tres aislamientos), en todos ellos se identificó el gen *ermA*. No hay evidencia de efectos bactericidas intracelulares significativos de los macrólidos en las IOA de ahí que no sean antibióticos de utilidad en esta patología.⁴⁹

Con respecto a ciprofloxacino en este estudio el 15% de los aislamientos fue resistente a este antimicrobiano, en otras series esta frecuencia se reporta entre 1.3 y 48%.^{35, 46} Este dato es importante ya que como parte del abordaje de pacientes con IOA se realiza un gammagrama con ciprofloxacino y se debe de considerar la epidemiología local de los patrones de susceptibilidad de este fármaco al interpretar estos estudios en el abordaje diagnóstico de los paciente ya que se pueden identificar estudios falsos negativos al radiofármaco por lo que ante una elevada sospecha diagnóstica se debe de considerar la realización de estudios complementarios para confirmación diagnóstica.

En este estudio, la resistencia a gentamicina fue de 5%, este antibiótico no ha demostrado actividad intracelular significativa en el tratamiento de IOA por *S. aureus* y no tiene indicación en el tratamiento de este tipo de infecciones.⁴⁹

Independientemente de la resistencia de otros antibióticos, todos los aislamientos fueron susceptibles a trimetoprima/sulfametoxazol, linezolid, vancomicina y teicoplanina, similar a lo reportado en Grecia³⁵ y Hawaii.⁴⁷ El trimetoprima/sulfametoxazol ha mostrado un incremento en la resistencia a nivel mundial con reportes de hasta el 24%⁴⁶ Lo anterior, es un problema emergente ya que ha aumentado su utilización debido al predominio de SAMR en algunas regiones.

En esta serie al tener un predominio de SAMS de origen comunitario desde el punto de vista terapéutico, el principal objetivo del tratamiento es el detectar factores de virulencia toxigénicos o de adhesión que favorecen a la internalización del microorganismo y se asocian a gravedad y recurrencia. Lo anterior con la finalidad de dar tratamiento antibiótico combinado con un inhibidor de la producción de toxinas. A diferencia de lo reportado en pacientes con SAMR -HA los cuales presentan resistencia a otros antibióticos como fluoroquinolonas (75-100%), gentamicina (59-100%), clindamicina (60-100%), eritromicina (71-100%), TMP/SX (30-97%) y el tratamiento de elección en estos casos en vancomicina.

24

Los factores de adhesión (FnBPA, , Cna, ClfA y ClfB) se relacionan directamente en la patogénesis de las infecciones osteoarticulares mediante el tropismo por el hueso y la colonización por los tejidos periprotéticos.^{35,55} En este estudio, ClfA fue el principal factor identificado (95%) independiente de la resistencia a meticilina, opuesto a lo reportado en la literatura en donde existe un predominio en la detección de ClfA en SAMS 100% vs 84.6% en SAMR.³⁵ Lo anterior demuestra la importancia de este factor de adhesión en la patogénesis de las infecciones osteoarticulares. En este trabajo se detectó en todos los aislamientos de artritis séptica, como lo hace notar en modelos experimentales Palmqvist y colaboradores al demostrar que ClfA es un factor artritogénico.^{13, 36}

ClfA se encuentra durante todo proceso de crecimiento bacteriano, mientras que la proteína ClfB solo se expresa en la fase temprana de crecimiento exponencial.^{1,39} En este trabajo no se detectó al gen *clfB* y el gen *clfA* predominó en los *S. aureus* relacionados con presentaciones agudas. Se necesitan más estudios para identificar la función de ClfB en las IOA ClfA participa en la invasión detectándose en las fases agudas de la infección permitiendo la adhesión y colonización de *S. aureus* en el tejido óseo.

La mayoría de los *S. aureus* son portadores de ambos genes *fnb* y no existe diferencia en la adherencia al detectarse uno o ambos.²⁷ En los aislamientos clínicos obtenidos de osteomielitis, los genes *fnbA* y *fnbB* se han reportado en 98% y 99%, respectivamente.³² En el estudio de Bouras y colaboradores, la detección de *fnbB* fue mayor con significancia estadística en SAMR 80.8% vs SAMS 50%.³⁵ En este trabajo la detección de los genes fue menor *fnbA* (55%) y *fnbB* (25%) y predominaron en las presentaciones agudas de las IOA. Si bien estos factores median la colonización y son cruciales para el establecimiento de la infección e internalización de *S. aureus* a los osteoblastos, la menor frecuencia en este trabajo se puede explicar ya que sólo detectamos el gen y no la expresión del mismo por lo que se requieren estudios posteriores para identificar la relación de estos factores con la temporalidad de las IOA.

Como lo hace notar Peacock y colaboradores al estudiar 163 cepas de pacientes infectados por *S. aureus*, la enfermedad invasiva se asoció a la presencia de ambos genes *fnbB*.²⁷ En aislamientos clínicos obtenidos de osteomielitis, los genes *fnbA* y *fnbB* se han asociado con mayor virulencia (más producción de IL-6, mortalidad y pérdida de peso) contrario a lo descrito en artritis séptica.³² En este estudio la detección de ambos genes fue únicamente en tres cepas con predominio en artritis séptica, las cuales presentaron fiebre elevada (mediana de 39 °C), dolor intenso, leucocitosis y complicaciones asociadas como piomiositis y extensión de la infección. Es necesario un mayor número de muestras para valorar la invasividad de los aislamientos y considerar que la utilización de exámenes de laboratorio auxiliares como la medición de IL-6 en esta patología puede ser de utilidad para valorar la gravedad en esta patología y en un futuro desarrollar terapias dirigidas o vacunas.

Se ha demostrado que la síntesis de estos factores ocurren durante la fase exponencial del crecimiento y se modifican en la fase estacionaria por proteasas.²⁷ Es complicado predecir cuál fase es relevante para la enfermedad en el humano ya que no se conoce por completo *in vivo* la expresión de *fnbB* y de las proteasas.²⁷ Algunos estudios han sugerido que la fase estacionaria es importante por las modificaciones en las proteínas de unión a fibronectina por la Proteasa V8; sin embargo, se requieren estudios clínicos para validar esta información.²⁷ El papel de ambas *fnb* en la patogénesis es crucial para definir las propiedades inmunológicas y el potencial uso de estos factores en el desarrollo de vacunas.²² La región A de los factores de unión a fibronectina parece ser un componente promisorio para el desarrollo de vacunas, pero se necesitan más estudios para apoyar esta teoría. En este estudio no se evaluó biofilm y es un área de oportunidad para futuras investigaciones ya que los factores de unión a fibronectina se han relacionado directamente con su formación.

La proteína Cna ha demostrado ser importante en la patogénesis de osteomielitis y artritis séptica debido a la capacidad que tiene de unirse al colágeno.^{11, 61} El 90% de la matriz ósea está compuesta por colágeno; sin embargo, solo el 38-56% de los aislamientos de *S. aureus* asociados con infecciones óseas expresan Cna.⁵⁸ En esta serie el gen *cna* se detectó en el 15% de los aislamientos predominando en los casos de artritis séptica y por temporalidad se detectó únicamente en la fase aguda, lo cual refleja la importancia de este factor de virulencia en las infecciones articulares y en la primera etapa de la adhesión y colonización de las IOA. Es necesario la realización de estudios clínicos con un mayor número de pacientes para una mejor caracterización de su fisiopatología en estas infecciones. El menor número de casos en esta serie se explica ya que este factor se ha descrito principalmente en pacientes con infecciones asociadas a dispositivos, situación poco frecuente en la etapa pediátrica.

La proteína A se ha asociado a la patogenesis de osteomielitis *in vitro*, induce apoptosis, inhibe la capacidad de mineralización de los osteoblastos, incrementa la resorción ósea durante la osteomielitis por *S. aureus* y promueve la infección crónica.^{52,44} En esta serie el gen *spA* se identificó en 70% de los aislamientos, se observó principalmente en cepas aisladas de osteomielitis y en la fase aguda de la enfermedad. Lo anterior se relaciona con la internalización de *S. aureus* en los osteoblastos.

La citotoxina Hla contribuye a la patogénesis de osteomielitis y al desarrollo de complicaciones extraóseas en modelos animales.⁵² En la detección de Hla existe diferencia entre SAMS y SAMR.³⁷ En esta serie se identificó el gen *hla* en 70% con un predominio en las fases agudas de la enfermedad y en complicaciones como extensión de la infección, piomiositis, osteomielitis crónica y TVP. Hla es una toxina potente implicada en la lesión del cartílago, hueso y músculo. Además, durante la infección por *S. aureus*, existe un incremento sistémico de la interleucina (IL-6) dependiente de la Hla, lo cual origina una gran cantidad de resorción ósea.

El papel sinérgico y secuencial de Hla y PVL se han observado en modelos animales, reflejando la complejidad de la patogénesis de *S. aureus*.⁶⁵ En este estudio los factores de invasión (Hla y PVL) se detectaron en el 75% de las cepas, con predominio de Hla en fases agudas y PVL en crónicas y se identificaron en los aislamientos de pacientes con complicaciones. Lo anterior confirma el papel de PVL en la extensión local de osteomielitis mientras que Hla es un factor de virulencia mayor en la diseminación de la infección y mortalidad.

En ningún aislamiento de IOA se detectaron los genes *clfB*, *etb* y *sec*. No hay datos de la detección de estos factores de virulencia en IOA en la literatura internacional se requiere un mayor número de muestra para identificar la participación de estos factores en este tipo de infecciones.

Viquez -Molina y colaboradores compararon la prevalencia de factores de virulencia como PVL, EtaA, EtbB y Tsst-1 en cepas de *S. aureus* de infecciones del tejido blando y osteoarticular.³⁷ No encontraron diferencias significativas en los perfiles de los genes de virulencia excepto por la elevada prevalencia de Pvl en cepas de infección de tejidos blandos.

³⁷ En este estudio en las fases agudas de las infecciones osteoarticulares existió una mayor detección de factores de virulencia predominando los de adhesión *clfA*, *fnbA*, *spa*, seguido de exoenzimas principalmente *hla* y *femA*.

El gen *femA* fue característico de los *S. aureus* en este estudio se identificó en 45% de las cepas, si bien su implicación en las IOA no se ha caracterizado, se ha relacionado con un incremento en la frecuencia en aislamientos de SAMR y por ser un gen esencial para la expresión de resistencia de alto nivel a meticilina; sin embargo, en este estudio solo se detectó en aislamientos de SAMS.

De acuerdo con Kim y colaboradores al estudiar 84 aislamientos de *S. aureus* la prevalencia de *tst* en IOA fue del 7.9%; detectandose en la etapa temprana de la infección y en asociación estadísticamente significativa con VSG elevada.⁶⁶ En esta serie *tst* se identificó en el 10% de las cepas, en la fase aguda de la enfermedad y en aritis séptica. La falta de asociación de datos sistémicos, elevación de reactantes de fase aguda y gravedad en este estudio puede ser secundario al tamaño pequeño de la muestra.

La infección osteoarticular por *S. aureus* productor PVL es una enfermedad emergente a nivel mundial. La producción de PVL se ha detectado tanto en los aislamientos de SAMS como en los SAMR.³⁸ Existen diferencias geográficas en su distribución; la mayoría de las cepas de *S. aureus*-PVL, en Europa, se han identificado como SAMS (9%-46%)^{23,25, 35} mientras que en EE. UU., predomina CA-SAMR (87%-100%) especialmente por la cepa USA-300.^{23,25,48, 60} En este estudio se detectó *S. aureus*-PVL L en el 20% de las cepas y todos fueron SAMS. En México, no se realiza la detección de la toxina de PVL de rutina por lo que los datos se encuentran subregistrados. Los pacientes infectados con cepas productoras de PVL presentan mayor duración de la fiebre, complicaciones graves y marcadores inflamatorios elevado.⁴⁸

Los genes que codifican las enterotoxinas Sea y Ses se han detectado con mayor frecuencia en úlceras grado 2-4 del sistema de clasificación de Wagner contrario a lo observado en úlceras grado I. Haciendo de ellos potenciales marcadores para diferenciar infección de colonización.³⁷ En un estudio realizado por Sourek y colaboradores, se estudiaron 264 cepas de *S. aureus* de pacientes con osteomielitis crónica y se identificó en el 30% una o más enterotoxinas de ahí que no se considere un factor patogénico mayor.¹¹

La epidemiología molecular de *S. aureus* en IOA en población pediátrica está poco caracterizada. En una revisión sistemática de 20 años, únicamente se han reportado cuatro artículos sobre la caracterización molecular de las IOA por *S. aureus*.⁵⁹ En el trabajo de Pimentel *et al.*, las clonas de SAMS fueron heteróneas contrario a las de SAMR con un predominio de las clonas ST80/CC80 PVL+ y ST8/CC8/USA300 PVL+, en Europa y EE.UU., respectivamente.⁵⁹ En este estudio se encontró policlonalidad con un predominio de CC8 seguido de CC5, CC45, CC15 y CC30.

Nuestro estudio tuvo varias limitaciones al contar con los datos de un solo centro hospitalario el número de pacientes fue limitado y no representa la epidemiología de las IOA en México. Lo anterior demuestra la necesidad de la realización de estudios multicéntricos para conocer la epidemiología, fisiopatología de *S. aureus* y los factores de virulencia en IOA en la población pediátrica de nuestro país. En este trabajo solo se identificaron frecuencias, se requieren estudios analíticos posteriores para buscar asociaciones entre los distintos factores de virulencia y los datos clínicos.

En ningún paciente ni familiar se investigó la colonización para detectar portadores y fuentes de la infección. Este dato puede ser de utilidad al realizar investigaciones futuras con el fin de identificar y conocer más del cambio epidemiológico de *S. aureus* en infecciones osteoarticulares.

Los factores de virulencia asociados a infecciones osteoarticulares reportados en la literatura son escasos y la mayoría identificados por modelos experimentales. Este es el primer estudio de IOA por *S. aureus* y factores de virulencia en población pediátrica en nuestro país. En esta serie únicamente detectamos el gen y no medimos su expresión, por lo que se requieren estudios para entender la influencia de los factores de virulencia en *S. aureus* y la relación con las distintas manifestaciones clínicas.

La exploración de nuevos tratamientos deberá ir de la mano con más estudios epidemiológicos de *S. aureus* en nuestro país, lo anterior permitirá detectar blancos

específicos para brindar terapia dirigida (anticuerpos específicos) e inclusive favorecerán al desarrollo de vacunas para prevenir tan devastadora enfermedad.

Es importante identificar los mecanismos que este microorganismo utiliza para adherirse al tejido óseo, evadir la respuesta inmune del huésped y producir daño en el huesped en espera de que dicha información permita la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

Finalmente, en pediatría las IOA son patologías olvidadas y afectan principalmente a pacientes sin comorbilidades. Se requiere de una alta sospecha clínica para realizar su detección temprana y un abordaje multidisciplinario para disminuir las complicaciones asociadas.

Conclusión

S. aureus fue el agente etiológico principal (40%) de las IOA en pacientes pediátricos. La resistencia a meticilina en *S. aureus* muestra variaciones geográficas y en nuestro conocimiento este es primer estudio que refleja la epidemiología de *S. aureus* en IOA y el predominio de SAMS en pacientes pediátricos en México. El único aislamiento con SAMR fue elemento SCCmec tipo II y CC5 asociado a infecciones hospitalarias. La distribución de CC en SAMS fue policlonal.

En todos los aislamientos se presentó al menos un factor de adhesión, ClfA fue el principal. En ningún aislamiento se detectaron los genes *clfB*, *etb* y *sec* se requieren estudios posteriores para identificar el papel de estos factores de virulencia en infecciones osteoarticulares. Este es el primer estudio clínico pediátrico con evidencia de detección del gen *tst* en IOA con artritis séptica, el papel en estas infecciones e implicaciones en la gravedad y tratamiento aún no se ha descrito.

La toxina PVL se presentó en cuatro aislamientos todos SAMS y asociados con extensión de la enfermedad, piomiositis, fiebre alta y de larga duración, en nuestro conocimiento este es el primer estudio en México de IOA con identificación de la toxina PVL. SAMS productor de PVL y ambos factores de unión a fibronectina presentan datos clínicos de gravedad y su

detección es prioritaria para dar tratamiento antibiótico dirigido, disminuir complicaciones y secuelas asociadas. En este estudio se observó un predominio de SAMS, y la gravedad e invasividad de las cepas de *S. aureus* se puede explicar por la producción de distintos factores de virulencia contrario a lo reportado en la literatura donde la gravedad se relaciona con la resistencia a meticilina.

Referencias

1. Pasachova G, Ramirez S, Munoz L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. NOVA. 2019;17 (32):25-38.
2. Tong S, Davis J, Eichenberger E, Holland L, Fowler J. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. Clin Microbiol Rev, 2015;28(3): 603-661.
3. Jin T, Mohammad M, Pullerits R, Ali A. Bacteria and Host Interplay in *Staphylococcus aureus* Septic Arthritis and Sepsis. Pathogens 2021;10(158):1-25.
4. Lacey K, Mulcahy M, Towell A, Geoghegan J, McLoughlin R. Clumping factor B is an important virulence factor during *Staphylococcus aureus* skin infection and a promising vaccine target. PLOS Pathogens 2019; 15(4):1-20
5. Jahamy H, Ganga R, Al Raiy B, Shemes S, Nagappan V, Sharma M, Riederer K, Khatib R. *Staphylococcus aureus* skin/soft-tissue infections: The impact of SCCmec type and Panton-Valentine leukocidin. Scand J Infect Dis. 2008; 40:601–606.
6. Bennett J, Dolin R, Blaser M. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. Novena Edición. Barcelona, España: Editorial Elsevier; 2021.
7. Dayan G, Mohamed N, Scully I, Cooper D, Begier E, Eiden J, Jansen K, Gurtman A, Anderson A. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. Expert Rev Vaccines 2016; 15 (11): 1373-1392.
8. Kong E, Jhonson J, Jabra M. Community-Associated Methicilin –Resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. PLOS Pathog 2016;12(10):1-7.
9. Shettigar K, Murali T. Virulence Factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. Eur J Clin Microbiol Infec Dis 2020;

39:2235-2246.

10. Pinilla G, Bautista A, Cruz C, Chavarro B, Navarrete J, Muñoz L, Gutierrez J. Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. NOVA, 2017;15(27):67-65
11. Cunningham R, Cockayne A, Humpherys H. Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. J Med Microbiol 1996; 44: 157-164.
12. Tam K, Torres V. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. Microbiol Spectr. 2019; 7 (2):1-34
13. Crusio W, Dong H, Radeke H, Rezaei N, Steinlein O, Xiao J. Advances in Experimental Medicine and Biology 1era Edición. Switzerland: Editorial Springer Nature; 2019.
14. Kavanagh N, Ryan E, Widaa A, Sexton G, Fennell J, O'Rourke S, Cahill K, Kearney C, O'Brien F, Kerrigan S. Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. Clin Microbiol Rev. 2018; 3:1-25.
15. Algammal A, Hetta H, Elkelish A, Alkhalifah D, Hozzein W, Bariha G, El Nahhas N, Mabrok M. Methicilin- Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic- Resistance, and Zoonotic Impact. Infect Drug Resist 2020; 13:3255-3265.
16. Hemmadi V, Biswas M. An overview of moonlighting proteins in *Staphylococcus aureus* infection. Arch Microbiol 2020:1-18.
17. Speziale P, Pietrocola G. The multivalent Role of Fibronectin- Binding Proteins A y B (FnBPA y FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in Host Infections. Front. Microbiol.2020; 11:1-13.
18. Tuchscher L, Löffler B. *Staphylococcus aureus* dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection. Curr Genet 2015:1-3.
19. Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandensch F, Vanhems P, Etienne J. Pediatric bone and joint infections caused by panton-valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. Pediatr Infect Dis J. 2007; 26: 1042–48.
20. Sharma-Kuinkel B, Mongodin E, Myers J, Vore K, Canfield G, Fraser C, Rude T, Fowler V, Gill S. Potential Influence of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 30 Genotype and Transcriptome on Hematogenous Infections. OFID. 2012; 12:64.73.
21. Lattar S, Tuchscher L, Caccuri R, Centrón D, Becker K, Alonso A, Barberis C, Miranda G, Buzzola F, Von Eiff C, Sordelli O. Capsule expression and genotypic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from a patient with chronic or acute osteomyelitis. Infect Immun 2009;77(5): 1968-75.
22. Josse J, Velard F, Gangloff C. *Staphylococcus aureus* vs Osteoblast: Relationship and consequences in Osteomyelitis. Front Cell Infect Microbiol 2015;5(85):1-17.

23. Lakhundi S, Zhang Kunyan. Methicilin- Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution and Epidemiology. Clin Microbiol Rev 2018; 31:1-103
24. Al-Mebairik N, El-Kersh T, Al-Shaikh Y, Marie M. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Rev Med Microbiol 2016, 27:50-56.
25. De Leo F, Kennedy A, Chen L, Wandenburg B, Kobayashi S, Mathema B, Braughton K, Whitney A, Villaruz A, Martens C, Porcella S, McGavin M, Otto M, Musser J, Kreiswirth B. Molecular differentiation of historic phage- type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*. PNAS 2011; 108:18091-96.
26. McCarthy A, Lindsay J. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. BMC Microbiol 2010;10(173):1-15.
27. Calvo C, Nuñez E, Camacho M, Clemente D, Fernandez- Cooke E, Alcobendas R. Epidemiology and Management of Acute, Uncomplicate Septic Arthritis and Osteomyelitis Spanish Multicenter Study. PIDJ 2016;35(12): 1288-1293.
28. Jin T, Zhu Y, Li J, Shi J, He X, Jing D, Xu Y. Staphylococcal Protein A, Pantón – Valentine Leukocidin and Coagulase Aggravate the bone loss and bone destruction in Osteomyelitis. Cell Physiol Biochem 2013; 32:322-333.
29. Post V, Whal P, Uckay I, Ochsner P, Zimmerli W, Corvec S, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. Int. J. Med Microbiol 2014: 1-12.
30. Tasse J, Trouillet-Assant S, Josse J, Martins-Simões P, Valour F, Langlois-Jacques C, Badel – Berchoux, Provot C, Bernardi T, Ferry T, Laurent F. Association between biofilm formation phenotype and clonal lineage in *Staphylococcus aureus* strains from bone and joint infections. PLoS ONE 2018;13(8): 1-11.
31. Weiss L, LansellA, Figueroa J, Suchdev P, Kirpalani A. Declining prevalence of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* Septic Arthritis and Osteomyelitis in Children: Implications for treatment. Antibiotics 2020; 9 (101): 1-11.
32. Wright A, Sean P, Nair P. Interaction of staphylococci with bone. Int J Med Microbiol 2010:193-204.
33. Goergens E, McEvoy A, Watson M, et al. Acute osteomyelitis and septic arthritis in children. J Paediatr Child Health. 2005;41(1-2):59–62.
34. Elasri M, Thomas J, Skinner A, Blevins S, Beenken E, Nelson C, Smeltzer S. *Staphylococcus aureus* Collagen Adhesin Contributes Pathogenesis of Osteomyelitis. Bone. 2002; 30:275-280.

35. Bouras D, Doudoulakakis A, Tsolia M, Vaki I, Giormezis N, Petropoulou N, Lebessi E, Gennimata V, Tsakris A, Spiliopoulou I, Michos A. *Staphylococcus aureus* osteoarticular infections in children: an 8-year review of molecular microbiology, antibiotic resistance and clinical characteristics. J Med Microbiol. 2018; 67:1753-1760.
36. Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald R, Josefsson E, Tarkowski A. Fibronectin- Binding Proteins and Fibrinogen- Binding Clumping Factors Play Distinct Roles in Staphylococcal Arthritis and Systemic Inflammation. JID. 2005; 191:791-98.
37. Viquez G, Aragón J, Pérez C. Virulence factor genes in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot soft tissue and bone infections. Int J Low Extrem Wounds. 2018; 17:36–41
38. Masters E, Trombetta R, Mesy K, Boyce B, Gill A, Gill S, et al. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm” “acute vs chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy”. Bone Res. 2019;7(20):1-18.
39. Butrico C, Cassat E. Quorum Sensing and Toxin Production in *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis: Pathogenesis and Paradox. Toxins 2020; 12:516:1-22.
40. Crémieux A, Saleh-Mghir A, Danel C, Couzon F, Dumitrescu O, Lilin T, Perronne C, Etienne J, Lina G, Vandenesch. α -Hemolysin, Not Pantone- Valentine Leukocidin, Impacts Rabbit Mortality From Severe Sepsis With Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. JID 2014;209: 1773-1780.
41. Muthukrishnan G, Masters E, Daiss J, Schwartz. Mechanisms of Immune Evasion and Bone Tissue Colonization That Make *Staphylococcus aureus* the primary pathogen in osteomyelitis. Curr Osteoporos Rep. 2019;17(6):1-10.
42. Garcia-Alvarez L, Holden M, Lindsay H, Webb C, Curran M, Walpole E, Brooks K, Pikard D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011; 11:595-603.
43. Wen Q, Gu F, Sui Z, Su Z, Yu T.. The process of Osteoblastic infection by *Staphylococcus aureus*. Int J. Med Sci. 2020; 17(10):1327-1332.
44. Widaa A, Claro T, Foster T, O'Brien F, Kerrigan S. *Staphylococcus aureus* Protein A Plays a Critical Role in Mediating Bone Destruction and Bone Loss in Osteomyelitis. PLoS ONE. 2012 ;7 (7): e40586.
45. Shi S, Zhang X. Interaction of *Staphylococcus aureus* with osteoblast (Review). Exp and Ther Med. 2012; 3:367-370.
46. Kini A. Shetty V, Kumar A, et al. Community- associated, methicillin- susceptible, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bone and joint infections in children: experience from India. J Pediatr Orthop B. 2013;22(2):158-166.
47. Erdem G, Salazar R, Kimata C, Simassathien T, Len K, Berget L, Melish M. *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis in Hawaii. Clin Pediatr. 2010;49(5):477-484

48. Davis W, Gilbert S. Comparison of Methicillin- resistant versus susceptible *Staphylococcus aureus* Pediatric Osteomyelitis. *J Pediatr Orthop*. 2018; 38(5):1-10.
49. Alder K, Lee I, Munger A, Kwon H, Morris M, Cahill S, Back J, Yu K, Lee F. Intracellular *Staphylococcus aureus* in bone and joint infections: A mechanism of disease recurrence, inflammation, and bone and cartilage destruction. *Bone*. 2020;1-17.
50. McNeil J, Vallejo J, Kok E, Sommer L, Hultén K, Kaplan S. Clinical and Microbiologic Variables Predictive of Orthopedic Complications Following *Staphylococcus aureus* Acute Hematogenous Osteoarticular Infections in Children. *Clin Infect Dis*. 2019;69(11):1955-61.
51. Searns J, Robinson C, Wei Q, Yuan J, Hamilton S, Pretty K, Donaldson N, Parker S, Dominguez S. Validation of a novel molecular diagnostic panel for paediatric musculoskeletal infections: Integration of the Cepheid Xpert MRSA/SA SSTI and laboratory – developed real-time PCR assays for clindamycin resistance genes and *Kingella kingae* detection. *J Microbiol Methods* 2019;1 56:60-67.
52. Rosanova M, Berberian G, Bologna R, Giménez S, Sarkis C, Buchovsky A, Pérez G, Pinheiro J, Lede R. Estudio descriptivo de infecciones osteo-articulares en niños en tiempos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de la comunidad (SARM-Co). *Rev Chil Infectol* 2015;32 (3):321-25.
53. Munshi B, MacFater W, Hill A, McCaig E. Paediatric Osteomyelitis in Fiji. *World J Surg*. 2018; 42:4118-4122.
54. Chiappini E, Camposampiero C, Lazzeri S, Indolfi G, De Martino M, Galli L. Epidemiology and management of acute haematogenous osteomyelitis in a tertiary paediatric center. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14. pii: E477.
55. Testoni F, Montanaro L, Poggi A, Visai L, Campoccia D, Arciola C. Internalization by osteoblasts of two *Staphylococcus aureus* clinical isolates differing in their adhesin gene pattern. *Int J Artif Organs* 2011; 34 (9):789-798.
56. Kok E, Vallejo J, Sommer L, Rosas L, Kaplan S, Hultén K, McNeil J. Association of vancomycin MIC and molecular characteristics with clinical outcomes in methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* acute hematogenous osteoarticular infection in children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62:e00084-18.
57. Martínez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hultén K, Hammerman W, Mason EO Jr, Kaplan SL. Community- Acquired, Methicillin-Resistant and Methicillin- Susceptible *Staphylococcus aureus* Musculoskeletal Infections in Children. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(8):701-706.
58. Brischetto A, Leung G, Marshall S, Bowen C. A retrospective case –series of children with bone and joint infection from Northern Australia. *Medicine* 2016;95(8): 1-8.
59. Araujo F, Monaco M, Del Grosso M, Pirolo M, Visca P, Pantosti A. *Staphylococcus aureus* clones causing osteomyelitis: a literature review (2000-2020) *J Glob Antimicrob Resist*. 2021; 26:1-20.

60. Hoppe P, Holzhauer S, Lala B, Buhner C, Gratopp A, Hanitsch L. Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children. *Medicine* 2019;98(38): e17185.
61. Urish K, Cassat J. *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis: Bone, Bugs and Surgery. *Infect and Immun* 2020;88(7):1-16.
62. Boye K, Bartels M, Andersen I, Møller J, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 725-727.