

T.D.

P/A1

REQUERIMIENTOS OPSONICOS Y
ADHERENCIA A CATETERES PLASTICOS
DE ESTAFILOCOCO COAGULASA NEGATIVO

Alvaro Pascual Hernandez

Junio 1985

R. 11.140



TELEFS. HOSPITAL 37 84 00 EXT. 1206
FACULTAD 37 31 98
APARTADO 826
SEVILLA - 9

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
Y MEDICINA PREVENTIVA

PROF. EVELIO J. PEREA

PROF. EVELIO J. PEREA PEREZ, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, como Director:

CERTIFICA:

que la presente Tesis Doctoral titulada "REQUERIMIENTOS OPSONICOS Y ADHERENCIA A CATETERES PLASTICOS DE ESTAFILOCOCO COAGULASA NEGATIVO" ha sido realizada por D. ALVARO PASCUAL HERNANDEZ bajo mi dirección, y reúne a mi juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener con ella el título de Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, expedimos el presente Certificado en Sevilla, a cuatro de junio de mil novecientos ochenta y cinco.

A large, stylized handwritten flourish or mark, possibly a signature or initials, located on the left side of the page.

A handwritten signature in cursive script, reading "Evelio J. Perea", written over a horizontal line.

Prof. Evelio J. Perea.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. E.J.Perea por su incansable dedicación en la dirección de esta tesis y por introducirme en el fascinante mundo de las relaciones parásito-huésped.

Al Prof. J.Verhoef que al abrirme las puertas de su Departamento me ofreció desinteresadamente su tiempo, sus conocimientos y un magnífico equipo de colaboradores.

Al Dr. A.Fleer por su estrecha colaboración día tras día durante meses y sus excelentes sugerencias y consejos.

A todo el personal del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Utrecht (Holanda) y del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Sevilla, que con su colaboración, sus ánimos y sus consejos han contribuido a la realización de éste trabajo.

A las Srtas. Mónica Pascual, Francisca Montero, Patricia Hidalgo y a D.Rafael Mañas por su magnífica asistencia en la transcripción y realización de las gráficas de ésta tesis.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

I N D I C E

	Pg.
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	13
MATERIAL	14
METODOS	22
Identificación de cepas	23
Determinación de la producción de sustancia mucoide	24
Determinación de la hidrofobicidad de superficie	25
Efecto de enzimas proteolíticos en la hidrofobicidad bacteriana	26
Efecto de la opsonización en suero y de diferentes componentes de el mismo en la hidrofobicidad	27
Fagocitosis en suspensión de bacterias marcadas con isótopos radioactivos por leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN)	28
Fagocitosis de bacterias adheridas a superficies plástica	35

Fijación de la fracción C3 del complemento a la superficie bacteriana	39
Quimioluminiscencia amplificada con luminol	41
Adherencia de bacterias a catéteres	45
Métodos estadísticos	49
RESULTADOS	50
Identificación de las cepas	51
Producción de sustancia mucoide	51
Estudio de la hidrofobicidad de superficie	54
Emisión de quimioluminiscencia por leucocitos polimorfonucleares humanos activados por ECN	56
Requerimiento opsonico de ECN y fagocitosis por leucocitos polimorfo- nucleares en suspensión	57
Efecto de la opsonización en la hidrofobicidad de superficie	65

Requerimientos opsónicos de ECN adherido a superficie plástica y fagocitosis por leucocitos poli- morfonucleares humanos. Estudio comparativo con <u>S.aureus</u>	69
Adherencia de ECN a catéteres de teflón y poliuretano. Modulación	78
DISCUSION	90
CONCLUSIONES	114
BIBLIOGRAFIA	120

INTRODUCCION

En las últimas décadas, las mayores innovaciones en el campo de la terapéutica se han centrado en el desarrollo de elementos protésicos, terapia inmunosupresiva de enfermedades malignas y agentes antimicrobianos de amplio espectro para la terapia de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, como respuesta negativa ante esta serie de avances terapéuticos, han surgido un número de patógenos nosocomiales, considerados previamente de escasa o nula virulencia en los humanos.

A esta lista, que incluye entre otros Serratia marcescens, Aspergillus fumigatus, Mycobacterium fortuitum..., tenemos que añadir estafilococo coagulasa negativo (ECN). Los tiempos en que el aislamiento de ECN en cultivo de exudados de heridas, sangre y catéteres era considerado automáticamente como contaminación, han terminado definitivamente y en la actualidad se le reconoce como un importante agente etiológico de infecciones en pacientes con catéteres intravenosos (1), bacteriemia en neutropénicos (2), endocarditis sobre válvulas protésicas (3) e infecciones en shunts de derivación en hidrocefalias (4,5), entre otras.

La taxonomía del género Staphylococcus ha sido renovada continuamente en los últimos años. En su inicio, el género Staphylococcus se dividió en función de la producción de la enzima coagulasa desde el momento en que se observó la relación entre la capacidad de producir esta enzima y su poder patógeno en humanos. De esta manera, se diferenció una especie productora de coagulasa y por tanto patógena en humanos

a la que se denominó S.aureus y el resto de especies que no poseían la capacidad de producirla y por lo tanto, sin aparente poder patógeno, fueron agrupadas como estafilococos coagulasa negativo, denominación que ha continuado hasta nuestros días.

A partir del reconocimiento general de su papel en patología humana, la taxonomía de ECN, ha sufrido importantes modificaciones, de tal manera, que los excelentes estudios de Baird-Parker (6), que solamente reconocían dos especies, S.epidermidis y S.saprophyticus, han quedado relegados en la actualidad. Posteriormente, Kloos y Schleifer (7,8), en función de estudios genéticos y bioquímicos, distinguen nueve especies diferenciadas. En la actualidad se admite la existencia de hasta 15 especies de ECN, aunque continuamente se proponen nuevas especies (9).

Clásicamente, sólo dos de ellas tenían importancia clínica: S.epidermidis y S.saprophyticus. El primero de ellos se considera el agente causal del 75 % de las infecciones atribuidas a ECN (10,11,12). S.saprophyticus es productor de infecciones del tracto urinario, predominantemente en mujeres jóvenes (13,14). Otras especies incluye: S.auricularis, S.capitis, S.cohnii, S.haemolyticus, S.hominis, S.lentus, S.sciuri, S.simulans, S.warneri, S.xylosum, S.intermedius y S.hyicus, que cada vez se van conociendo mejor.

En las últimas décadas, ECN ha emergido como patógeno significativo, particularmente en pacientes

que portan material protésico y catéteres intravasculares (1,3,5). Ultimamente, las septicemias por ECN se reconocen como una complicación frecuente y problemática en recién nacidos prematuros, en los que se utilizan con frecuencia prótesis intravasculares para monitorización y nutrición (15,16).

En adultos, las tromboflebitis y septicemias producidas por ECN, son complicaciones bien conocidas del uso de catéteres intravenosos, y aunque las consecuencias suelen ser menos graves que en neonatos, a veces también suponen una importante complicación (17).

Christensen y cols. encontraron a S.epidermidis como agente causal de una epidemia de septicemia nosocomial de 20 meses de duración, relacionada con el uso de catéteres de nutrición parenteral en Estados Unidos (1).

Otras epidemias relacionadas al uso de catéteres intravenosos han sido descritas en Estados Unidos (18), Canadá (19) y países europeos (20,21).

ECN y en particular S.epidermidis ha sido descrito como el agente etiológico más importante de peritonitis en pacientes que utilizan diálisis peritoneal crónica ambulatoria debido principalmente al uso de catéteres plásticos de diálisis, siendo el causante del 17 al 38 % de los episodios (22,23).

El incremento de las infecciones por ECN relacio-

nadas con el uso de catéteres plásticos, viene determinada por una serie de circunstancias de las que detallaremos las más importantes.

En primer lugar, hay una tendencia, cada vez más acentuada, a utilizar nutrición parenteral en pacientes graves y por largos periodos de tiempo. Para este tipo de alimentación, se utilizan vías plásticas que a veces se mantienen durante semanas. Paralelamente, cada vez es mayor el número de pacientes que se benefician de la diálisis peritoneal crónica ambulatoria y por periodos de tiempo más prolongados.

En segundo lugar, al ser ECN flora residente de la piel y puesto que los catéteres se insertan a través de ella, serán los principales contaminantes involucrados en estos procedimientos. Una vez introducido, se forma alrededor del catéter un manguito de fibrina que favorece la emigración de las bacterias desde el exterior al interior (24).

En tercer lugar, los sistemas de nutrición parenteral se utilizan frecuentemente en pacientes graves ingresados en zonas de fuerte presión antibiótica, lo que permite la colonización por cepas multirresistentes de ECN (25).

Finalmente, es importante resaltar la especial afinidad de ECN por colonizar las superficies de catéteres. Diversos autores, han observado "in vitro" alteraciones erosivas en la superficie del catéter tras la interacción con ECN (26). Por otro lado, se ha

descrito en cepas de ECN la producción de un polisacárido extracelular de naturaleza mucoide, al que se atribuyen propiedades de adherencia y protección frente a la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares (27). Estos hallazgos, podrían explicar parcialmente, la gran afinidad de ECN por el material protésico así como la gran dificultad para la erradicación de las infecciones producidas por estas bacterias, si no se retira previamente el cuerpo extraño.

Respuesta del huésped frente a estafilococo coagulasa negativo.

Con respecto a la interacción entre estafilococo y los factores de defensa del huésped, la piel y las membranas mucosas juegan un importantísimo papel de protección. Sin embargo, incluso en individuos sanos, estas barreras se rompen frecuentemente ofreciendo una puerta de entrada para estafilococos y otros habitantes de la piel que les permite alcanzar los tejidos subyacentes.

En este momento, entra en funcionamiento la segunda línea de defensa, que está representada por el sistema de opsoninas y las células fagocíticas (leucocitos polimorfonucleares y monocitos).

Una adecuada opsonización es un requisito indispensable para la ingestión por las células fagocíticas de estafilococo (28), demostrado por el hecho de que pacientes con defectos en el sistema de opsoninas

sufren infecciones estafilocócicas recurrentes.

El sistema de opsoninas está formado por unas opsoninas termoestables representadas por la Inmunoglobulina G (IgG) principalmente y unas opsoninas termolábiles representadas por la fracción C3b del complemento, que se unen a receptores específicos de la superficie bacteriana desencadenando el proceso de la fagocitosis una vez que entran en contacto con las células fagocíticas.

En el suero de individuos sanos, existen anticuerpos tipo IgG con capacidad opsonizante dirigidas frente a componentes de peptidoglicano y ácidos teicoicos de estafilococo que se pueden detectar si se utiliza una técnica suficientemente sensible (ELISA, Radioinmunoanálisis) (29,30). En pacientes con infección estafilocócica severa, tal como endocarditis, se detectan frecuentemente, niveles elevados de estos anticuerpos, que pueden ayudar en el diagnóstico de estas infecciones cuando los cultivos permanecen negativos.

Dentro de éste sistema de opsoninas termoestables, los anticuerpos tipo IgG dirigidos frente al peptidoglicano tienen mucha mayor capacidad opsonizante que aquellos dirigidos frente a los ácidos teicoicos. Sin embargo, actualmente existen evidencias de que el sistema de opsoninas termolábiles, representado por la fracción C3 del complemento, juega un papel de mucha mayor relevancia que las inmunoglobulinas en la fagocitosis de estafilococo (31.32).

En este sentido, el peptidoglicano de estafilococo es capaz de activar el complemento a través de la vía alternativa, activación por lo tanto no dependiente de anticuerpos, que se traduce en la aposición de moléculas de C3b opsonicamente activas en la envuelta celular (33).

Una vez opsonizado, estafilococo es fácilmente reconocido e ingerido por las células fagocíticas, especialmente por los leucocitos polimorfonucleares.

En la muerte intracelular de estafilococo, actúan los dos sistemas bactericidas de los leucocitos polimorfonucleares, un sistema independiente del oxígeno y representado por el contenido lisosomal (lisozima, proteínas catiónicas, lactoferrina...) y otro dependiente de oxígeno que se traduce en la producción de radicales tóxicos del mismo (radical superóxido (O_2^-), hidróxilo (OH.) etc...).

La importancia de los radicales tóxicos de oxígeno en la muerte intracelular de estafilococo se pone de manifiesto en los pacientes con Enfermedad Crónica Granulomatosa. Los granulocitos de estos pacientes son incapaces de generar estos radicales y su capacidad bactericida frente a estafilococo está muy reducida. Este fenómeno, demostrable fácilmente "in vitro", queda demostrado "in vivo" por el hecho de que estos pacientes sufren frecuentemente infecciones estafilocócicas recurrentes, aunque la severidad y la tasa de recurrencia varía ampliamente entre los distintos pacientes.

(34).

Llegado a este punto, debemos enfatizar el hecho de que para la mayoría de estos estudios sobre las defensas del huésped frente a estafilococo, se han utilizado cepas de S.aureus y sólo ocasionalmente algunas cepas de ECN.

Anteriormente mencionábamos cómo numerosos investigadores han demostrado la importancia de las opsoninas para una adecuada fagocitosis de estafilococo (28). Sin embargo, en sus trabajos empleaban normalmente, bacterias suspendidas en un medio acuoso. Si tenemos en cuenta la especial afinidad de ECN por adherirse a material plástico como el utilizado en la fabricación de catéteres, sería interesante preguntarnos cómo actuarían los mecanismos de defensa del huésped ante estas bacterias adheridas a una superficie y qué papel desarrollaría el sistema de las opsoninas.

El concepto de fagocitosis de "superficie", de gran interés actual por los problemas mencionados anteriormente, fue descrito e introducido en 1946 por Wood y cols. (35). Estos autores afirmaban que la fagocitosis de Streptococcus pneumoniae en los alveolos pulmonares era posible en ausencia de opsoninas cuando las bacterias estaban "atrapadas" en una superficie, lo que facilitaba la ingestión por parte de los macrófagos alveolares en una zona pobre de opsoninas (36,37).

En la década actual, resurge el interés por la fagocitosis de superficie, pero se presta muy escasa atención al problema en relación con estafilococo. Solamente los estudios de Lee y cols. (38,39) y Vandenbroucke y cols. (40) han demostrado que la fagocitosis de S.aureus adheridos a superficie plástica y de cristal, puede ocurrir en ausencia de opsoninas. Sin embargo, no han sido realizados hasta la fecha estudios similares utilizando cepas de ECN, que es el agente etiológico más importante en infecciones asociadas a catéteres y material protésico.

Otro problema al que se ha prestado escasa atención ha sido a la adherencia ECN al material plástico. Diferentes autores se atienen exclusivamente a estudios descriptivos utilizando microscopía electrónica (41,-42,43). Otra serie de autores han demostrado que la adherencia a catéteres plásticos está asociada a la producción de flebitis infecciosa en modelos experimentales (44). Sin embargo, existe escasa información sobre la verdadera naturaleza de la unión de las bacterias a las superficies plásticas y los mecanismos inespecíficos que en ella actúan. Se postula la importancia de las fuerzas hidrofóbicas en la adherencia de estafilococo a superficies altamente hidrófobas como las utilizadas en la fabricación de biomateriales tales como el teflón... (45,45). Sin embargo, aunque la hidrofobicidad puede promover la adherencia, son necesarios un mayor número de estudios para confirmar tal aseveración.

Valorando todos los problemas expuestos anteriormente y teniendo en cuenta la ausencia de estudios en este campo en el que se hayan utilizado gran número de cepas aisladas de muestras clínicas, fue por lo que decidimos la realización de este trabajo, con la intención de obtener una información concreta sobre la patogénesis de las infecciones producidas por ECN y especialmente aquellas relacionadas con el uso de catéteres plásticos.

La hipótesis de trabajo se basa en el estudio de los siguientes puntos:

1. Identificación en especies de 38 cepas de ECN aisladas en procesos patológicos infecciosos en los que tenían un papel etiológico.
2. Estudio de las propiedades de superficie de estas cepas que se relacionan directamente con la colonización de catéteres: producción de sustancia mucoide e hidrofobicidad de superficie.
3. Influencia de las propiedades de superficie de ECN en el metabolismo del leucocito polimorfonuclear durante la fagocitosis. Alteraciones cuantitativas en la emisión de quimioluminiscencia celular.

4. Modulación de la hidrofobicidad bacteriana por diferentes fuentes opsónicas y diversos tratamientos de las mismas.
5. Estudio de los requerimientos opsónicos de ECN suspendido en medio acuoso. Fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares humanos utilizando bacterias marcadas por isótopos radioactivos. Papel de la hidrofobicidad y de la sustancia mucoide.
6. Estudio de los requerimientos opsónicos y fagocitosis de ECN utilizando bacterias adheridas a superficie plástica. Comparación con cepas de S.aureus. Papel de la hidrofobicidad y producción de sustancia mucoide.
7. Estudio cuantitativo de la adherencia de ECN a catéteres intravenosos de teflón y poliuretano. Papel que juegan las propiedades de superficie bacterianas.
8. Modulación de la adherencia bacteriana a catéteres. Papel de diferentes componentes del suero.

M A T E R I A L
Y
M E T Ó D O S

Cepas bacterianas

Estafilococos coagulasa negativo. Se utilizaron un total de 38 cepas aisladas durante 1981 de hemocultivos de recién nacidos con septicemia, ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Pediatrico Universitario Reina Guillermina de Utrecht. (Holanda) (15).

S.aureus. Se utilizaron las siguientes cepas: S.aureus Evers, Stephens, 502 A, Carr, Cowan I, ésta última rica en proteína A y cuyas características han sido descritas con frecuencia previamente. También se utilizaron dos cepas aisladas de muestras clínicas.

Leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN).

En la totalidad de los experimentos se utilizaron leucocitos polimorfonucleares humanos aislados de donantes adultos sanos.

Medios de cultivo.

Agar Sangre (Difco)

Agar 25 gr

Proteasa peptona ... 5 gr

Triptona 5 gr

Cloruro sódico 5 gr
 Extracto levadura 2 gr
 Extracto carne 2 gr
 Casaminoácidos 1 gr
 Glucosa 0.5 gr.
 Agua destilada 1000 c.c.

. Caldo tripticasa soja (Difco)

Digerido pancreatico de caseina..... 15 gr.
 Digerido papaínico de semilla de soja.. 5 gr.
 Cloruro Sódico..... 5 gr.
 Agua destilada 1000 c.c.

Para el estudio de la producción de sustancia mucoide por estafilococo coagulasa negativo se suplementa con glucosa a una concentración final de 0,25 % (47).

. Caldo Mueller Hinton (Difco)

Infusión de carne 300 gr.
 Hidrolizado ácido de caseina 17,5 gr.
 Almidón..... 1,5 gr.
 Agua destilada 1000 c.c.

Para el marcaje radioactivo de bacterias se suplementa con adenosina a una concentración final de 0.5 % (47).

. Medio RPMI 1640 (Gibco)

Medio utilizado para cultivo de linfocitos, compuesto por gran cantidad de aminoácidos, coenzimas, vitaminas, sales y glucosa. Para su utilización con polimorfonucleares se suplementa con 2.2 gr/l de bicarbonato sódico, 1.19 gr/l de tampón HEPES; 100 ui/l de penicilina y 100 mcg/l de estreptomina (48).

Soluciones tampón.

- . Tampón fosfato salino. (PBS) pH 7.2
- . Solución salina equilibrada de Hanks pH 7.2

	PBS ^a	HANKS ^b
CaCl ₂ ·2G ₂ O	132.5 mg	18.5 mg
KCl	200.0 mg	40.0 mg
KH ₂ PO ₄	200.0 mg	60.0 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100.0 mg	-
NaCl	8000.0 mg	8000.0 mg
Na ₂ HPO	1150.0 mg	47.5 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	200.0 mg
NaHCO ₃	-	350.0 mg
Glucosa	-	1000.0
Rojo Fenol	-	17.0

a.- Para detener la opsonización en la prueba de fijación de la fracción C_3 , se adiciona con EDTA (Merck).

b.- Para su utilización con polimorfonucleares y específicamente para evitar la agregación espontánea y adherencia a las paredes de los viales, se adiciona con gelatina a concentración final de 0.1 %.

. Tampón citrato salino 0.2M pH 3.0

$C_6H_7O_7Na$42.8 gr.

ClH 1N.....115.0 ml.

Agua desmineralizada.....1000.0 ml.

Reactivos. Compuestos químicos y biológicos

Material radioactivo y líquido de centelleo

. (3H)-timidina, de actividad específica 5 Ci/mmol (Radiochemical Center. Amersham;U.K.).

. Cumene (Aqua Luma Plus, Lumac/3M; Holland). Líquido de centelleo especial para soluciones acuosas que lleva incluido el solvente orgánico.

Fuentes opsonicas y componentes de plasma

. Mezcla de sueros humanos. Obtenidos de 10 donantes sanos que fueron debidamente mezclados y distribuidos en alícuotas de 1 ml y almacenados a -70°C . Para estudiar la opsonización dependiente de la inmunoglobulina G (opsoninas termoestables), se calienta el contenido de un vial a 56°C durante 30 minutos destruyendo el complemento y anulando de esta forma la vía opsonica dependiente del complemento (opsoninas termolábiles).

. Suero agammaglobulinémico. Para estudiar la opsonización vía complemento se utilizó suero de un paciente con agammaglobulinemia tipo Bruton (49).

. Suero deficiente en la fracción C_3 del complemento. Para estudiar la opsonización vía IgG, se utilizó suero de un paciente con depleción completa e inducida genéticamente de la fracción C_3 (50).

. Albúmina humana (Behring A.G.; Germany).

. Fibronectina. Glicoproteína del plasma humano. (Seromed, Biochrom K.G.; Germany).

. Inmunoglobulina G (IgG) humana purificada. (Miles Laboratories Inc. USA.)

Enzimas proteolíticos

. Solución de pepsina. Se adiciona con pepsina (Fluka A.G.; Switzerland) solución tampón citrato salino 0.2 M (pH 3.0) hasta alcanzar una concentración final de 0.1 % (p/v).

. Solución de tripsina. 0.25 %. (Gibco Europe Ltd. Paisley; Scotland).

Reactivos para aislamiento de leucocitos.

. Dextrano. Para la sedimentación de eritrocitos se utiliza solución de Dextran (Pm 70.000; Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala; Sweden) al 6 % en suero fisiológico.

. Ficoll-Isopaque. Se utiliza para la separación de la serie blanca por gradiente de densidad. (Ficoll--Paque Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala; Sweden).

. NH_4Cl . Para la lisis de eritrocitos se utiliza solución al 0.85 % de NH_4Cl (Merck) en agua destilada.

Reactivos para el estudio de la fijación de C_3 .

. Antisuero marcado con isotiocianato de fluoresceína específica para la fracción C_3 del complemento humano.

(Wellcome Research Laboratories. Beckenham; England).

Reactivos para el estudio de quimioluminiscencia.

. Luminol. 5-amino-2,3-dehidro-1,4-phthalazinediona, (Sigma Chemicals Co, Ltd. St Louis, Mo; USA). Actúa como amplificador de la quimioluminiscencia celular.

Colorantes

. Solución de Azul Tripán al 0.5 % (Flow Laboratories, Ayrshire; Scotland).

. Solución de Türk. (Merck, Darmstadt; Germany).

Cánulas y catéteres.

Para los estudios de adherencia se utilizaron los siguientes catéteres:

. Catéter de Teflón. Catéter para exanguinotransfusión. Longitud: 40 cm, diámetro exterior 2.5 mm y diámetro interior de 1.5 mm. (271.08, Vygon, Ecouen; France).

. Catéter de Poliuretano. Catéter intravenoso (Polycath 22-G X 1"). Longitud 10 mm, diámetro exterior 0.9 mm y diámetro interior 0.6 mm (Abbott Laboratories, North Chicago, Il. USA).

M E T O D O S

Identificación de las cepas

Para la identificación de las cepas, fueron utilizados métodos estandar (51). Las cepas se mantuvieron liofilizadas hasta el momento de su utilización. Posteriormente, fueron regeneradas en placas de agar sangre e identificadas siguiendo el esquema de Kloos y Schleifer (7).

Las cepas de estafilococo no productoras de coagulasa ni de termonucleasa se clasificaron en especies utilizando el sistema API Staph (API System S.A., Montelieu-Vercieu; France) en función de las siguientes reacciones bioquímicas y enzimáticas:

- Fosfatasa alcalina.
- B-glucosidasa.
- B-glucuronidasa
- B-galactosidasa.
- Ureasa.
- Utilización de arginina.
- Utilización de manitol.
- utilización de manosa.
- Utilización de trealosa.
- Utilización de salicina.

Adicionalmente, se estudió la sensibilidad o resistencia a novobiocina utilizando un disco de 5 mcgr (52).

Determinación de la producción de sustancia mucoide.

Para la determinación de la producción de sustancia mucoide por parte de las cepas de ECN, fue utilizado el método descrito por Christensen y cols. (53).

Se inoculan 2-3 colonias de la cepa a estudiar en un tubo de vidrio con 10 ml. de caldo de tripticasa soja suplementado con glucosa a una concentración final de 0.25 %. Se incuba a 37°C durante 18 horas en estufa. Posteriormente se vacía el contenido de los tubos y se rellenan los mismos con azul tripán diluido al 1 % (p/v) en agua destilada. Tras 1 minuto aproximadamente, se vacían de nuevo.

Distinguimos tres categorías diferentes: cepas altas productoras de sustancias mucoides (++), cuando las paredes del tubo se tiñen intensamente de azul; cepas escasas productoras (+) cuando las paredes del tubo se tiñen débilmente y por último, cepas no productoras, cuando las paredes del tubo no se tiñen (-).

Cada determinación se realizó por triplicado y en días diferentes.

Determinación de la hidrofobicidad de superficie.

Para la determinación de la hidrofobicidad de superficie utilizamos el método ideado por Rosenberg y cols. (54) que consiste, a grandes rasgos, en cuantificar la afinidad de una suspensión bacteriana en un sistema bifásico agua-xileno.

Se inoculan 2 ó 3 colonias de la cepa a estudiar en 10 ml. de caldo de tripticasa soja y se incuba a 37°C durante 20 horas. Las bacterias en fase exponencial tardía se consiguen cultivando 2 ml. del cultivo anterior en 100 ml. de caldo fresco e incubando 5 horas a 37°C en agitación. Se lavan las bacterias tres veces en tampón fosfato salino (pH 7.2) y se resuspenden en 3 ml. del mismo tampón a una absorbancia (A) de 1.0 en un espectrofotómetro Perkin-Elmer de doble haz (Perkin--Elmer, Norwalk, Conn. USA) a una longitud de onda de 540 nm., correspondiente aproximadamente a 10^9 ufc/ml. comprobado por recuento de colonias.

Se añaden 0.25 ml. de p-xileno (Merck, Darmstadt; RFA) a los tubos con las suspensiones bacterianas y se agitan durante 60 sg. (Vortex Genie, Tolbert; Holland). Tras permitir la separación de las fases, aproximadamente en 30 min., se mide la absorbancia de la fase acuosa a 540 nm. Las suspensiones bacterianas iniciales y previamente a la adición de xileno se utilizan para medir la absorbancia inicial y se le da un valor del 100 %. Los resultados obtenidos tras la adición del xileno se expresan como porcentajes de la fase acuosa inicial y corresponden al valor de la hidrofobicidad.

Efecto de enzimas proteolíticos en la hidrofobicidad bacteriana.

. Tratamiento con pepsina. Para estudiar la influencia de la pepsina en la hidrofobicidad de las bacterias se suspenden las mismas en solución tampón citrato 0.2 M (pH 3.0) conteniendo 0.65 % de ClNa (Tampón citrato salino) y adicionado con pepsina a una concentración final de 0.1 % (p/v) (55). Se incuba a 37°C durante 90 min. en rotación y posteriormente se enfría la suspensión rápidamente para detener la acción del enzima. Las bacterias se lavan dos veces con tampón fosfato salino frío.

Para descartar el posible efecto del pH en la hidrofobicidad de superficie se utilizan bacterias suspendidas en tampón citrato salino (pH 3.0) libre de enzima como control.

. Tratamiento con tripsina. Para estudiar la influencia de la tripsina, se prepara una suspensión de bacterias en solución de tripsina al 0.25 % y se incuba en rotación a 37°C durante 60 min. (56). Posteriormente se enfría la suspensión rápidamente y se lavan las bacterias dos veces con tampón fosfato salino.

Para estudiar la hidrofobicidad de superficie tras el tratamiento enzimático se actúa de la forma expuesta anteriormente.

Efecto de la opsonización en suero y de diferentes componentes del mismo en la hidrofobicidad.

. Opsonización de bacterias en diferentes sueros.
Se detallará en el capítulo de fagocitosis en suspensión.

. Efecto de albúmina humana, fibronectina e IgG purificada. Para estudiar el efecto de diferentes componentes del suero se preparan soluciones de albúmina humana, fibronectina e IgG purificada en solución de Hanks. Se utilizaron concentraciones equivalentes a las existentes en una solución de suero humano al 5 %.

Las bacterias en diferentes experimentos fueron incubadas en las distintas soluciones durante 5 min. a 37°C en baño de agitación. Posteriormente se detiene la reacción mediante la adición de tampón fosfato frío, se lavan las bacterias dos veces y se resuspende en el mismo tampón. Para estudiar la hidrofobicidad se procede en la forma explicada anteriormente.

Cada una de las determinaciones fue realizada por triplicado en días diferentes.

Fagocitosis en suspensión de bacterias marcadas con isótopos radioactivos por leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN).

Marcaje de bacterias.

Para marcar las bacterias se inocula una colonia en 5 ml. de caldo Müeller Hinton adicionado con adenosina al 0.5 %, se le añade 20 µl de (³H)-timidina de actividad específica 5 Ci/mmol (57) y se incuba en baño de agitación a 37°C durante 18 horas.

Posteriormente, se centrifuga a 1600 g. durante 15 min.; se descarta el sobrenadante y se procede a lavar el sedimento de bacterias tres veces con tampón fosfato frío centrifugando a igual velocidad. Finalmente, se resuspenden en solución Hanks con gelatina y se ajustan espectrofotométricamente (Klett-Summerson, Philadelphia, USA) a una concentración de 2.5×10^8 ufc/ml. confirmando por recuento de colonias. Las suspensiones de bacterias se mantienen a 4°C hasta el momento de su utilización.

Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares

Se utiliza el método de Böyum modificado (58). Para ello se mezclan 10 ml. de sangre fresca venosa heparinizada de adulto sano con 3 ml. de solución de dextrano al 6 % en suero fisiológico. Se deja la mezcla

durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir la sedimentación de los eritrocitos. Posteriormente, el plasma rico en leucocitos se centrifuga a 160 g. durante 10 min. El sedimento de células se resuspende finalmente en 6 ml. de Hanks. Esta suspensión se deposita suavemente en un tubo que contiene 3 ml. de ficoll-Isopaque, evitando que se meclen ambas cepas. Se centrifuga durante 35 min. a 160 g.

Obtendremos una capa en la interfase Hanks-Ficoll formada por las células mononucleadas y un sedimento en el fondo el tubo formado por las células polinucleadas separadas por gradiente de densidad. Se descarta el sobrenadante con pipeta Pasteur empezando por la capa de Ficoll.

Para lisar los eritrocitos residuales, se lavan las células 2 veces con NH_4Cl al 0.85 % en agua destilada fría, centrifugándolas posteriormente durante 10 min. a 160 g. Finalmente se lavan dos veces más y se resuspenden en Hanks adicionado con gelatina.

Para el recuento, se meclan durante 1 min. 1 volumen de la suspensión celular con 9 volúmenes de líquido de Türk y posteriormente se realiza la lectura por método hemocitométrico. Para ello, se utiliza una cámara de Bürker-Türk (Schreck-Hofheim; West Germany) y se ajusta la suspensión final a $5 \cdot 10^6$ PMN/ml.

Después de cada aislamiento se comprueba la via-

bilidad celular mediante tinción con azul tripán, siendo ésta superior al 95 % en todos los casos.

Las células se mantienen a 4°C hasta el momento de su utilización. Durante todo el procesamiento de las células es muy importante la utilización de material plástico.

Los polimorfonucleares se aíslan el mismo día que van a ser utilizados, pero, cuando es necesario, pueden mantenerse hasta 24 horas, para lo cual, se centrifugan durante 5 min. a 160 g., se resuspende el sedimento celular en medio RPMI suplementado y se mantienen las células en nevera a 4°C hasta el día siguiente. Para su utilización, se vuelven a centrifugar a igual velocidad y se resuspenden en solución de Hanks adicionado con gelatina.

Opsonización de bacterias.

Para la opsonización se deposita en un vial de polipropileno (Biovials Beckman, Chicago, Il. USA) 0.1 ml. de la suspensión bacteriana (2.5×10^8 ufc/ml) y 0.4 ml. de una solución al 5 % del suero correspondiente y se incuba en baño de agitación a 37°C durante tiempos determinados. Tras los mismos, se detiene el proceso mediante la adición de 2 ml. de tampón fosfato a 4°C, se centrifuga a 1600 g. durante 15 min., se descarta el sobrenadante y se resuspenden las bacterias en 0.5 ml. de Hanks, obteniéndose una concentración

final de 5×10^7 ufc/ml. opsonizadas. Se utiliza siempre un control negativo sustituyendo el suero por solución de Hanks como fuente opsónica.

Técnica de fagocitosis en suspensión.

Con esta técnica se estudia cuantitativamente la ingestión por leucocitos polimorfonucleares de bacterias suspendidas en solución acuosa. Se utilizan bacterias marcadas por isótopos radioactivos que permiten expresar los valores de fagocitosis en función de la radioactividad retenida por los fagocitos.

Utilizamos una ligera modificación (59) de la técnica descrita previamente por Verhoef y cols. (57). A 3 viales de polipropileno se añaden 0.1 ml. de la suspensión de polimorfonucleares (5×10^6 PMN/ml) y 0.1 ml de la suspensión bacteriana (5×10^7 ufc/ml.) a una razón PMN/Bacteria de 1/10. Las mezclas se incuban en baño de agitación a 37°C durante 12 min.

Para determinar la radioactividad asociada a los leucocitos, o sea, la correspondiente a las bacterias fagocitadas, en dos de los tres viales (T_1 y T_2 . Fig. 1) se detiene la fagocitosis tras los 12 min. de incubación mediante adición de 2.5 ml. de tampón fosfato a 4°C . Los viales se centrifugan a 160 g durante 5 min. a 4°C y los sedimentos de células se lavan 3 veces con 2.5 ml. de PBS a 4°C centrifugando a

igual velocidad y desechando de esta manera las bacterias no fagocitadas por gradiente de velocidad.

Al sedimento final, conteniendo las bacterias fagocitadas por leucocitos se le añaden 2.5 ml. de líquido de centelleo, se agitan y se realiza la lectura en un contador beta de líquido de centelleo (Phillips PW 4700, Phillips; Holland).

Para determinar la radioactividad total añadida a los viales (RT, Fig. 1), al vial restante, tras la adición de 2.5 ml. de tampón fosfato frío, se centrifuga a 1600 g. durante 15 min., se descarta el sobrenadante y se añaden 2.5 ml. del líquido de centelleo.

Para determinar la eficacia del marcaje (EM), o sea, el número de bacterias correspondientes a una desintegración por min. (dpm), a 100 μ l. de la suspensión inicial de bacterias sin opsonizar, se le añade el líquido de centelleo y se realiza el contaje. El número de dpm obtenido lo multiplicamos por 10 para obtener el número de dpm por ml. de suspensión bacteriana. Como sabemos que hay 5×10^7 bacterias/ml, aplicaremos la siguiente fórmula:

$$EM \text{ (n}^\circ \text{ bacterias/dpm)} = \frac{5 \times 10^7}{10 \times A}$$

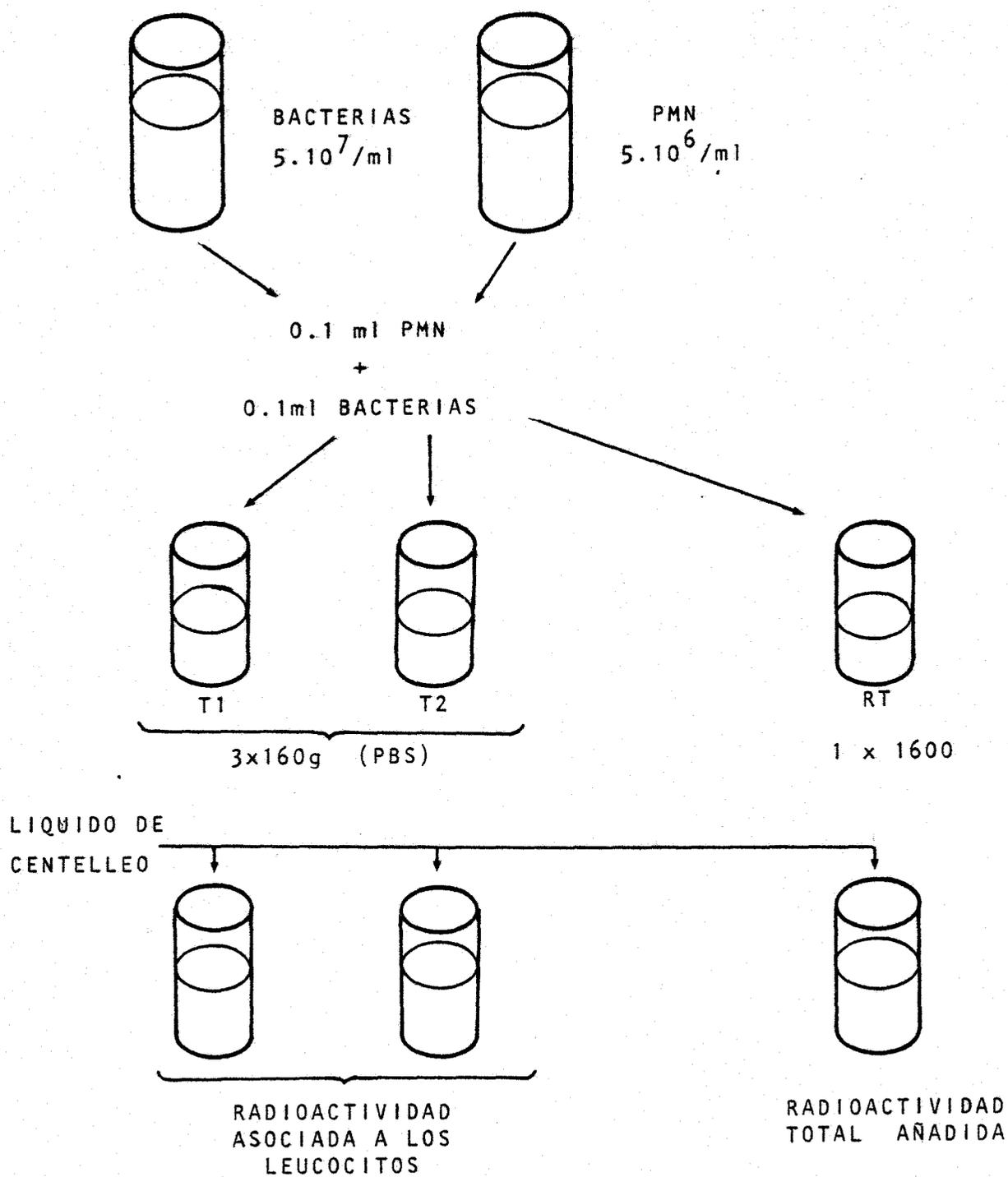


Figura 1.- Técnica de fagocitosis en suspensión.

A = dpm correspondiente a 100 μ l de la suspensión inicial de bacterias.

El porcentaje de fagocitosis es calculado con la siguiente formula:

$$\% \text{ Fagocitosis} = \frac{\text{dpm asociadas a leucocitos}}{\text{dpm de radioactividad total}} \times 100 =$$

$$= \frac{\text{dpm } \frac{T1 + T2}{2}}{\text{dpm RT}} \times 100$$

Fagocitosis de bacterias adheridas a superficie plástica.

Con ésta técnica se estudia la fagocitosis de bacterias adheridas a una superficie plástica de poliestireno. En el caso de ECN es de gran interés debido a la capacidad de éstas bacterias de producir infecciones en pacientes con material protésico plástico y el gran desconocimiento en cuanto a la interacción polimorfonuclear-bacteria en estos casos. Igualmente se pretende obtener información de los requerimientos opsonicos de ECN en comparación con cepas de S.aureus.

Para el aislamiento de polimorfonucleares, marcaje y opsonización de bacterias se utilizan las mismas técnicas detalladas en el capítulo de fagocitosis de suspensión.

Técnicas de fagocitosis en superficie.

Se utiliza la misma técnica aplicada en la fagocitosis en suspensión (57) modificada para medir la fagocitosis de superficie (40). Como superficie plástica fueron utilizadas placas de cultivo celulares de poliestireno de 48 pocillos de 11.3 mm. de diámetro cada uno (Costar, Mass, USA).

Se deposita en cada pocillo 0.25 ml. de la suspensión bacteriana (5×10^7 ufc/ml) realizando cada prueba por duplicado como en la técnica en suspensión.

Posteriormente se centrifuga la placa a 1600 g. durante 10 min y se incuban a 37°C durante 30 min. en estufa para sedimentar las bacterias y favorecer la adherencia.

Para cada uno de los tiempos de fagocitosis (15' y 40' según las pruebas) se utiliza una placa diferente.

De la suspensión de polimorfonucleares (5×10^6 PMN/ml) se añaden 0.25 ml a cada pocillo muy suavemente y resbalando por la pared para mantener intacta la monocapa de bacterias. Las placas se incuban a 37°C en estufa, permitiendo a los polimorfonucleares sedimentar por efecto de la gravedad. A cada tiempo correspondiente se detiene la fagocitosis mediante la adición a cada pocillo de 0.5 ml. de tampón fosfato a 4°C. Tras cuidadosa resuspensión, cada mezcla es transferida a un vial de polipropileno y cada pocillo es lavado 3 veces con tampón fosfato a 4°C traspasando el tampón de lavado al mismo vial (T1 y T2. Fig. 2). Con este procedimiento traspasamos completamente el contenido de cada pocillo.

De igual forma que en la fagocitosis en suspensión las bacterias no asociadas a los leucocitos son desechadas por gradiente de velocidad mediante 3 lavados con tampón fosfato a 4°C durante 5 min. Para determinar la radioactividad total correspondiente al número total de bacterias añadidas a cada pocillo, el contenido de uno de ellos es transferido a un vial de polipropileno y centrifugado a 1600 g durante 15 min. Se descarta el

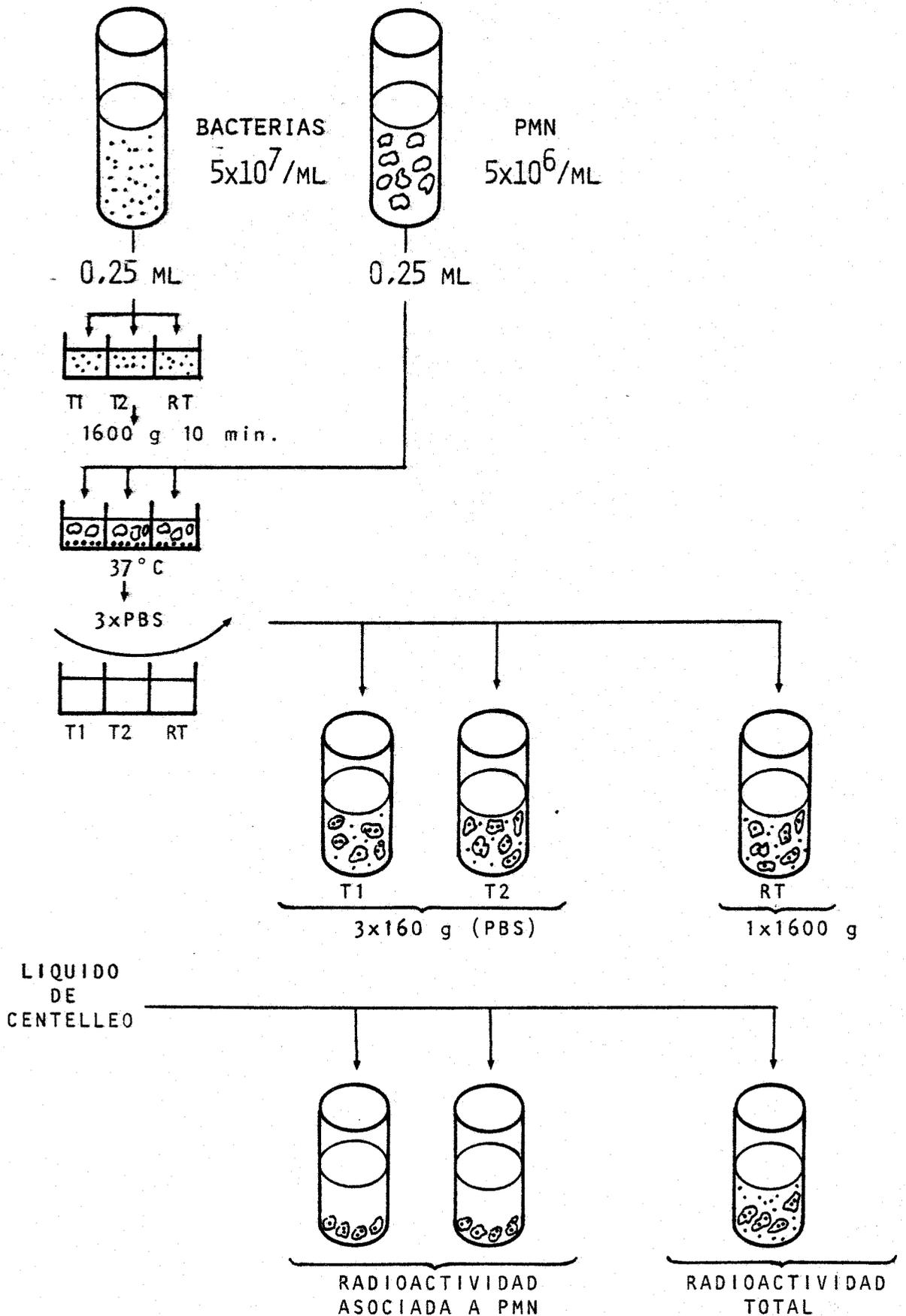


Figura 2.- Técnica de fagocitosis de bacterias adheridas a plástico.

sobrenadante y se añade el líquido de centelleo.

Al igual que en el técnica anterior, la radioactividad se mide en contador beta de centelleo y la fagocitosis expresada como porcentaje de la cantidad total de radioactividad añadida mediante la aplicación de las fórmulas anteriormente señaladas.

Fijación de la fracción C3 del complemento a la superficie bacteriana.

Para estudiar la fijación de la fracción C3 del complemento a la superficie bacteriana, se utiliza una modificación (60) de un método de inmunofluorescencia indirecta descrito previamente. (61).

De un cultivo de 18 horas se prepara una suspensión bacteriana de 5×10^8 ufc/ml en solución de Hanks. A un vial de polipropileno se añade 0.2 ml. de la suspensión bacteriana y 0.8 ml. de mezcla de sueros humanos al 5 % en solución de Hanks y se incuba a 37°C durante 5 min. en baño de agitación.

En los tiempos indicados se detiene la fijación mediante la adición de 2.5 ml de tampón fosfato a 4°C adicionado con EDTA 10 mM. Se lava el contenido de los viales 3 veces con 2.5 ml de tampón fosfato frío para descartar el resto de suero y se centrifuga después de cada lavado a 1600 g. durante 10 min. Al sedimento final de bacterias se le añaden 400 μ l de una dilución 1/50 en tampón fosfato de antisuero marcado con isotiocianato de fluoresceína específico para la fracción C3 del complemento humano y se deja reaccionar a temperatura ambiente y evitando el contacto con la luz durante 15 min. Se vuelve a lavar el contenido de los viales 3 veces con tampón fosfato protegiendolos en todo momento de la luz.

Al sedimento bacteriano final se le añade 2.5 ml

de NaOH 0.1 N y se deja a temperatura ambiente durante 10 min. Por la acción del NaOH se liberan las fracciones C3 ya marcadas, que estaban unidas a la superficie bacteriana. Para sedimentar las bacterias, se centrifugan los viales a 1600 g y se transfieren los sobrenadantes a nuevos viales de polipropileno manteniendolos en oscuridad hasta el momento de la lectura para evitar pérdida de fluorescencia.

La lectura se realiza en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer 204 (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn. USA) con longitudes de onda de excitación y análisis de 485 y 525 nm respectivamente.

Los resultados se expresan en porcentajes que varían desde 0 %, correspondiente al control negativo en el que sustituimos la fuente opsónica, o sea, el suero, por solución de Hanks, a 100 % correspondiente a la máxima intensidad de emisión en las series de cada día.

En diversos experimentos, las bacterias fueron tratadas previamente con pepsina utilizando el método detallado en el capítulo de hidrofobicidad (55).

Cada uno de los experimentos se realizó por duplicado en días diferentes, expresándose los resultados como la media aritmética de ambos.

Quimioluminiscencia amplificada con luminol

Los mecanismos bactericidas de los leucocitos polimorfonucleares siguen dos vías diferentes. La primera viene representada por una vía dependiente del oxígeno con producción de radicales tóxicos de oxígeno tales como anión superóxido (O_2^-), radical hidróxilo (OH^\bullet), H_2O_2 ... La segunda vía es independiente del oxígeno y está representada por el contenido lisosomal.

Los radicales tóxicos de oxígeno, al contactar con la envuelta celular bacterianas provocan una serie de reacciones de oxidación produciéndose una emisión de fotones que se denomina quimioluminiscencia. Esta emisión puede ser cuantificada utilizando unos métodos especiales de amplificación. Se considera como un índice valorable del metabolismo celular y de sus mecanismos bactericidas (62,63).

Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares.

Se utiliza el mismo método expuesto en el capítulo de fagocitosis. Fueron utilizados en todas las pruebas leucocitos polimorfonucleares de voluntarios sanos. Se utilizan a una concentración final de 5×10^6 PMN/ml suspendidos en Hanks con gelatina.

Cultivo y opsonización de las bacterias.

Descrito anteriormente en la técnica de fagocitosis en suspensión. Para el estudio de la influencia de la sustancia mucoide en la producción de quimioluminiscencia por los polimorfonucleares humanos, las cepas de estafilococo coagulasa negativo se incubaron durante 18 horas en 10 ml de caldo de tripticasa de soja adicionado con glucosa (0.25 %) para estimular la producción de la misma, como ha sido descrito previamente (53). Para la opsonización se utilizó mezcla de suero humano al 5 % durante 5 min. a 37°C.

Detección de quimioluminiscencia

Se utilizan tubos de plástico de 2 ml. y fondo plano (Sterilin Limited, Middlesex, England) especialmente diseñados para esta prueba. A los tubos se añade 300 μ l de la suspensión de polimorfonucleares (5×10^6 /ml), 40 μ l de Luminol (1/250) y 300 μ l de la suspensión de bacterias (5×10^8 ufc/ml), siendo la relación PMN/bacteria de 1/100.

La lectura se realiza en un aparato especialmente diseñado para detectar quimioluminiscencia denominado Luminómetro (Picolite, Model 6500 Il. USA) que presenta la ventaja de poseer un carrusel móvil que permite realizar la lectura de los tubos, hasta un total de 48, el número de veces y con el intervalo de tiempo que se desee programar según la prueba. Por otro lado, presenta una serie de dispositivos que mantienen la temperatura constante a 37°C durante la lectura, con continua

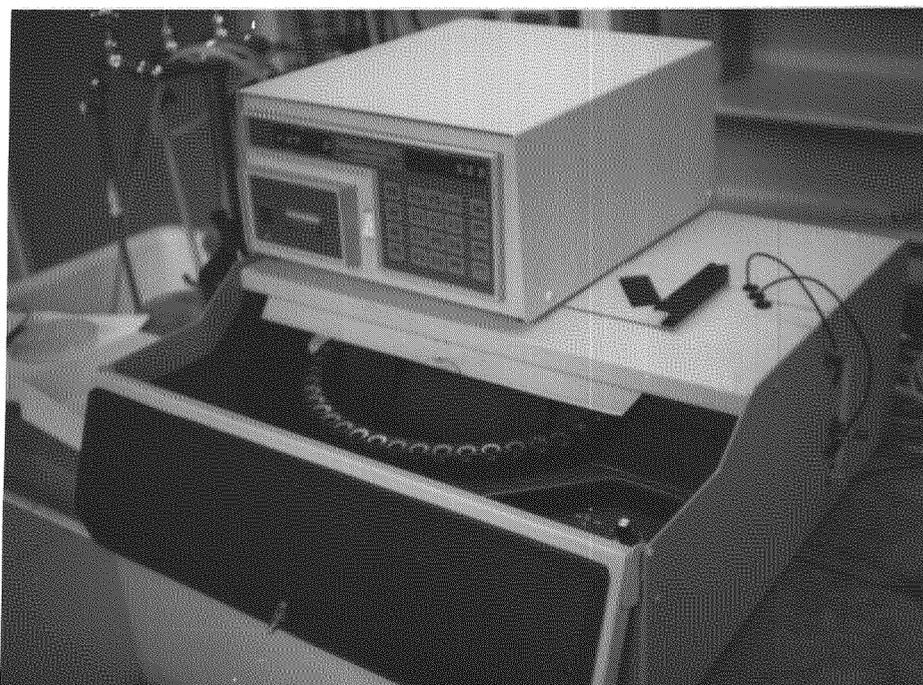


Figura 3.- Luminómetro. Aparato para medir quimioluminiscencia celular.

agitación de los tubos y permite trabajar en oscuridad, circunstancias esenciales para esta prueba (Fig. 3).

En nuestros ensayos fueron realizadas 15 lecturas de cada tubo con intervalos de 2 min. En cada una de las pruebas se realiza un control negativo en el que la suspensión de bacterias se sustituye por solución de Hanks y que nos dará el valor del "background" o emisión espontánea de quimioluminiscencia por los polimorfonucleares en reposo. Los resultados se expresan como picos máximos de emisión de quimioluminiscencia en cuentas por minuto (cpm) (64).

Cada una de las determinaciones se realiza por duplicado en días diferentes.

Adherencia de bacterias a cateteres.

Para estudiar la adherencia bacteriana a catéteres intravenosos, se utiliza un método cuantitativo modificado de una técnica descrita anteriormente (44).

Marcaje de bacterias

Se utiliza la misma técnica descrita anteriormente en el capítulo de fagocitosis. Las bacterias se resuspenden finalmente en tampón fosfato (pH 7.2) a una concentración final de 10^8 ufc/ml y se mantienen a 4°C hasta el momento de su utilización.

Tratamiento de bacterias y catéteres

Los diferentes tipos de catéteres de teflón y poliuretano, son cortados en condiciones estériles, utilizando cámara de flujo laminar, en segmentos de 1.5 cm. de longitud. Los diámetros externos e internos de las cánulas empleadas fueron obtenidos de los fabricantes y confirmados por técnica microscópica (model 5-A, Hansen Bienne, Switzerland).

En diversos experimentos y para estudiar la modulación de la adherencia, las bacterias fueron opsonizadas en suero y plasma humano al 5 % o tratadas con concentraciones de fibronectina y albúmina equivalentes a las existentes en una solución de suero humano al 5

%. Finalmente, en otra serie de pruebas, se trataron las bacterias con enzimas proteolíticos tipo pepsina, para estudiar el papel de las proteínas de superficie y especialmente de las responsables de la hidrofobicidad en la adherencia a catéteres. Después de cada tratamiento, las bacterias son lavadas dos veces con tampón fosfato y ajustado su número aproximadamente a 10^8 ufc/ml.

Antes de cada experimento, los segmentos de catéteres se preincuban en 10 ml de tampón fosfato a 37°C durante 60 min. y en rotación, como ha sido descrito previamente. (65).

En diversos experimentos, sin embargo, los segmentos de catéter fueron incubados durante 30 min. a 37°C y en rotación, en suero y plasma humano al 5 % y en concentraciones de fibronectina y albúmina humana equivalentes a las existentes en solución de suero humano al 5 %.

Método para estudio in vitro de la adherencia bacteriana a catéteres.

Se emplean viales de vidrio de 20 ml. a los que se añade por cada tiempo a estudiar (15,40,90,280 min y 18 horas según las pruebas) 3 segmentos de catéteres y 3 ml. de la suspensión de bacterias (10^8 ufc/ml.) incubándose estacionariamente en baño a 37°C . A los tiempos

correspondientes se detiene la adherencia mediante la adición de 10 ml de tampón fosfato frío a cada uno de los viales.

Tomando los segmentos con unas pinzas finas, se lavan cinco veces en tampón fosfato frío. El proceso de lavado se muestra satisfactorio desde el momento en que no se detecta radioactividad en el tampón de un lavado adicional.

Finalmente, se transfieren las cánulas a un vial de polipropileno, se le añaden 3 ml. de líquido de centelleo y se realiza la lectura. Para determinar la eficacia del marcaje o número de bacterias por dpm, a 0.1 ml. de la suspensión bacteriana, se le añaden 3 ml. de líquido de centelleo y se procede a la lectura. El valor de dividir 10^7 , correspondiente al número de bacterias contenidas en 0.1 ml. por el número de dpm obtenido, nos dará el valor de la eficacia del marcaje.

El número de dpm obtenido en la lectura de cada vial con catéteres se multiplica por la eficacia de marcaje (nº de bacterias/dpm) y obtendremos el número de bacterias por segmento de catéter. Finalmente, el número de bacterias se divide por la superficie de la cánula previamente calculada, para expresar los resultados como número de bacterias por cm^2 de superficie.

Cada uno de los experimentos fue realizado por triplicado en diferentes días. El factor de secuestro

de emisión (quenching) producido por la introducción de los segmentos de catéteres en los viales de centelleo, no fue nunca superior al 6 %.

Métodos estadísticos

- t-Student para pequeñas muestras. (t-test).
- Media aritmética y su error estandar ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).
- Test de correlación lineal y coeficiente de correlación.

R E S U L T A D O S

Identificación de las cepas.

Hemos estudiado las propiedades de superficie y los requerimientos opsónicos de 38 cepas de ECN aislados de hemocultivos de recién nacidos hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología del Hospital Pediátrico Universitario Reina Guillermina de Utrecht (Holanda).

Las cepas utilizadas para la realización de este trabajo, mantenidas liofilizadas hasta el momento de su utilización, fueron identificadas en las distintas especies utilizando el sistema API STAPH, obteniéndose los resultados expresados en la Tabla 1: 29 cepas se identificaron como S.epidermidis (76.3 %), 5 cepas como S.warneri (13.1 %), 2 cepas como S.hominis (5.2 %), una como S.saprophyticus y otra como no identificable con ninguna de las especies (26 %), completando hasta un total de 38 cepas.

Producción de sustancia mucoide.

El estudio de la producción de sustancia mucoide mediante su tinción con azul tripán en las paredes del tubo, nos deparó que 23 cepas (60.5 %) eran altamente productoras (++), 7 cepas (18,4 %) escasas productoras y 8 cepas (21.1 %) no productoras (Tabla 2).

Las 23 cepas altamente productoras de sustancia mucoide pertenecen a la especie S.epidermidis excepto

TABLA 1.- Distribución en especies de 38 cepas de ECN

	Nº CEPAS	%
<u>S.epidermidis</u>	29	76.3
<u>S.warneri</u>	5	13.1
<u>S.hominis</u>	2	5.2
<u>S.saprophyticus</u>	1	2.6
No identificables	1	2.6
T O T A L	38	

TABLA 2.- Distribución de 38 cepas de ECN en función de la capacidad de producir sustancia mucoide

	Nº CEPAS	%
Altamente productoras	23	60.5
Escasamente productoras	7	18.4
No productoras	8	21.1

una (cepa 18/81), correspondiente a la especie S.saprophyticus (Tabla 3).

La utilización de caldo de tripticasa soja adicionado con glucosa a una concentración final de 0.25 % (p/v) se utiliza para potenciar la producción de la sustancia mucoide, como ha sido descrito previamente, debido a la necesidad por parte de las bacterias de glucosa y casaminoácidos para la producción de la misma.

Estudio de la hidrofobicidad de superficie

El estudio de la hidrofobicidad de superficie de las bacterias se realizó utilizando un sistema bifásico agua-xileno. Es un método semicuantitativo que permite obtener resultados altamente reproducibles.

Se acepta universalmente expresar los resultados como porcentajes de la absorbancia de la fase acuosa inicial, de tal manera que 100 % correspondería a la cepa más hidrófila y 0 % a la cepa más hidrófoba respectivamente. Debemos insistir, para evitar posibles confusiones, que cuanto menor es el valor del porcentaje de la absorbancia de la fase acuosa inicial, mayor es la hidrofobicidad (ver Material y Métodos).

Los valores para cada una de las cepas están expresados en la Tabla 3. El rango varía en nuestra serie desde un 15 % correspondiente a la cepa más

TABLA 3.- Producción de sustancia mucoide e hidrofobicidad de 38 cepas de ECN

Nº CEPAS	ESPECIE	S.MUCOIDE	HIDROFOBICIDAD*
1	<i>S.hominis</i>	-	15
2	<i>S.epidermidis</i>	++	30
3	<i>S.epidermidis</i>	+	100
4	<i>S.epidermidis</i>	-	100
5	<i>S.epidermidis</i>	+	78
6	<i>S.warneri</i>	+	100
7	<i>S.warneri</i>	+	78
8	<i>S.epidermidis</i>	-	74
9	<i>S.epidermidis</i>	++	80
10	<i>S.warneri</i>	-	92
11	<i>S.epidermidis</i>	++	47
12	No tipable	-	47
13	<i>S.epidermidis</i>	++	61
14	<i>S.epidermidis</i>	++	64
15	<i>S.epidermidis</i>	++	62
16	<i>S.epidermidis</i>	++	60
17	<i>S.epidermidis</i>	++	62
18	<i>S.saprophyticus</i>	++	83
19	<i>S.epidermidis</i>	++	100
20	<i>S.epidermidis</i>	++	95
21	<i>S.epidermidis</i>	++	65
22	<i>S.epidermidis</i>	++	86
23	<i>S.epidermidis</i>	-	100
24	<i>S.epidermidis</i>	++	97
25	<i>S.epidermidis</i>	++	73
26	<i>S.epidermidis</i>	+	81
27	<i>S.epidermidis</i>	+	100
28	<i>S.epidermidis</i>	++	69
29	<i>S.epidermidis</i>	++	58
30	<i>S.epidermidis</i>	++	60
31	<i>S.epidermidis</i>	-	81
32	<i>S.warneri</i>	-	66
33	<i>S.epidermidis</i>	++	72
34	<i>S.epidermidis</i>	++	57
35	<i>S.epidermidis</i>	+	100
36	<i>S.hominis</i>	++	58
37	<i>S.epidermidis</i>	++	58
38	<i>S.warneri</i>	++	57

* Expresado como % de la absorbancia de la fase acuosa inicial.

hidrófoba (cepa 1/81) hasta un 100 % correspondiente a las cepas más hidrófilas (cepas 3, 4, 6, 19, 23 27 y 35/81) con diversos valores intermedios para el resto de las cepas. No observamos relación alguna entre la hidrofobicidad de superficie y la producción de sustancia mucoide, así como entre hidrofobicidad y especies de ECN.

Destacaremos el valor obtenido con la única cepa perteneciente a la especie S.saphrophyticus (cepa 18/81) de 83 % que corresponde a una relativa hidrofobicidad a pesar de ser una especie descrita generalmente como encapsulada, lo que le confería propiedades hidrofílicas.

Emisión de quimioluminiscencia por leucocitos polimorfonucleares humanos activados por ECN.

Se estudió la emisión de quimioluminiscencia amplificada por luminol en leucocitos polimorfonucleares de voluntarios sanos activados con diferentes cepas de ECN (cepas 1,2,5,15,16, 29, 33 y 34/81).

Se trata de estudiar si el hecho de producir o no sustancia mucoide o el poseer un carácter más o menos hidrofóbico por parte de una cepa de ECN, se traduce en una alteración cuantitativa del metabolismo del leucocitos polimorfonuclear expresado en una mayor o menor emisión de quimioluminiscencia. En otras palabras, si estas propiedades confieren mayor o menor defensa a la

bacteria contra los mecanismos bactericidas del polimorfonuclear.

Para estudiar la influencia de la sustancia mucoides en el metabolismo de los polimorfonucleares, se estudia comparativamente la emisión de quimioluminiscencia cuando empleamos como activadores 4 cepas productoras y 4 no productoras de la misma. Los resultados se expresan en la Figura 4 como picos máximos de emisión en cuentas por minuto (cpm) y que en todos nuestros ensayos se alcanzaron a los 19-21 minutos.

Con las cepas productoras, la emisión fue de $127.0 \pm 6.6 \times 10^5$ cpm ($X \pm SEM$) mientras que con las cepas no productoras la emisión fue $137.2 \pm 8.3 \times 10^5$ cpm ($X \pm SEM$). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.5$; t-test).

Resultados similares se observaron al estudiar comparativamente 4 cepas hidrófobas frente a 4 hidrófilas de ECN como activadores de quimioluminiscencia. Con el primer grupo la emisión fue de $133.7 \pm 10.3 \times 10^5$ cpm ($X \pm SEM$), mientras que con el segundo, el pico de emisión máxima fue de $130.5 \pm 4.7 \times 10^5$ cpm ($X \pm SEM$). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.5$; t-test).

Requerimientos opsonicos de ECN y fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares en suspensión.

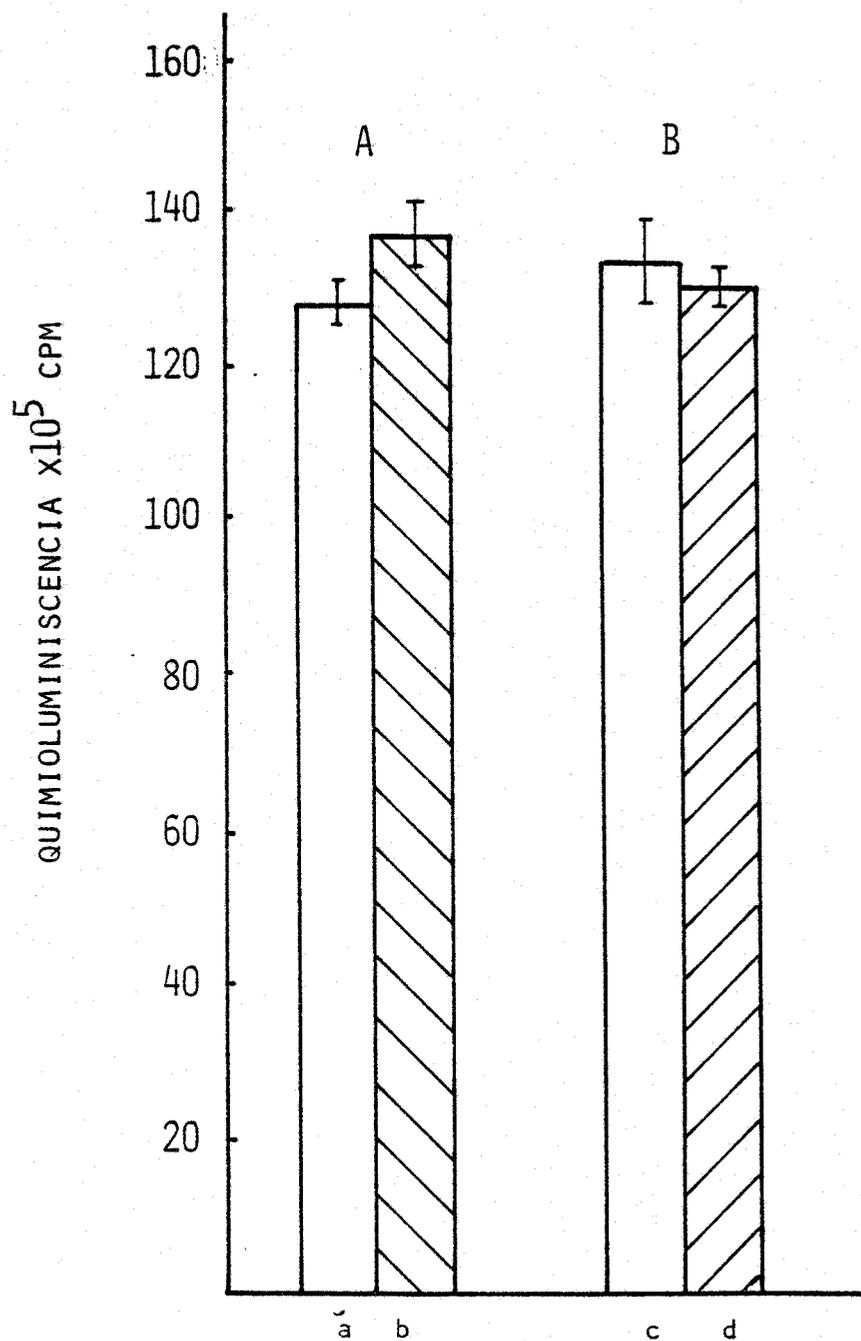


Figura 4.- Picos de quimioluminiscencia de PMN humanos activados por cepas de ECN. Comparación de 4 cepas productoras (a) y 4 no productoras (b) de sust.mucoide. B) Comparación de 4 cepas hidrofobas (c) y 4 hidrófilas (d) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

Se estudió la dependencia de opsoninas termoestables y termolábiles, IgG y fracción C3b del complemento respectivamente en las 38 cepas de ECN aisladas de muestras clínicas.

En 22 de ellas (58 %) la opsonización fue igualmente eficiente cuando se utilizó suero descomplementado (calentado a 56°C durante 30 min.) como fuente opsónica (% de fagocitosis 80.8 ± 2.21 ; $\bar{X} \pm \text{SEM}$), que cuando se utilizó suero humano sin descomplementar (% de fagocitosis 82.3 ± 1.85 ; $\bar{X} \pm \text{SEM}$) (Fig. 5).

En las restantes 16 cepas (42 %) la utilización de suero descomplementado como fuente opsónica disminuyó considerablemente o abolió la fagocitosis (% de fagocitosis 34.0 ± 4.35 ; $\bar{X} \pm \text{SEM}$) lo que expresa una clara dependencia del complemento como opsonina en este último grupo de bacterias para su adecuada ingestión por leucocitos polimorfonucleares. Los valores de fagocitosis de estas cepas cuando la opsonización fue realizada en suero sin descomplementar, alcanzaron niveles muy similares al primero (% de fagocitosis 78.5 ± 3.5 ; $\bar{X} \pm \text{SEM}$).

En ambos grupos, el porcentaje de fagocitosis de bacterias opsonizadas en solución de Hanks (control negativo) nunca superó el 4 %, lo que pone de manifiesto la absoluta dependencia de opsoninas por parte de ECN para una adecuada fagocitosis cuando las bacterias se encuentran en suspensión.

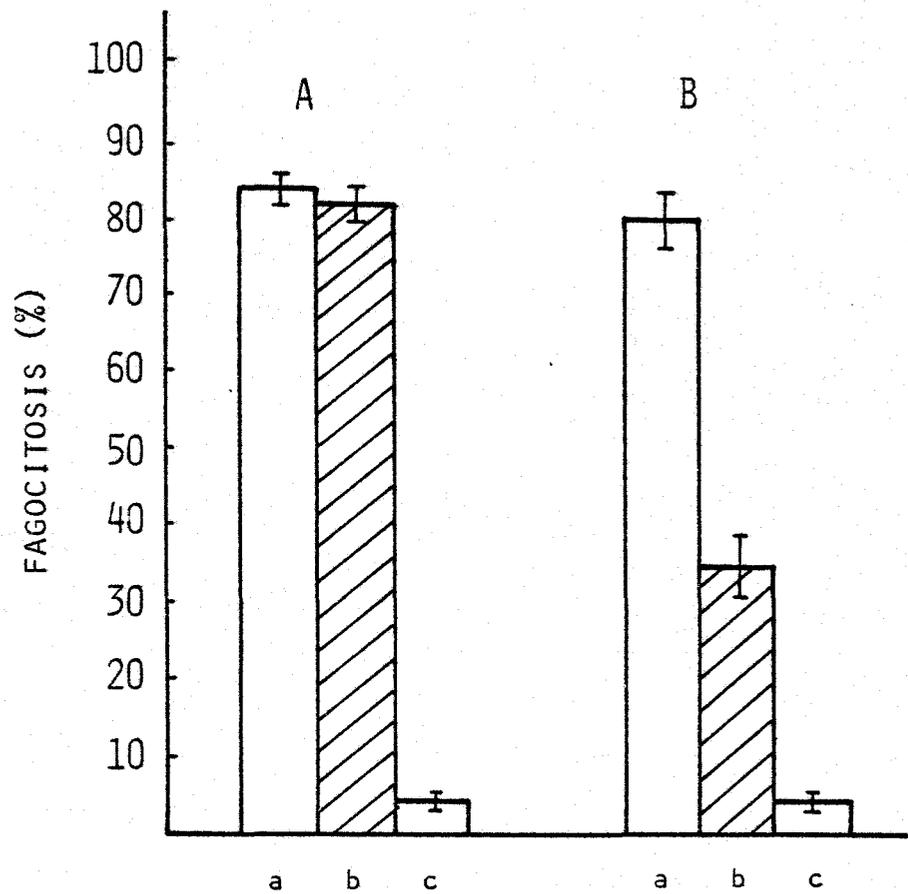


Figura 5.- Fagocitosis de 38 cepas de ECN por PMN humanos.

a: opsonización en suero humano (5%); b: opsonización en suero descomplementado (5%) c: opsonización en Hanks (control). ($\bar{X} \pm$ SEM)

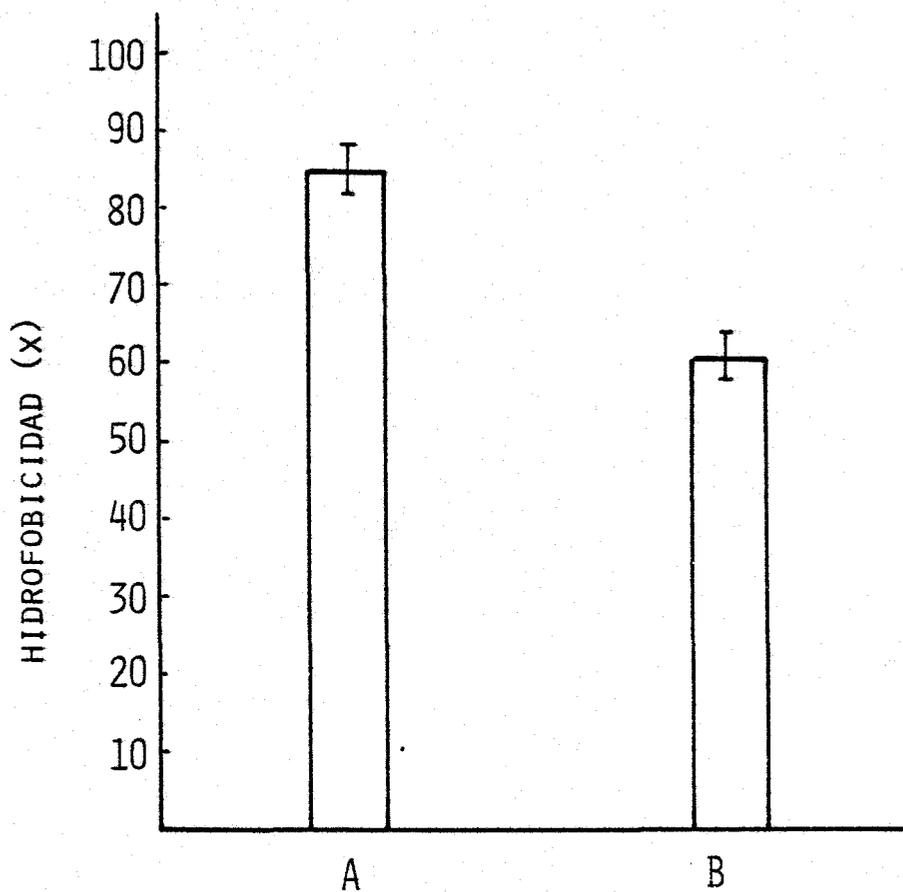
A: cepas no dependientes del complemento como opsonina (n = 22 cepas)

B: cepas dependientes del complemento como opsonina (n = 16 cepas)

Al comparar los resultados de los requerimientos opsonicos con los de hidrofobicidad de superficie se observa que el grupo de cepas que requiere la acción del complemento como opsonina para la fagocitosis en suspensión es significativamente más hidrófobo (hidrofobicidad = $61.9 \% \pm 4.3$; $\bar{X} \pm \text{SEM}$) que el grupo de cepas no dependientes de opsoninas termolábiles para una adecuada fagocitosis (hidrofobicidad = 86.0 ± 4.0 ; $\bar{X} \pm \text{SEM}$) ($p < 0.001$; t-test). Los resultados quedan expresados en la Fig. 6.

Para avanzar más en el estudio de la relación entre la dependencia del complemento para la opsonización y la hidrofobicidad de superficie, la cepa altamente hidrófoba 2/81 (hidrofobicidad = 30 %) fue tratada con los enzimas proteolíticos pepsina y tripsina previamente a la determinación de la opsonización e hidrofobicidad. Los resultados quedan expresados en la Tabla 4.

Tras el tratamiento con pepsina, la superficie bacteriana pasa de ser altamente hidrófoba (30 %) a altamente hidrófila (100 %). El porcentaje de fagocitosis de bacterias opsonizadas en suero humano no se modifica prácticamente tras el tratamiento proteolítico con pepsina. Sin embargo, cuando opsonizamos las bacterias en suero descomplementado, el porcentaje de fagocitosis varía de 10 % cuando utilizamos bacterias sin tratar, a un 66 % cuando utilizamos bacterias tratadas con pepsina. En otras palabras, el tratamiento con pepsina, abolió simultáneamente la hidrofobicidad de



(x) EXPRESADO EN % DE LA ABSORBANCIA INICIAL DE LA FASE ACUOSA.

Figura 6.- Valores de hidrofobicidad de superficie en relación con los requerimientos opsónicos de 38 cepas de ECN ($\bar{x} \pm SEM$)

A: cepas no dependientes del complemento como opsonina
(n = 22 cepas)

B: cepas dependientes del complemento como opsonina
(n = 16 cepas)

TABLA 4.- Efecto del tratamiento con pepsina y tripsina sobre ECN (cepa 2/81). Acción sobre la hidrofobicidad de superficie y requerimientos opsonicos para la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares.

	BACTERIAS SIN TRATAR	BACTERIAS TRATADAS	
		Tripsina	Pepsina
Hidrofobicidad de superficie *	30 %	31 %	100 %
% de fagocitosis en suero	98 %	99 %	82 %
% de fagocitosis en suero descomplementado	10 %	14 %	66 %
Fijación de C3 en superficie bacteriana	80 %	82 %	100 %

* Expresada como % de la absorbancia inicial de la fase acuosa.

superficie y la dependencia de la opsonización vía complemento de las bacterias cuando éstas se encuentran en suspensión.

El tratamiento con tripsina no modificó ninguna de las dos propiedades manteniendo constantes los valores de hidrofobicidad y fagocitosis obtenidos con bacterias sin tratar. (Tabla 4).

Los resultados obtenidos anteriormente ponen de manifiesto que el tratamiento de ECN con pepsina se traduce en una pérdida de la dependencia del complemento para una adecuada opsonización. El siguiente paso sería conocer si ello significa, que tras el tratamiento proteolítico, la fracción C3 del complemento no se fija a la superficie bacteriana. Para estudiar este fenómeno, se utiliza una prueba de inmunofluorescencia indirecta modificada.

Los resultados expresados en la Tabla 4, nos demuestran que el tratamiento con pepsina no sólo no disminuye la fijación de la fracción C3, sino que incluso la aumenta variando de un 80 % de fijación en bacterias sin tratar a un 100 % en bacterias tratadas.

No se observó ninguna relación significativa entre los requerimientos opsonicos de ECN en suspensión y la producción de sustancia mucoide.

Efecto de la opsonización en la hidrofobicidad de su-

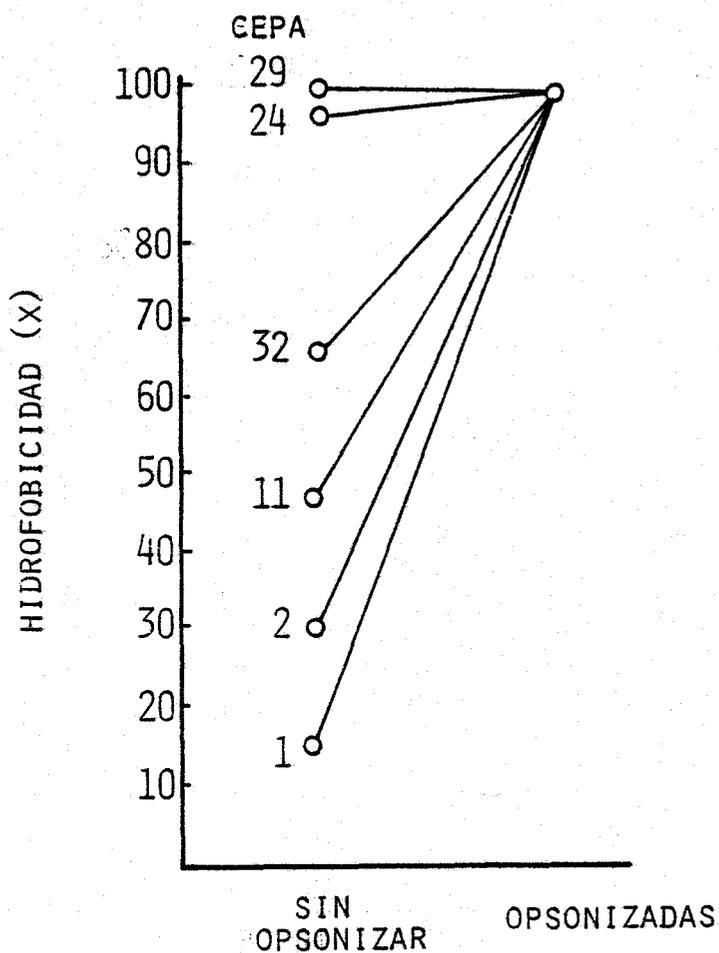
perficie.

Los resultados obtenidos previamente prueban que la hidrofobicidad de superficie juega un importante papel y modula los requerimientos opsonicos de ECN. Pero lo contrario también podría ocurrir, que la opsonización modulara de alguna manera la hidrofobicidad, efecto que podría tener importantes consecuencias en la interacción, por ejemplo, de las bacterias con superficies plásticas, que podría ser dependiente de uniones hidrofóbicas.

Para trabajar con esta hipótesis, se estudió el efecto que sobre la hidrofobicidad de superficie tiene la opsonización en suero humano. Para ello, se escogieron 6 cepas de ECN (1,2,11,24,29 y 32/81) con valores de hidrofobicidad muy diversos y se pusieron en contacto con suero humano diluido al 5 % (37°C, 5min.).

Los resultados (Fig. 7) son concluyentes en demostrar, que, con independencia de valor inicial de hidrofobicidad, la totalidad de las cepas se vuelven absolutamente hidrofílicas tras el contacto con el suero. Posteriormente, observamos, que la opsonización en suero humano diluido al 1 % durante 1 min., es suficiente para transformar las bacterias totalmente hidrofílicas.

Para conocer más sobre la naturaleza de éste fenómeno observado y qué componentes del suero podrían



(X) EXPRESADO EN % DE LA ABSORBANCIA INICIAL DE LA FASE ACUOSA.

Figura 7.- Efecto de la opsonización en suero humano (5 min. 37°C) sobre la hidrofobicidad de superficie de 6 cepas de ECN.

estar envueltos, se estudió el efecto que sobre la hidrofobicidad de la cepa 2/81 (hidrofobicidad = 30 %) tenía la opsonización en suero descomplementado (calentado a 56°C durante 30 min.) y suero agammaglobulinémico al 5 %. También se estudió el efecto de IgG purificada, albúmina y fibronectina en concentraciones de 0.5 mg/ml, 2 mg/ml y 0.02 mg/ml, respectivamente, que corresponden a los valores existentes en una solución de suero humano al 5 %.

Los resultados expuestos en la Tabla 5, nos muestran que la opsonización en suero descomplementado y suero agammaglobulinémico tiene el mismo efecto en la hidrofobicidad de superficie que el observado en el suero humano sin tratar, transformando las bacterias en altamente hidrofílicas (100 %). En otras palabras, el complemento y la IgG, no parecen las responsables de este cambio y en el caso del último componente, queda confirmado al observar el escaso efecto de la IgG purificada sobre la hidrofobicidad (39 %).

Fibronectina, glicoproteína a la que se atribuyen importantes funciones en la adherencia de las células, tampoco altera la hidrofobicidad, manteniéndola, aproximadamente, en su valor inicial (28 %).

Sin embargo, la acción de la albúmina humana a pesar de la baja concentración utilizada, es espectacular, transformando a las bacterias en totalmente hidrofílicas (100 %), demostrando, que es el componente del

TABLA 5.- Efecto sobre la hidrofobicidad de superficie de ECN (cepa 2/81) de la opsonización en distintos sueros y de la incubación con varios componentes séricos.

INCUBACION	HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE*
Ninguno	30 %
Suero 5 %	100 %
Suero descomplementado 5 %	100 %
Suero agammaglobulínico 5 %	100 %
IgG (0.5 mg/ml)	39 %
Albúmina (2 mg/ml)	100 %
Fibronectina (0.02 mg/ml)	28 %

* Expresado en % de la absorbancia inicial de la fase acuosa.

suero, aunque quizá no el único, comprometido en el efecto de la opsonización en suero sobre la hidrofobicidad de superficie.

Requerimientos opsónicos de ECN adherido a superficie plástica y fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares humanos. Estudio comparativo con S.aureus.

Se compararon los requerimientos opsónicos de 12 cepas de ECN (1,2,11,12,16,17,19,24,30,31,32 y 38/81) y 7 cepas de S.aureus (S.aureus Evers, Stephens, Cowan I, 502 A, Carr y dos aislamientos clínicos) utilizando bacterias adheridas a superficie plástica de poliestireno.

En la Fig. 8, se expresan los resultados con bacterias sin opsonizar. El porcentaje de fagocitosis en ausencia de opsoninas para las cepas de ECN fue mínimo, correspondiendo $9.3 \% \pm 2.1$ ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) a los 15 min. y $15.5 \% \pm 4.1$ ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) a los 40 min. Sin embargo, los resultados contrastan con los obtenidos con cepas de S.aureus que presentan un adecuado porcentaje de fagocitosis en ausencia de fuente opsónica, representado por $26.3 \% \pm 6.6$ ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) a los 15 min. y 37.1 ± 7.6 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) a los 40 min.

Cuando utilizamos suero humano al 5 % como fuente opsónica (5 min.; 37°C), los resultados varían ostensiblemente en ambos grupos de cepas (Fig.8). Con las cepas de S.aureus los porcentajes de fagocitosis son de

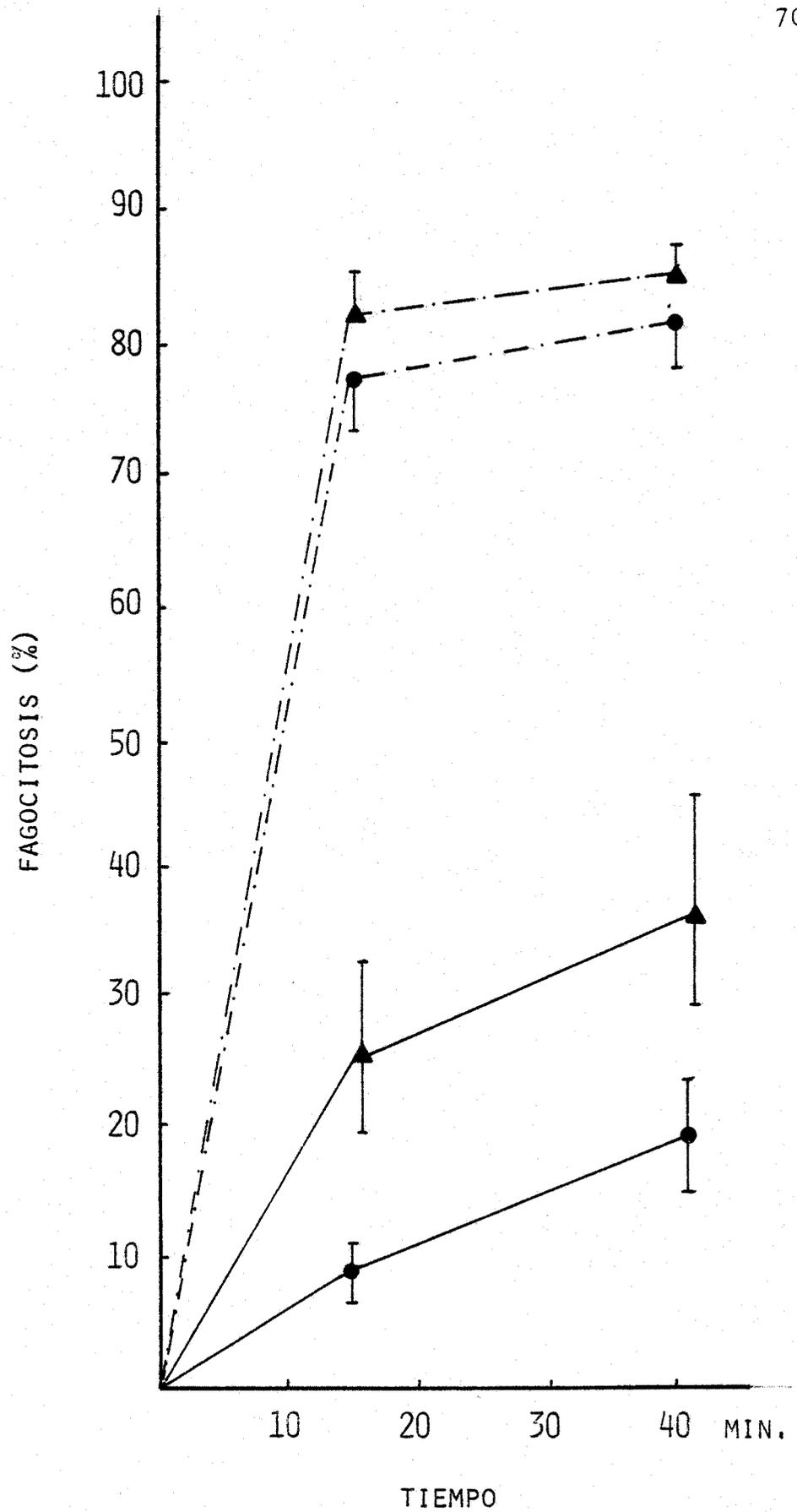


Figura 8.- Porcentajes de fagocitosis de 12 cepas de ECN (●) y 7 de S.aureus (▲) adheridas a superficie plástica. (\bar{X} +SEM)
 Bacterias sin opsonizar (—)
 Bacterias opsonizadas en suero al 5% (-.-.-)

82.1 \pm 3.4 y 85.7 % \pm 2.7 (\bar{X} \pm SEM) correspondientes a 15 y 40 min. respectivamente, mientras que con las cepas de ECN son de 77.0 \pm 3.8 y 81.3 \pm 3.6 (\bar{X} \pm SEM) para los mismos tiempos. La opsonización en suero humano eleva considerablemente la fagocitosis de ambos, S.aureus y ECN cuando las bacterias están adheridas al plástico, no observando, sin embargo, diferencias significativas entre ellos.

Similares resultados se obtienen cuando utilizamos como fuente opsonica suero descomplementado (calentando a 56°C durante 30 min.). En estas condiciones, con las cepas de S.aureus los porcentajes de fagocitosis son de 77.7 % \pm 3.9 y 78.2 % \pm 4.7 (\bar{X} \pm SEM) para los dos tiempos estudiados y con las cepas de ECN 80.5 % \pm 3.5 y 84.5 % \pm 4.1 (\bar{X} \pm SEM) respectivamente. La opsonización con suero descomplementado eleva la fagocitosis a niveles similares a los obtenidos al utilizar suero sin tratar como fuente opsonica en ambos grupos (Fig.9).

Al comparar los resultados de fagocitosis de bacterias no adheridas (en suspensión) y adheridas a superficie plástica, se observó, que, 6 de las 12 cepas de ECN utilizadas en fagocitosis de superficie (1,2,-11,12,16 y 30/81) que habían demostrado una dependencia absoluta de la fracción C3 del complemento como opsonina para una buena fagocitosis en suspensión, al utilizarlas adheridas a plástico, perdían esta dependencia alcanzando porcentajes de fagocitosis muy elevados al utilizar una fuente opsonica sin opsoninas termolábiles.

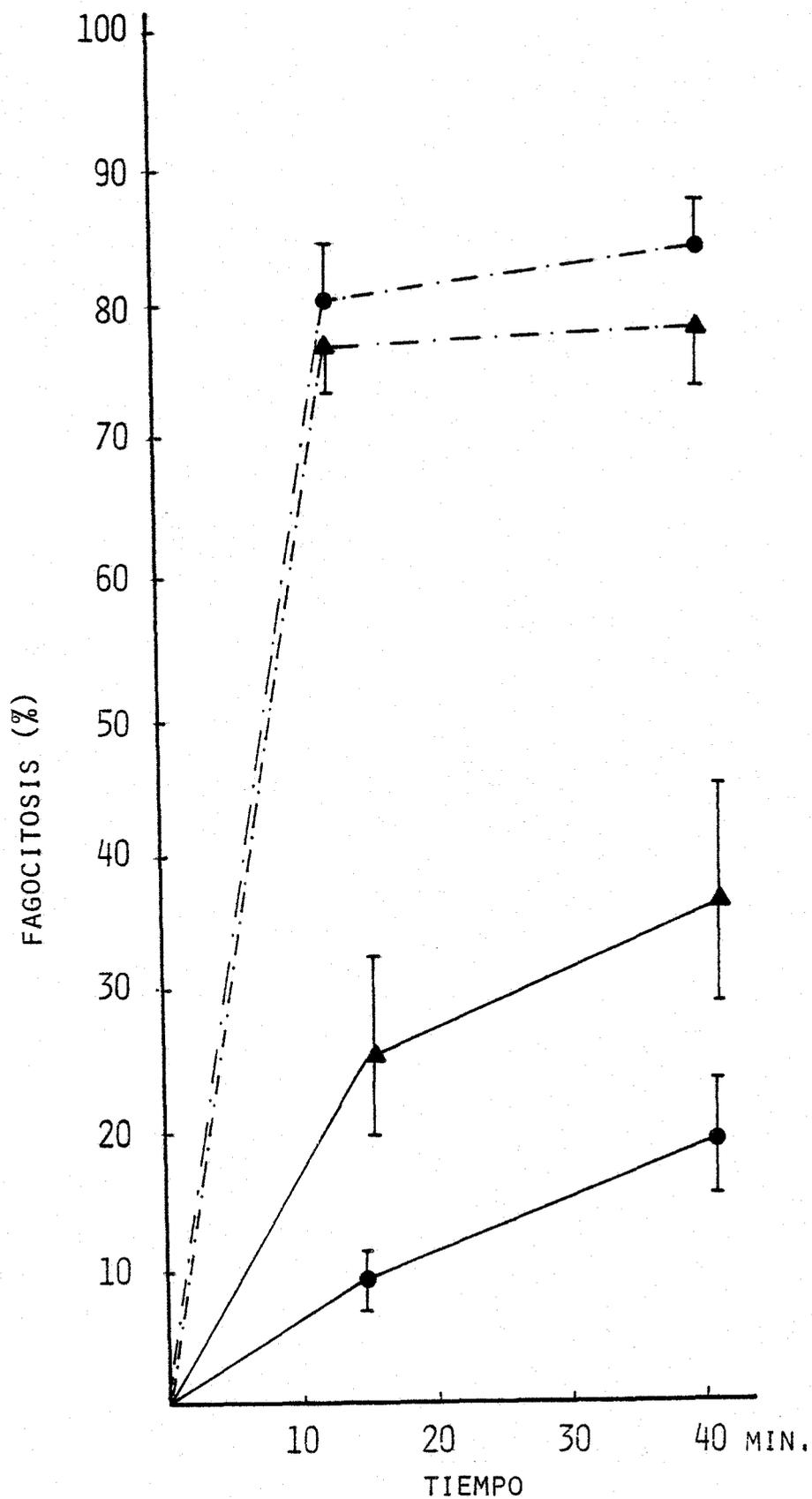


Figura 9.- Porcentajes de fagocitosis de 12 cepas de ECN (●) y 7 de S.aureus (▲) adheridas a superficie plástica. (\bar{X} +SEM)
 Bacterias sin opsonizar (—)
 bacterias opsonizadas en suero descomplementado al 5 % (—·—)

Para confirmar estos hallazgos, se estudian comparativamente la fagocitosis de bacterias en suspensión y adheridas a superficie plástica con las 6 cepas de ECN anteriormente mencionadas. Los resultados se expresan en la Fig. 10.

Mientras que al utilizar suero sin descomplementar como fuente opsónica, los porcentajes de fagocitosis son similares y elevados en ambos grupos (% fagocitosis = 79.9 ± 4.0 y 77.3 ± 4.3 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) respectivamente, al utilizar suero descomplementado (calentado a 56°C durante 30 min.) inutilizando la acción del complemento como opsonina, las diferencias son muy marcadas, correspondiendo un porcentaje de fagocitosis de 29.1 ± 7.7 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) al utilizar bacterias en suspensión y 75.8 ± 4.8 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) cuando las bacterias están adheridas a plástico.

Para avanzar más en el conocimiento de los requerimientos opsónicos de ECN adherido a plástico, se realizaron diferentes experimentos con cepas opsonizadas en distintas fuentes opsónicas. En las Fig. 11 y 12 se expresan los resultados obtenidos con la cepa 2/81.

Al utilizar bacterias opsonizadas en suero agammaglobulinémico, los porcentajes de fagocitosis son similares a los obtenidos con bacterias sin opsonizar correspondiendo 11.1 y 23.4 % para los 15 y 40 min. respectivamente (Fig. 11).

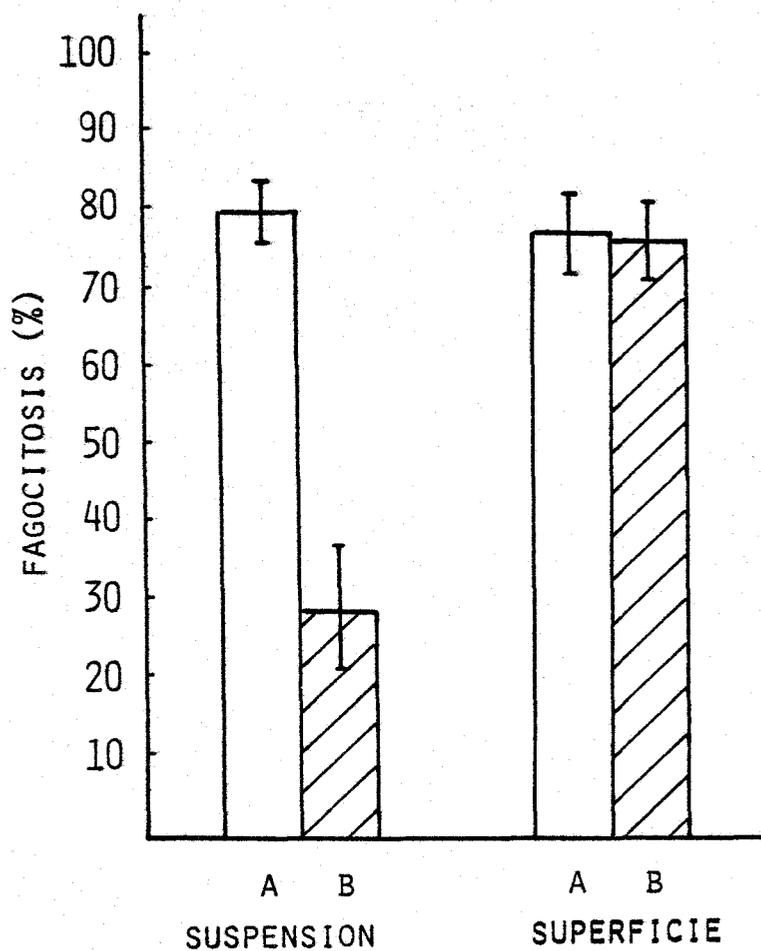


Figura 10.- Fagocitosis en suspensión y en superficie plástica de 6 cepas de ECN. A: opsonizadas en suero humano (5 min, 37°C) B: opsonizadas en suero descomplementado (5 min. 37°C) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$)

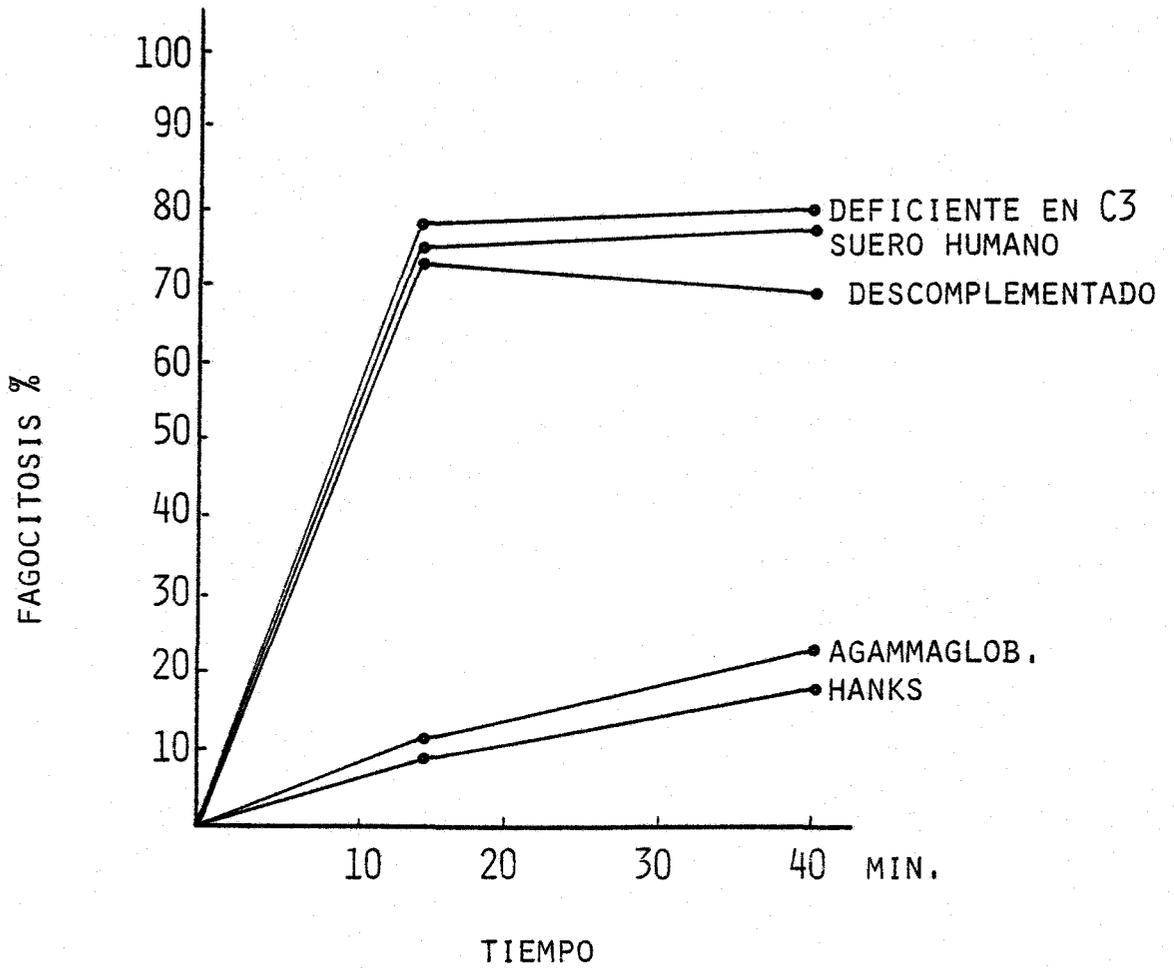


Figura 11.- Fagocitosis de ECN (cepa 2/81) adherido a superficie plástica y utilizando diferentes fuentes opónicas.

Cuando utilizamos suero deficiente en la fracción C3 del complemento, los porcentajes de fagocitosis son de 76.2 % a los 15 min. y 78,0 a los 40 min. con suero humano, los porcentajes son de 72.3 % y 77.1 % y con suero descomplementado 71.1 % y 69.5 % respectivamente.

En otra serie de experimentos (Fig. 12), las bacterias se preincubaban en diferentes componentes del suero. Cuando utilizamos albúmina humana (2 mg/ml) los porcentajes de fagocitosis son de 6.8 % y 34.9 % respectivamente, y cuando utilizamos fibronectina (0.02 mg/ml), glicoproteína a la que se otorga capacidad opsonizante los porcentajes son de 28.0 % 31.6 % respectivamente. Con ambos componentes, los porcentajes son similares a los obtenidos con bacterias sin opsonizar.

Resultados muy diferentes se obtienen al emplear IgG purificada como fuente opsónica (Fig. 12). En concentraciones equivalentes a las existentes en solución de suero humano al 5 % (0.5 mg/ml) los porcentajes de fagocitosis se elevan a 54.1 % y 51.2 % a los 15 y 40 min. respectivamente. Al aumentar la concentración de IgG 10 veces (5 mg/ml) los porcentajes de fagocitosis se incrementan a 68.5 % y 69.0 %.

Estos resultados confirman lo expresado anteriormente; el complemento como opsonina no es necesario para la fagocitosis de ECN adherido a superficie plástica incluso para aquellas cepas que dependían de estas opsoninas termolábiles cuando la fagocitosis

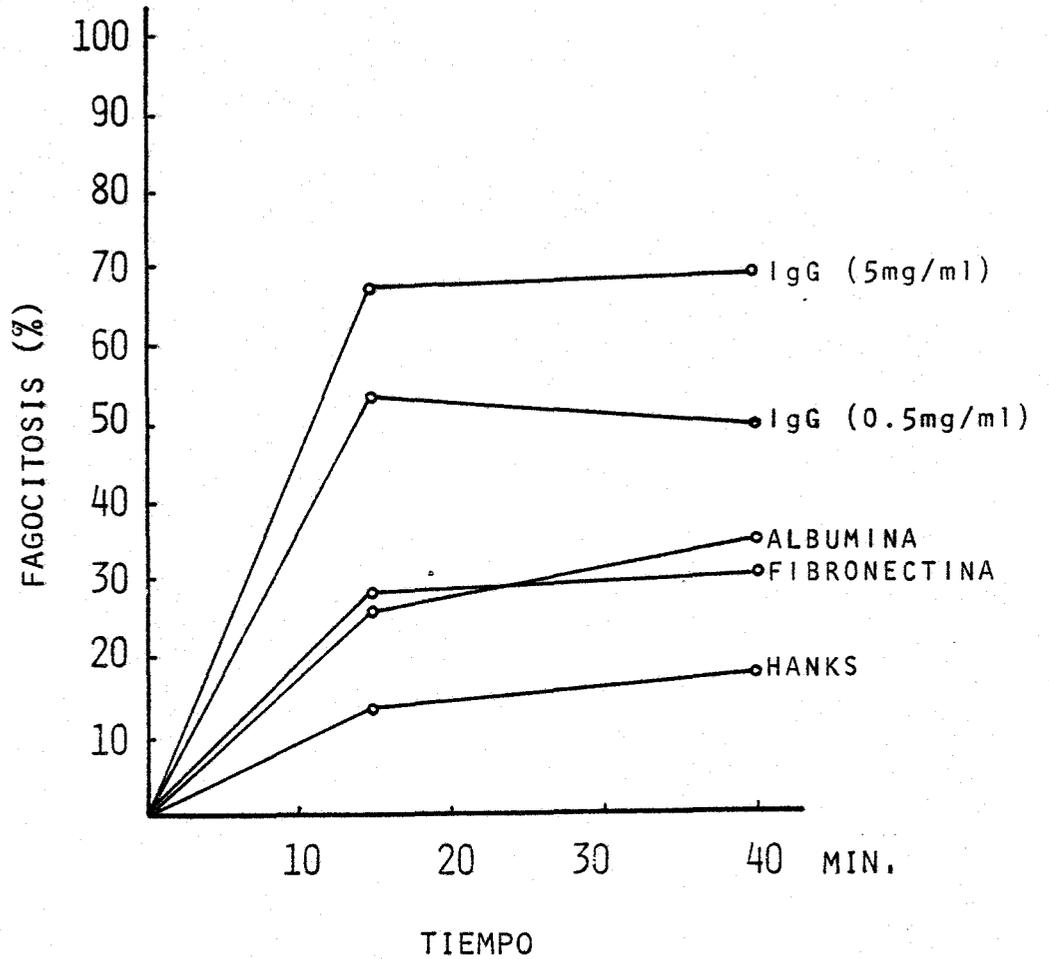


Figura 12.- Fagocitosis de ECN (cepa 2/81) opsonizados con diferentes concentraciones de IgG y preincubando en albúmina y fibronectina humana.

ocurría en suspensión. Este fenómeno es extensible a las cepas de S.aureus estudiadas.

Adherencia de ECN a catéteres de teflón y poliuretano.
Modulación.

Se estudió la adherencia a catéteres mediante un método cuantitativo para el que se utilizan bacterias marcadas radioactivamente y se expresan los resultados como bacterias adheridas por centímetro cuadrado de superficie.

En principio, y para estudiar la dependencia o no del tiempo de incubación, se estudia comparativamente la adherencia a teflón de las cepas de ECN 2 y 4/81. Los tiempos de incubación son 15, 40, 90, 240 minutos y 18 horas.

Los resultados, expresados en la Figura 13, nos muestran un claro aumento de la adherencia en función del tiempo para ambas cepas. Para la cepa 2/81, de superficie muy hidrófoba (30 %), varía la adherencia desde $14.3 \pm 1.6 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) a los 15 min. hasta $91.7 \pm 5.8 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) a las 18 horas de incubación. Con la cepa 4/81, intensamente hidrofílica (100 %), la adherencia es mucho menor, variando de $5.1 \pm 1.7 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) a los 15 min. hasta un valor máximo de $37.2 \pm 4.0 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) a las 18 horas.

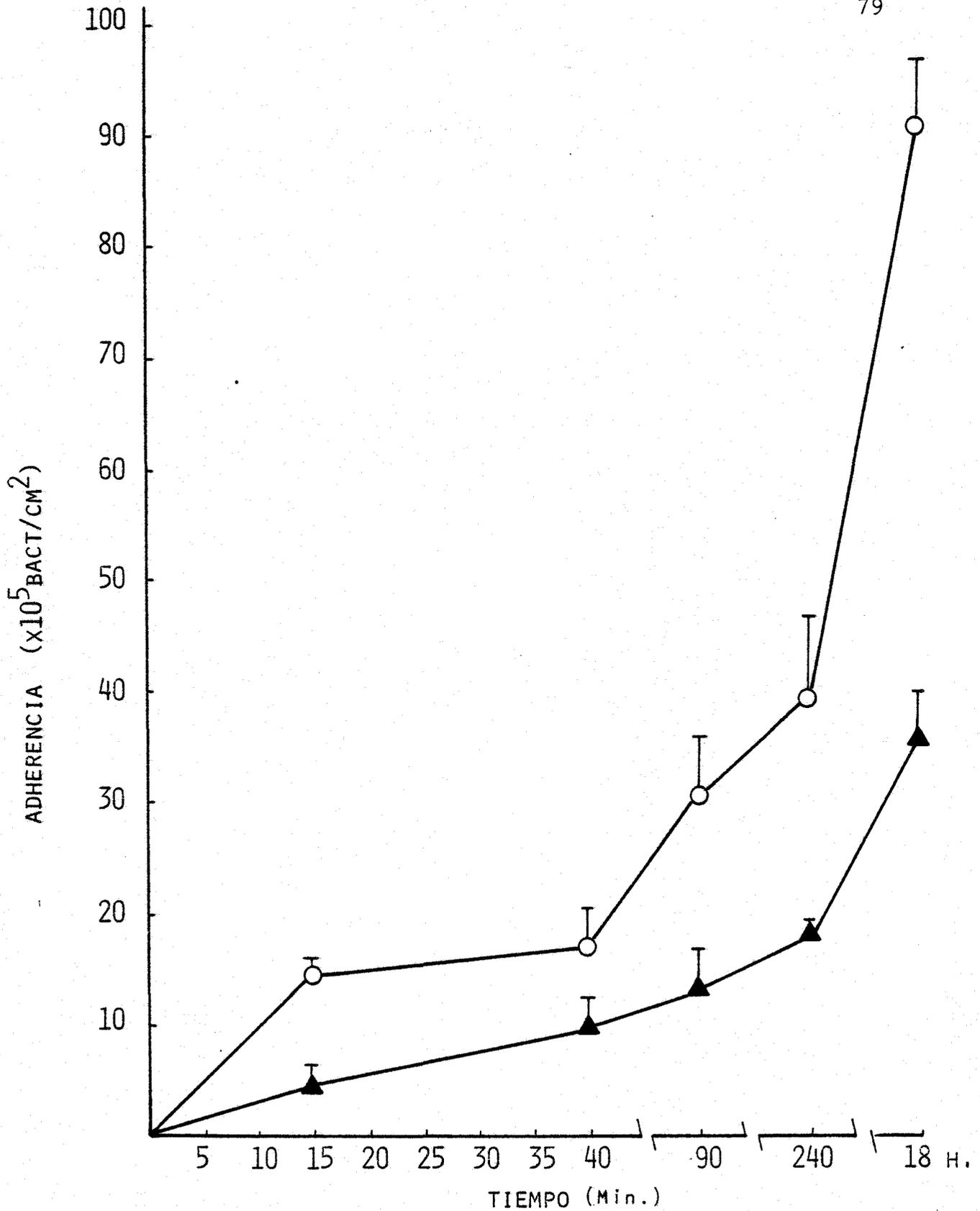


Figura 13.- Adherencia de ECN a catéteres de teflón; *S. epidermidis* 2/81 (○); *S. epidermidis* 4/81 (▲); ($\bar{X} \pm$ SEM)

Los resultados obtenidos muestran que las bacterias se unen a la superficie plástica mediante uniones hidrofóbicas, para lo que es muy importante la naturaleza altamente hidrófoba de la superficie de teflón. Esto lo afirmamos al comprobar que la cepa hidrófoba se adhiere en número mucho mayor que la cepa hidrófila.

Para confirmar esta hipótesis, se estudia la adherencia a teflón de otras 9 cepas de ECN (1,13,14,-16,19,24,27,29 y 34/81) con valores de hidrofobicidad que varían desde 15 % (1/81) a 100 % (19,27,29/81). En este caso, los tiempos de adherencia son: 15,40,90 y 240 min. Volvemos a insistir en que los valores de hidrofobicidad vienen expresados en porcentajes de la absorbancia acuosa inicial, lo que implica que las cepas más hidrófobas corresponderán los porcentajes más pequeños y viceversa.

En la Fig. 14 se expresan los resultados correspondientes a los tiempos extremos y se observa una clara relación entre hidrofobicidad y adherencia; se adhieren en mayor grado las cepas más hidrófobas ($p < 0.005$ a los 15 min y $p < 0.001$ a los 240 min.; test de correlación lineal). Aunque se muestran los tiempos extremos por ser los más demostrativos, la relación hidrofobicidad/adherencia fue muy significativa en el resto de tiempos estudiados ($p < 0.01$ a los 40 y 90 min.; test de correlación lineal).

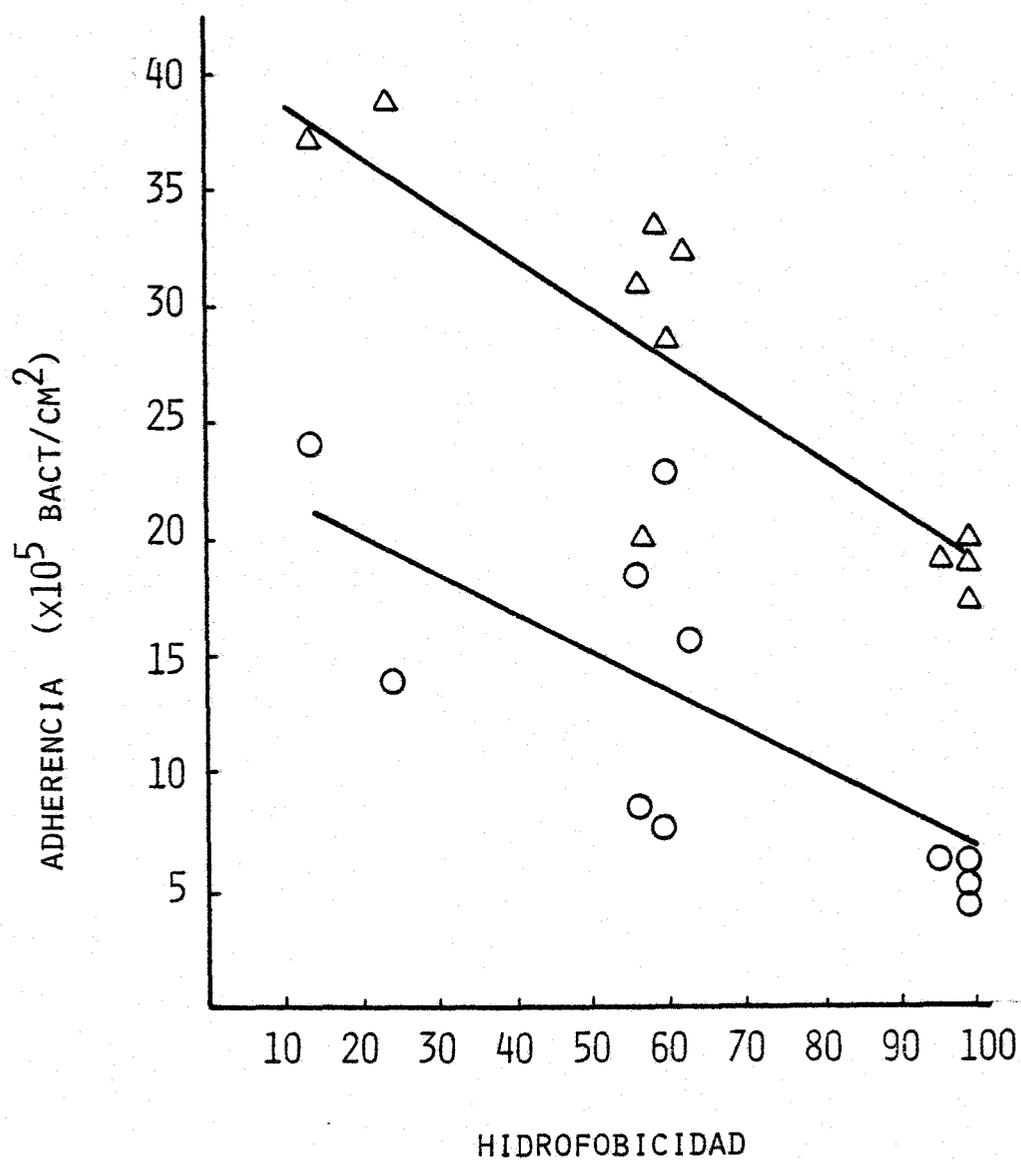


Figura 14.- Relación entre hidrofobicidad y adherencia a catéteres de teflón de 11 cepas de ECN. Tiempos de adherencia: 15 min (○) y 240 min (△).

En la Fig. 15 se observan dos fotografías de microscopía electrónica de barrido en la que se observan elementos celulares de ECN adheridos a la superficie de un catéter de teflón.

A continuación se estudió comparativamente la adherencia a catéteres de teflón y poliuretano. Los catéteres de poliuretano son un tipo nuevo de catéter en fase de experimentación al que se atribuyen una serie de ventajas físico-químicas sobre otros plásticos sintéticos, que le podrían llevar a jugar un papel importante en el futuro.

En la Fig. 16, se muestran los resultados obtenidos con la cepa hidrófoba 2/81 en una serie de tres experimentos. El patrón de adherencia se mantuvo constante en el resto de cepas estudiadas. Los resultados nos muestran que la adherencia a poliuretano es significativamente más alta, especialmente en los primeros 40 min. La diferencia máxima se observa a los 15 min. donde la adherencia a teflón es de $14.3 \pm 1.6 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm$ SEM) y la adherencia a poliuretano de $61.2 \pm 1.7 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm$ SEM), siendo por tanto 4.27 veces superior. A partir de los 15 min., la adherencia a poliuretano va disminuyendo para empezar a aumentar de nuevo a los 90 min. de forma paralela al teflón aunque con valores ligeramente superiores, correspondiendo a los 240 min. una adherencia a teflón de $39.4 \pm 6.1 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm$ SEM) y a poliuretano $50.1 \pm 3.2 \times 10^5$ bact/cm ($\bar{X} \pm$ SEM), siendo aproximada-

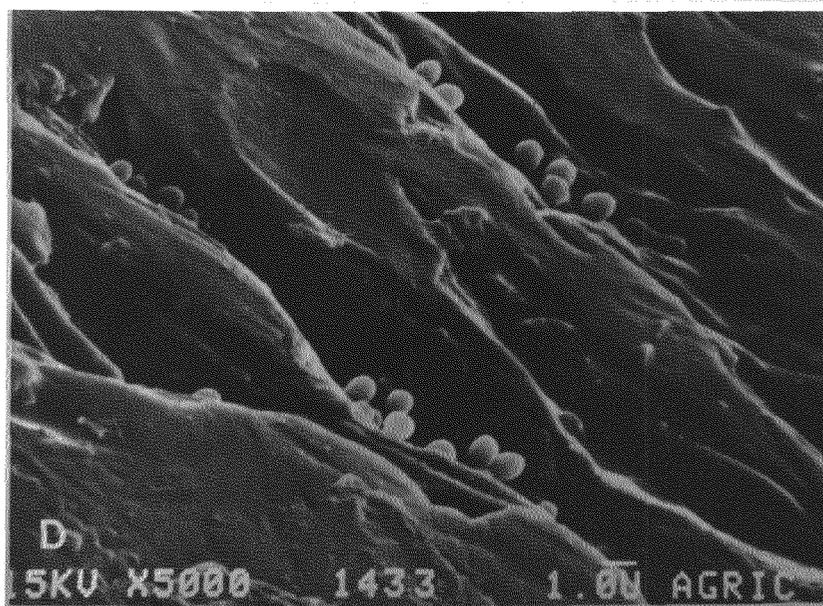
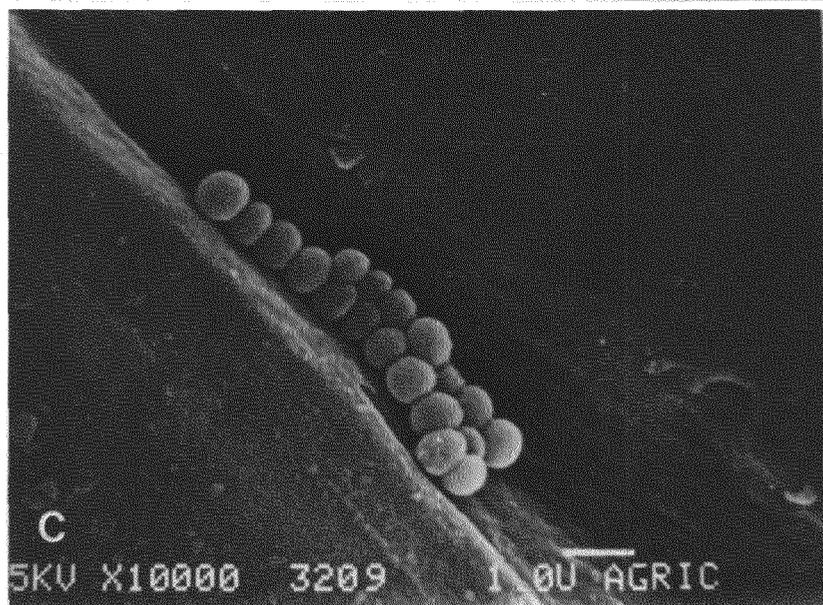


Figura 15.- Elementos celulares de ECN adheridos a la superficie de un cateter de teflón observados por Microscopía electrónica de barrido.

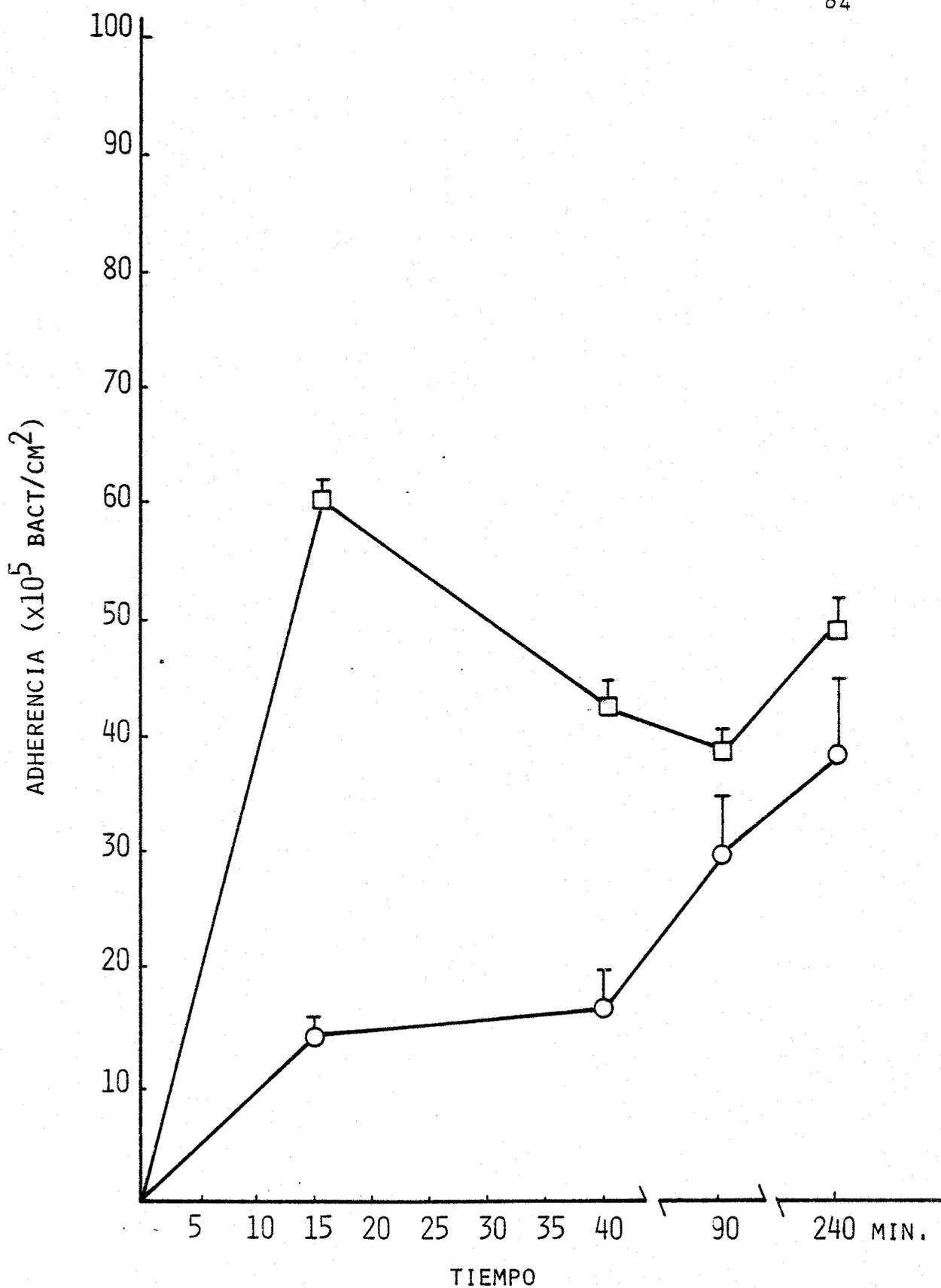


Figura 16.- Adherencia de ECN (cepa 2/81) a catéteres de teflón (○) y poliuretano (□). ($\bar{X} \pm SEM$).

mente 1.2 veces superior.

Una vez demostrada la adherencia de ECN a diferentes catéteres, el siguiente punto de interés reside en el estudio de la modulación de la adherencia por diferentes componentes para obtener más información sobre la naturaleza de esta unión, bacteria-cateter, y la forma de regularlo.

Para el estudio de modulación en teflón escogimos la cepa S.epidermidis 2/81. El tiempo de incubación es de 90 min. El hecho de escoger un sólo tiempo de incubación nos permite la realización de mayor número de pruebas a la vez, por lo tanto, en condiciones uniformes y con resultados comparables.

Se estudió la influencia de suero humano al 5 %, plasma humano al 5 %, fibronectina (20 mg/ml) y albúmina (2 mg/ml). En una serie de experimentos, las bacterias eran preincubadas (5 min. 37°C) en los diversos componentes; en otra serie, eran preincubados los catéteres (30 min.; 37°C). Finalmente se estudió la influencia del enzima proteolítico pepsina sobre la adherencia. En todas las series, los resultados se comparan a un control en el que bacterias y catéteres son preincubados en tampón fosfato.

Los resultados se exponen en la Tabla 6. El control en tampón fosfato, nos da una adherencia de

$35.1 \pm 2.3 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm$ SEM). Cuando preincubamos las bacterias en suero, la adherencia disminuye más de seis veces ($5.5 \pm 0.2 \times 10^5$ bact/cm² ($\bar{X} \pm$ SEM)). Para estudiar la posible influencia del fibrinógeno, preincubamos las bacterias en plasma y la adherencia disminuyó en algo más de 4 veces ($8.5 \pm 0.4 \times 10^5$ bact/cm²). Con fibronectina y albúmina, la adherencia disminuyó 1/2 y 1/3 respectivamente, (17.6 ± 1.7 y $12.9 \pm 1.5 \times 10^5$ bact/cm²) ($\bar{X} \pm$ SEM).

Si comparamos los resultados con los obtenidos en la modulación de la hidrofobicidad, observamos que aquellos factores que transformaban en hidrofílicas a las bacterias hidrófobas (suero, albúmina...) disminuyen de manera muy significativa la adherencia a teflón, demostrando la importancia de los enlaces hidrofóbicos en la adherencia a estos catéteres. Para confirmar estos hallazgos resultan muy interesantes los resultados del tratamiento bacteriano con pepsina en la adherencia a catéteres. De igual forma que su acción volvía a las bacterias hidrofílicas, produce una disminución de la adherencia a teflón en más de 8 veces ($4.3 \pm 0.3 \times 10^5$ bact/cm²) ($\bar{X} \pm$ SEM).

Cuando lo que se preincuba son los segmentos de catéteres, lo cual tendría una mayor aplicación práctica, los resultados son similares, si bien, más demostrativos. La preincubación en suero y plasma disminuye la adherencia a teflón en más de siete veces (4.6 ± 0.2 y $4.8 \pm 0.3 \times 10^5$ bact/cm² respectivamente) ($\bar{X} \pm$ SEM). Igualmente, disminuye alrededor de cinco

TABLA 6.- Modulación de la adherencia de ECN (cepa 2/81) a cateteres de teflón. Tiempo de incubación 90 min. ($\bar{X} \pm$ SEM).

NUMERO DE S.EPIDERMIDIS 2/81 ADHERIDOS
($\times 10^5$ Bact/cm²)

	BACTERIAS PRE INCUBADAS	CATETERES PRE INCUBADOS
Tampón fosfato	35.1 (\pm 2.3)	35.1 (\pm 2.3)
Suero 5 %)	5.5 (\pm 0.2)	4.6 (\pm 0.2)
Plasma (5 %)	8.5 (\pm 0.4)	4.8 (\pm 0.3)
Fibronectina (20 μ g/ml)	17.6 (\pm 1.7)	19.0 (\pm 1.9)
Albumina (2 mg/ml)	12.9 (\pm 1.5)	6.8 (\pm 0.3)
Bacterias tratadas con pepsina	4.3 (\pm 0.3)	-----

veces cuando se preincubaban en albúmina ($6.8 \pm 0.3 \times 10^5$ bact/cm²; $\bar{X} \pm \text{SEM}$). Sin embargo, el tratamiento con fibronectina mantiene la adherencia en niveles elevados ($19.0 \pm 1.9 \times 10^5$ bact/cm²) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). De nuevo se observa, por lo tanto, que, a mayor influencia en la hidrofobicidad por parte de los distintos componentes, mayor influencia en la adherencia.

Finalmente, se estudia la modulación por albúmina y pepsina de la adherencia de S.epidermidis 2/81 a poliuretano y teflón comparativamente, puesto que eran los componentes que mayor efecto habían demostrado en los anteriores experimentos.

Los resultados quedan expresados en la Fig. 17. Los tiempos de incubación son de 40 y 90 min. Si la disminución de la adherencia a teflón, utilizando catéteres preincubados en albúmina o bacterias tratadas con pepsina había quedado patente, más espectacular es su acción al utilizar catéteres de poliuretano. El tratamiento de las bacterias con pepsina disminuye la adherencia aproximadamente 34 veces en este tipo de catéter, dejándola en valores muy similares a los obtenidos de "background", o sea, el valor de las emisiones espontáneas en el contador ($1.3-1.5 \times 10^5$ bact/cm²). La incubación en albumina, en concentraciones equivalentes a las existentes en una solución de suero al 5 %, disminuye la adherencia a catéteres de poliuretano aproximadamente 10 veces, con valores de alrededor de 4.5×10^5 bact/cm².

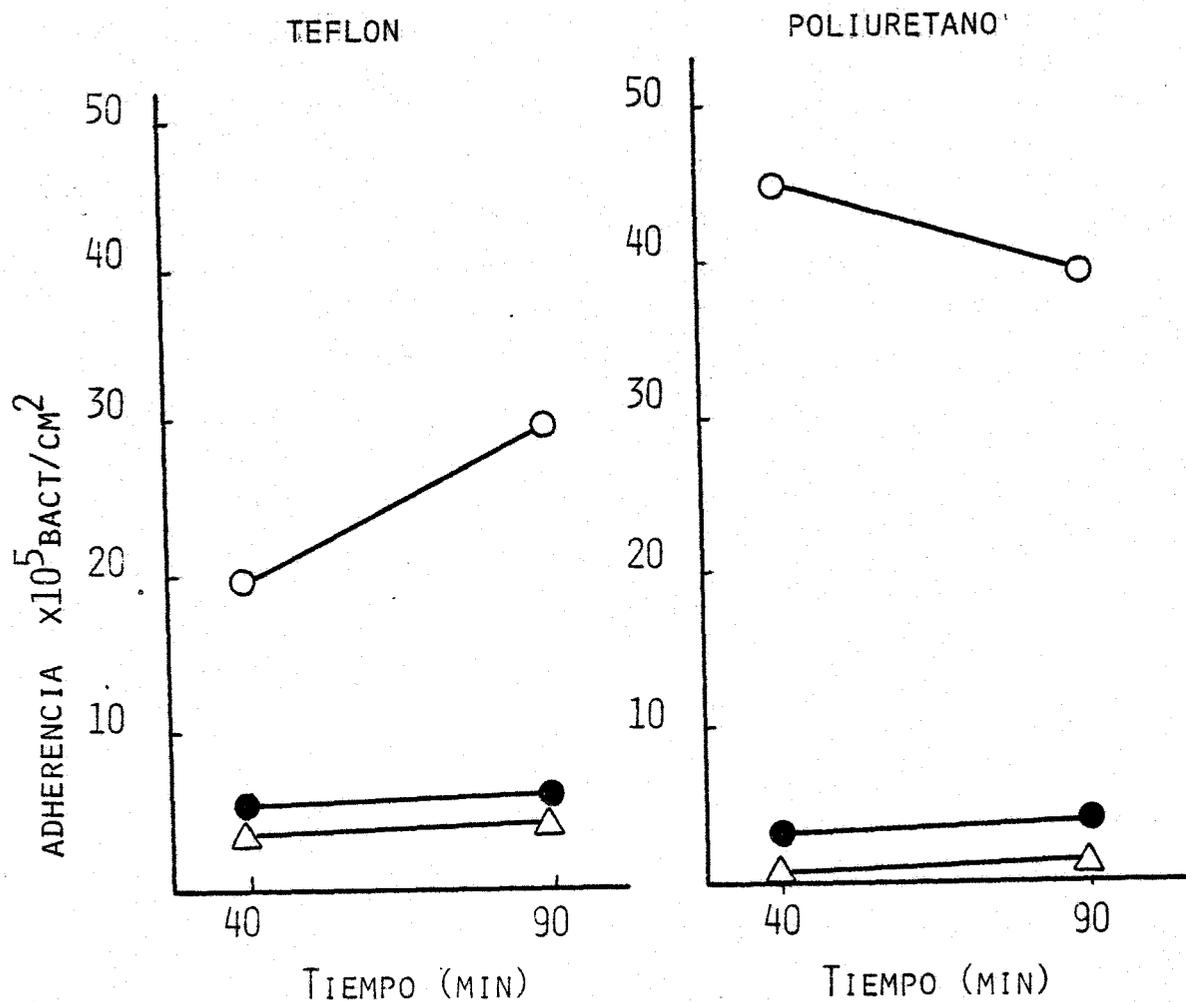


Figura 17.- modulación de la adherencia de ECN (cepa 2/81) a catéteres de teflón y poliuretano.

Control (○)

Cateteres preincubados en albúmina (2 mgr/ml) (●)

Bacterias tratadas con pepsina (△)

D I S C U S S I O N

Las propiedades de superficie y los requerimientos opsónicos de S.aureus, han sido estudiados detalladamente por diversos autores (66,67,68). Comparativamente, se ha prestado muy poca atención a las mismas propiedades en ECN, presumiblemente, debido al hecho de que estos microorganismos han sido considerados durante mucho tiempo como inofensivos o comensales.

Sin embargo, en las dos últimas décadas, ECN se ha manifestado claramente como patógeno en algunas entidades clínicas específicas. Básicamente, las infecciones por ECN inciden en pacientes que portan material protésico del tipo de shunts de derivación (4,5), válvulas cardíacas protésicas (3), catéteres plásticos (20,22), pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos (15,17) y pacientes oncológicos (68). Entre los pacientes en Cuidados Intensivos, las infecciones severas por ECN se han acentuado en recién nacidos prematuros (15).

En nuestro trabajo se estudian las propiedades de superficie, los requerimientos opsónicos y la adherencia a catéteres plásticos de 38 cepas de ECN aisladas de hemocultivos de recién nacidos prematuros con septicemia. En nuestra serie, el 73.3 % de las cepas corresponden a la especie S.epidermidis, lo que pone de manifiesto el papel predominante de esta especie en infecciones en humanos, hecho ya descrito por diversos autores que encuentran en series largas una incidencia de alrededor del 75 % de S.epidermidis en procesos patológicos de etiología atribuida a ECN (10,11,12).

Este papel preponderante está probablemente relacionado con el hecho de que S.epidermidis predomina sobre el resto de especies de ECN en la piel, aunque no se puede descartar la posibilidad de que posea factores de virulencia diferentes al resto de las especies como postulan algunos autores (69, 70).

En las infecciones producidas en humanos por ECN y relacionadas con material protésico hay que resaltar el papel que juegan las propiedades de superficie bacteriana que van a ser las responsables de la especial afinidad de ECN por el material plástico. Entre ellas destacan principalmente la capacidad de producir sustancia mucoide y la hidrofobicidad de superficie.

El papel de la sustancia mucoide en las infecciones por ECN relacionadas con material protésico y en especial con catéteres intravenosos ha sido descrita por diversos autores utilizando técnicas de microscopía electrónica de barrido (41,42,43,44). En la mayoría de las micrografías se observan microcolonias fuertemente adheridas a la superficie del catéter formadas por elementos celulares sumergidos en una sustancia extracelular de naturaleza mucoide.

En nuestra serie, los estudios de producción de sustancia mucoide "in vitro" en función de características tintoriales nos muestran que un 60.5 % de las cepas son altas productoras de la misma. Christensen y

cols (53), autor del método utilizado en nuestro estudio, obtiene un 63 % de cepas productoras en una serie de 146 cepas de ECN aisladas de muestras clínicas. Estos mismos autores observan que las cepas de ECN aisladas de procesos infecciosos, especialmente en hemocultivos tenían una mayor capacidad de producir sustancia mucoide que aquellas cepas consideradas contaminantes o aisladas de la piel (70).

No se observa en nuestros resultados relación significativa entre las diferentes especies de ECN y la capacidad de producir sustancia mucoide. Tampoco se relaciona el poseer o no esta capacidad con el porcentaje de fagocitosis por polimorfonucleares, la hidrofobicidad de superficie y la adherencia "in vitro" a catéteres plásticos como veremos más adelante. En nuestra opinión, la causa se debe fundamentalmente a dos factores. En primer lugar, el método ideado por Christensen y cols (53) para la detección de la producción de sustancia mucoide, a pesar de ser el único aceptado universalmente, no es en absoluto el idóneo, debido principalmente a la gran cantidad de factores que influyen, como es la composición del medio, fase de crecimiento bacteriano, etc.. En segundo lugar, la sustancia mucoide es de naturaleza hidrosoluble, y la serie de lavados bacterianos necesarios en los diversos métodos empleados para el estudio de la fagocitosis..., hacen muy difícil la evaluación "in vitro" del papel de la sustancia mucoide.

Muy poco se conoce acerca de la verdadera composición de la sustancia mucoide, pues, mientras que por sus características tintoriales es descrita como polisacárido (53), algunos autores observan que su producción decrece por la acción de enzimas proteolíticos (55) lo que apuntaría a un componente protéico.

Con respecto a sus funciones "in vivo", se le atribuyen propiedades de adherencia, antiopsónizantes y por lo tanto antifagocíticas (26). En estudios realizados "in vitro", Baddour y cols. (70) observan una mayor resistencia a la muerte intraleucocitaria de las cepas productoras. Gray y cols (71) describen una disminución de la respuesta linfoproliferativa de los monocitos a estimuladores policlonales, cuando se encuentran en presencia de diferentes concentraciones de sustancia mucoide, disminuyendo de manera considerable las defensas del huésped.

En conclusión, es necesario el aislamiento, purificación e identificación bioquímica de la sustancia mucoide para poder evaluar "in vitro" una acción que "in vivo" no ofrece actualmente duda alguna en cuanto a su función en la interacción de ECN con el material protésico y la capacidad de producir infección en los pacientes que lo portan.

Se han realizado numerosos estudios sobre la adherencia bacteriana a diferentes tejidos animales,

detallando hasta niveles moleculares los mecanismos específicos implicados tales como glicocalix, lectinas, pili..., sin embargo, muy poca atención ha prestado la literatura a los mecanismos inespecíficos de adherencia bacteriana, especialmente a sustratos inanimados, que han sido descritos por escaso número de autores (45,-46).

Un factor de gran importancia en los mecanismos inespecíficos de adherencia es la hidrofobicidad de superficie bacteriana. Los microorganismos de características hidrofóbicas se describen como más adherentes que los hidrofílicos a tejidos animales y biomateriales plásticos (45,76). En el caso de los biomateriales, este fenómeno se explica por la naturaleza altamente hidrófoba de sus componentes, lo que permite la actuación de fuerzas hidrofóbicas entre ambas superficies que desplazando las moléculas de agua existentes entre ellas provocan una adherencia inespecífica.

De esta manera, diversos autores sugieren que la hidrofobicidad promueve una adherencia inespecífica permitiendo el contacto de las dos superficies y estabilizando la yuxtaposición, de las mismas lo que permitiría actuar, en un segundo paso, a los mecanismos específicos de adherencia (72).

El estudio de la hidrofobicidad de superficie en nuestra serie de 38 cepas de ECN nos mostró una gran

heterogeneidad entre las distintas cepas, con unos porcentajes de absorbancia que varían de un 15 % a un 100 % y con amplio abanico de valores intermedios. Hoght y cols. (55) obtienen con cepas de ECN, resultados muy similares utilizando el mismo método. Sin embargo, estos mismos autores describen una disminución de la hidrofobicidad por efecto de la sustancia mucoide en las cepas productoras de la misma que nosotros no observamos, y que en nuestra opinión es de difícil demostración "in vitro" por los problemas metodológicos que mencionábamos anteriormente.

La hidrofobicidad de superficie en S.aureus es atribuida a la proteína A y a las proteínas de unión a fibronectina, aunque probablemente existan otra serie de estructuras actuando que hasta el momento se desconocen (73). De cualquier manera se puede descartar el peptidoglicano por su naturaleza altamente hidrofílica. Nosotros, en el caso de ECN, encontramos una relación entre las estructuras que confieren carácter hidrofóbico y los requerimientos opsonicos para la fagocitosis como se describirá posteriormente.

La interacción polimorfonuclear-bacteria es descrita clásicamente como dependiente entre otras, de fuerzas hidrofóbicas (74). Este fenómeno nos haría pensar en que la opsonización de las bacterias, esencial para una adecuada fagocitosis, se traduciría en un incremento de la hidrofobicidad de superficie.

Nuestros resultados de modulación de la hidrofobicidad nos muestran sin embargo un efecto completamente opuesto, de tal forma que tras el contacto de las bacterias con suero humano, estas se vuelven totalmente hidrofílicas con independencia del valor inicial de la hidrofobicidad. Este fenómeno sorprendente, y no descrito anteriormente por ningún autor, es debido a la acción de la albúmina, si bien puede haber otra serie de componentes involucrados. Sin embargo las opsoninas no tienen efecto alguno demostrable.

Este hecho podría significar que quizás la hidrofobicidad jugaría "in vivo" un papel menos relevante que el que se le atribuye, desde el momento en que independientemente de sus características hidrófobas iniciales, tras el contacto con suero humano, el carácter de la superficie bacteriana se vuelve totalmente hidrófilico.

Finalmente, el efecto de los enzimas proteolíticos sobre la hidrofobicidad de superficie es similar al obtenido por Hogt y cols. (55); la tripsina no presenta acción alguna mientras que la pepsina vuelve las bacterias hidrofílicas por desprendimiento de los grupos hidrofóbicos, lo que confirma la naturaleza proteica de los mismos.

Existen diferentes métodos de estudio de la hidro-

fobicidad, aunque el método de afinidad a hidrocarburos (sistema bifásico agua-xileno) utilizado por nosotros reúne dos importantes características, sencillez técnica y reproductibilidad. Otros métodos se basan en la adherencia a superficie plástica (46,75), agregación bacteriana en solución salina (76,77) o cromatografía (78).

Los estudios de quimioluminiscencia celular, nos muestran que la capacidad de producir sustancia mucoide y el carácter más o menos hidrofóbico de la superficie bacteriana, no se traduce en una alteración del metabolismo del leucocito polimorfonuclear durante la fagocitosis, por lo que no parece que confiera a las bacterias un mecanismo especial de resistencia frente a los mecanismos bactericidas del leucocito polimorfonuclear como describieron en el caso de la sustancia mucoide Baddour y cols. (70).

Los requerimientos opsónicos para la fagocitosis en suspensión de estafilococo, han sido bien caracterizados, en particular, para la clásica especie patógena S.aureus (31,32). En estos exhaustivos estudios se muestra que para la fagocitosis de S.aureus suspendido en medio acuoso se necesita la acción conjunta de opsoninas termoestables y termolábiles, es decir, IgG y complemento respectivamente (32,79). Sin embargo, poco se conoce de los requerimientos opsónicos de ECN en iguales condiciones.

Los resultados del presente estudio demuestran que los requerimientos para la fagocitosis de ECN difieren considerablemente de los de S.aureus.

En el 58 % de las cepas de ECN estudiadas, las opsoninas termolábiles no eran necesarias para una eficiente ingestión en suspensión por leucocitos polimorfonucleares. En contraste, en ausencia de estas opsoninas termolábiles, no ocurre la fagocitosis de S.aureus, debido al hecho de que la proteína A de la pared celular de éste, fija las moléculas de IgG por la fracción Fc, haciendo por lo tanto a estas opsoninas inaccesibles al receptor Fc del leucocito polimorfonuclear y por tanto opsonicamente inactivas (33).

Un fenómeno similar podría ocurrir en el restante 42 % de las cepas de ECN investigadas en este estudio, las cuales, para una adecuada ingestión, demostraron ser dependientes de la opsonización por opsoninas termolábiles.

Este último grupo de cepas demostró ser mucho más hidrófobo que el primero. Esta relación entre la dependencia de opsoninas termolábiles con los grupos hidrofóbicos se confirma desde el momento que al desprender dichos grupos mediante el tratamiento bacteriano con pepsina, se obvió la dependencia del comple-

mento. En otras palabras, las bacterias se vuelven hidrofílicas y no necesitan la presencia del complemento para una adecuada fagocitosis tras el tratamiento proteolítico con pepsina.

Sin embargo, en nuestros resultados, se observa que al desprender los grupos hidrofóbicos, no se impide la fijación de la fracción C3 del complemento en la envuelta celular de estafilococo. Este fenómeno ofrece evidencia de que la dependencia de opsonización vía complemento no está relacionada con la hidrofobicidad "per se", lo que también queda indicado por el hecho de que existen algunas cepas hidrófobas que para una adecuada opsonización no eran dependientes del complemento.

Una explicación posible sería, que tras el desprendimiento de los grupos hidrofóbicos, las moléculas de C3 fijadas a la superficie serían opsónicamente inactivas (C3b convertido en C3d) o inaccesibles al receptor C3 del leucocito polimorfonuclear. Alternativamente, los grupos protéicos hidrofóbicos de las cepas de ECN que para una adecuada opsonización dependen de la fijación de C3 podrían tener, como se sugirió anteriormente, una función similar a la proteína A de S.aureus, uniendo la molécula de IgG por la fracción Fc y transformando estas moléculas en opsónicamente inactivas, por lo que necesitarían el concurso del complemento para ser fagocitadas.

Si tenemos en cuenta que, tras el tratamiento con pepsina, la eficacia de las opsoninas termoestables aumenta considerablemente y la fijación de C3 a la pared celular no disminuye, la última podría ser la teoría correcta si bien, serían necesarios estudios utilizando las proteínas hidrofóbicas aisladas de las cepas de ECN que para una adecuada opsonización dependen del complemento, para poder responder adecuadamente a esta cuestión.

Es importante resaltar que a pesar de que la posesión de grupos hidrofóbicos por parte de una cepa de ECN se traduce en unos especiales requerimientos opsonicos, sin embargo no se observa relación entre el carácter más o menos hidrofóbico de una cepa y el porcentaje de fagocitosis cuando utilizamos bacterias opsonizadas en suero humano, lo que quiere decir que la actuación conjunta de los dos sistemas de opsoninas se traduce en una adecuada fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares para todas las cepas de ECN cuando se encuentran suspendidas en un medio acuoso, independientemente de su carácter más o menos hidrófobo.

Contrariamente a nuestros hallazgos, Absolom y cols (80) postulan que el carácter hidrófobo de una superficie bacteriana se traduce "in vitro" en una mejor fagocitosis en un medio acuoso debido exclusivamente a leyes físicas. Para estos autores sin embargo, el carácter hidrófobo implica "in vivo" una mayor

adsorción inespecífica de moléculas de IgG que son de naturaleza hidrófoba también, facilitando por lo tanto la fagocitosis. En nuestra opinión no existe actualmente duda alguna del carácter específico de la unión de la fracción Fab de la molécula de IgG opsonizante a los receptores correspondientes de la superficie bacteriana, y nunca podrían ser sustituido por un fenómeno puramente adsortivo e inespecífico.

No son numerosos los trabajos encontrados en la literatura que estudien los requerimientos opsónicos de ECN en suspensión. Verhoef y cols (66) utilizando solamente 3 cepas de S.epidermidis confirman nuestros hallazgos con respecto a la gran heterogeneidad entre las distintas cepas de ECN en cuanto a requerimiento opsónicos se refiere, para una adecuada fagocitosis, observando cepas dependientes del complemento y cepas dependientes de la IgG. Sin embargo, Miller y Beck (81), utilizando metodología diferente afirman que S.epidermidis no necesita ser opsonizado para una adecuada fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares.

La fagocitosis de ECN adherido a superficie plástica, difiere marcadamente de la de S.aureus. La opsonización es un requisito indispensable para una eficiente ingestión de ECN, mientras que los porcentajes de fagocitosis de las cepas de S.aureus sin opsonizar son considerablemente más elevados.

Este último hecho es corroborado por los trabajos de Lee y cols. (38, 39) y Vandenbroucke y cols (40) que observan una eficiente fagocitosis de S.aureus sin opsonizar cuando las bacterias están adheridas a plástico o cristal.

La eficacia de la fagocitosis aumenta considerablemente en presencia de opsoninas, comportandose todas las especies estafilococicas de manera semejante en esta situación.

Profundizando más en nuestros resultados, se observa, que para una eficiente fagocitosis en superficie, tanto de S.aureus como de ECN, solamente es necesaria la opsonización por la IgG, mientras que el complemento no es necesario como opsonina. En otras palabras, no existen diferencias significativas en la fagocitosis cuando las bacterias se opsonizan en suero humano con o sin complemento. Este fenómeno no es sólo aplicable a las cepas de S.aureus, como dijimos anteriormente, sino también a las cepas de ECN que para una fagocitosis eficiente en suspensión requerían indispensablemente la acción de estas opsoninas termolábiles.

Estos hallazgos, extienden las observaciones descritas anteriormente por Vandenbroucke y cols (40). Estos autores descubren que el tratamiento de los

polimorfonucleares con pronasa, sustancia que destruye los receptores para la fracción C3b en los polimorfonucleares y por lo tanto bloquea la unión de las opsoninas termolábiles, no inhibe la fagocitosis de superficie de cepas de S.aureus opsonizadas, demostrando que la acción del complemento no es indispensable en esta situación a pesar de que en suspensión, y debido a la acción de la proteína A, la única fuente opsónica funcionante para S.aureus es el complemento.

Observamos pues una marcada diferencia en los requerimientos opsónicos para la fagocitosis en suspensión y en superficie de un número de cepas de estafilococo, especialmente de aquellas para las que la fagocitosis en suspensión era dependiente del complemento. Para estas cepas, la adherencia a la superficie plástica hidrofóbica de poliestireno, tiene el mismo efecto que el tratamiento con pepsina, es decir, incremento de la eficacia de la IgG como opsonina y pérdida de la dependencia del complemento para la opsonización.

Una posible explicación, aunque entrando en el campo de la hipótesis, es que, si tenemos en cuenta que la adherencia de ECN a superficies hidrófobas envuelven uniones hidrofóbicas entre la bacteria y el sustrato, bien podría ocurrir que la adherencia de estas cepas requiera movimiento de los grupos hidrofobicos al área de la envuelta celular en contacto con el sustrato, dejando el resto de la superficie celular relativamente

libre de grupos hidrofóbicos como ocurría tras el tratamiento con pepsina.

Alternativamente, el complemento y una superficie sólida, podrían proveer una fijación adicional de la bacteria y de este modo promover la fagocitosis de bacterias para las que la opsonización con IgG sola, era inefectiva en suspensión debido al efecto antiopsónico de componentes en la pared celular tales como la proteína A de S.aureus, o los grupos hidrofóbicos de ECN.

Ambos, complemento y sustrato sólido actuarían como un adicional mecanismo de sujeción permitiendo al polimorfonuclear activar su mecanismo "detonador" de la ingestión que es dependiente del receptor Fc de la IgG (74), incluso cuando la densidad de estas fracciones disponible fuera baja.

Existen opiniones contradictorias entre diferentes autores sobre el papel de la glicoproteína fibronectina en la fagocitosis de estafilococo. Fibronectina es una glicoproteína a la que se atribuyen importantes funciones de adhesión entre las células eucariotas y que se encuentra también en pequeñas concentraciones en plasma humano. Un grupo de autores defienden el papel opsonizante de fibronectina para S.aureus (82,83). Un segundo grupo le atribuyen un papel de cofactor en la opsoniza-

ción (84). Sin embargo, la teoría más extendida y encabezada por Verhoef y cols. es la ausencia de papel alguno en la fagocitosis de S.aureus (85, 86).

Nuestros resultados no muestran efecto alguno de la fibronectina en la fagocitosis de ECN. El problema de la gran controversia entre los diferentes autores puede radicar en los distintos métodos empleados para el aislamiento y purificación de fibronectina que permiten obtener según los casos, un compuesto más o menos contaminado por otros componentes del suero tales como albúmina, etc...

En nuestra serie, no observamos una relación significativa entre la hidrofobicidad bacteriana y el porcentaje de fagocitosis en superficie en las cepas de ECN. Resultados diferentes observa Van Oss y cols (75) que encuentran que las bacterias son fagocitadas cuando su hidrofobicidad es mayor que la del leucocito polimorfonuclear y postula, aunque no lo demuestra, que la opsonización aumenta la hidrofobicidad de superficie.

En nuestra opinión, el problema es metodológico, pues Van Oss y cols. (75) miden la hidrofobicidad bacteriana determinando el ángulo de contacto de bacterias suspendidas en solución salina a superficies hidrofílicas. Teniendo en cuenta que las bacterias hidrófobas se adhieren muy pobremente a estas superfi-

cies, es difícil realmente correlacionar los ángulos de contacto con la naturaleza hidrofóbica de tales bacterias.

Tampoco observamos una menor fagocitosis de aquellas cepas capaces de producir sustancia mucoide cuando las bacterias se encuentran adheridas a una superficie plástica.

Completamos nuestro trabajo con un estudio cuantitativo de la adherencia de ECN a catéteres plásticos intentando poner de manifiesto el papel que juega la hidrofobicidad de superficie.

En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas de cuantificación de la adherencia a catéteres (87,88), sin embargo, el método de bacterias marcadas utilizado por nosotros parece el más digno de confianza por la alta reproducibilidad y sencillez técnica.

Los resultados obtenidos con los catéteres de teflón, material sintético de características hidrofóbicas utilizado frecuentemente en la fabricación de catéteres, muestran que la adherencia de ECN alcanza valores elevados en pocos minutos, con una clara dependencia del tiempo de incubación. El hecho de utilizar en nuestra técnica bacterias suspendidas en

tampón fosfato sin ninguna clase de nutrientes nos empieza a apuntar a una interacción mediada por mecanismos inespecíficos de adherencia.

Efectivamente, nuestros resultados muestran la importancia de las uniones hidrofóbicas en la adherencia de ECN a catéteres de teflón. Hogt y cols (56) llegan a las mismas afirmaciones utilizando diversos biomateriales y metodología diferente.

El papel de la sustancia mucoide "in vivo" en la adherencia de ECN a catéteres ha sido postulada por diferentes autores (41, 42, 43, 44). En nuestros resultados "in vitro" no se observa relación alguna entre la capacidad de producir sustancia mucoide y la adherencia a catéteres. Estos hallazgos confirman la teoría de que en la interacción bacteria-cateter actuarían en primer lugar unos mecanismos inespecíficos de adherencia del tipo de la hidrofobicidad que provocan la yuxtaposición de las dos superficies y permiten en un segundo lugar, la actuación de mecanismos específicos que organizan definitivamente esa adherencia. Ashkenazi y cols (44) defienden esta teoría al observar que la adherencia "in vitro" a catéteres no se modifica al utilizar bacterias muertas.

En el caso de ECN, en un medio adecuado y rico en

casaminoácidos y glucosa entre otros, tras el primer contacto mediado por mecanismos inespecíficos, las cepas que posean esta capacidad producirían sustancia mucoide que además de acentuar la fijación bacteriana, impediría una adecuada opsonización y por lo tanto la actuación de los fagocitos circulantes. Peters y cols (26), exponen incluso la posibilidad de que las bacterias adheridas pudieran tomar nutrientes de algunos de los componentes orgánicos del propio cateter, o incluso de las bacterias muertas, cuando se encuentran en condiciones adversas.

Los catéteres de poliuretano son un tipo de cánulas fabricadas con un material de características hidrófobas y que se encuentran todavía en fase de experimentación. Sus ventajas radican en una serie de características físicas, y que a diferencia del teflón, no se produce una disminución de la luz del catéter en las acodaduras, con las ventajas hidrodinámicas que ello conlleva. Sin embargo, en nuestros resultados de adherencia de ECN; los primeros realizados con este material, se observa un importante incremento en la adherencia sobre la obtenida con catéteres de teflón, especialmente en los primeros 90 min. llegando en ocasiones a ser 4-5 veces superior, aunque a partir de este tiempo, el porcentaje de adherencia es prácticamente igual en ambos tipos de catéteres.

Será necesario evidentemente la realización de

nuevos estudios antes de confirmar las ventajas o desventajas del poliuretano sobre los materiales clásicamente utilizados en la fabricación de catéteres.

Sugarman (89) observa una adherencia hasta 100 veces mayor en dacrón que en teflón por parte de algunas enterobacterias. Ashkenazi y cols. (44) demuestra una mejor adherencia de S.aureus a catéteres de teflón que a agujas de acero y siliconizadas. Solamente Franson y cols (90) estudian la adherencia "in vitro" de ECN a catéteres plásticos y observan que estos microorganismos adhieren mejor a catéteres de cloruro de polivinilo que a catéters de teflón.

Estos resultados sugieren la importancia de la composición del material utilizado para la fabricación de catéteres en la adherencia bacteriana a los mismos, como previamente habían descrito Sheth y cols (88). En este sentido, aunque todavía existe una importante influencia metodológica, las dificultades se van superando, y este tipo de estudios de adherencia se deben sumar a la gran gama de pruebas hidrodinámicas y físicas en general a la que son sometidas los biomateriales en experimentación.

Finalmente, los resultados de la modulación de la adherencia obtenidos, están muy relacionados con la

modulación de la hidrofobicidad, de tal manera, que aquellos componentes que volvían hidrofílica la superficie bacteriana disminuyen muy significativamente la adherencia a superficies plásticas hidrofóbicas como son el teflón y el poliuretano, hecho que corrobora la importancia de las uniones hidrofóbicas en la interacción bacteria-cateter. Tal es el caso del suero y el plasma humano, acción que puede ser debida a la albúmina fundamentalmente. Vaudaux y cols (91) observan un efecto similar del suero y plasma en la adherencia de S.aureus a superficies de polimetacrilato.

Los resultados obtenidos con el tratamiento bacteriano con pepsina, también confirman la importancia de las uniones hidrofóbicas desde el momento en que al desprenderse los grupos hidrofóbicos por el tratamiento proteolítico la adherencia disminuye a valores mínimos, siendo este efecto más espectacular en catéteres de poliuretano.

De la misma manera que existian posturas contradictorias en cuanto al papel de la fibronectina en la opsonización y fagocitosis de estafilococo, no existe unanimidad en cuanto a su papel en la adherencia de bacterias a superficies plásticas. Vaudaux y cols (91, 92) observan una adsorción de fibronectina mediada por uniones hidrofóbicas a la superficie de polimetacrilato que promueve la adherencia de S.aureus.

En nuestro estudio se observa una ligera disminución de la adherencia de ECN cuando los catéteres de teflón se preincubaban en fibronectina. Una posible explicación, aparte del diferente material plástico utilizado, sería que la solución de fibronectina estuviera "contaminada" por otras proteínas séricas de naturaleza hidrofóbica que compitieran en la adsorción a la superficie plástica. La disminución de la adsorción de fibronectina a polimetacrilato mediada por la presencia de diferentes proteínas séricas ha sido descrita por varios autores (93, 94, 95).

Otra posible explicación sería los cambios significativos que sufre la fibronectina en cuanto a su conformación y actividad biológica cuando se utiliza a bajas concentraciones en soluciones tampón (94, 95), lo que se traduciría en una disminución de la adherencia.

De cualquier manera, se necesitan mayor número de estudios sobre la modulación de la adherencia a catéteres para encontrar aplicaciones prácticas. La utilización de niveles bajos de heparina para prevenir la formación del manguito de fibrina que se produce alrededor del catéter una vez introducido, ha reducido la incidencia de sepsis relacionada al uso de los mismos según algunos autores (96). Nosotros hemos demostrado que la unión de la bacteria al catéter está mediada por uniones hidrofóbicas y que el viraje a hidrofílica de la superficie del catéter se traduce en una disminución de la adherencia, lo cual, sopesando

los problemas hidrodinámicos que pudiera conllevar, deja una puerta abierta para su aplicación en la fabricación de catéteres que eviten de alguna manera la adherencia inespecífica de bacterias.

En resumen, se observan marcadas diferencias en los requerimientos opsonicos para una eficiente fagocitosis de suspensión entre diferentes cepas de ECN aisladas de muestras clínicas, siendo las cepas dependientes del complemento significativamente más hidrófobas.

La opsonización, en contraste con S.aureus, es un requisito indispensable para la fagocitosis de ECN adherido a superficie plástica, si bien la actuación de las opsoninas termolábiles no es estrictamente necesaria en estas condiciones.

Estos hallazgos pueden explicar la especial incidencia de infecciones por ECN en huéspedes con escasa concentración de opsoninas como son los recién nacidos prematuros o en pacientes que portan material protésico en áreas donde la concentración de opsoninas es baja tal como ocurre en líquido cefalorraquídeo.

La adherencia de ECN a catéteres de teflón y poliuretano está mediada por uniones hidrofóbicas y es creciente en el tiempo. La transformación de la superficie del cateter de hidrofóbica a hidrofílica, se traduce en una disminución significativa de la adherencia bacteriana.

CONCLUSIONES

1. S.epidermidis es la especie más frecuentemente aislada en infecciones producidas por ECN. En nuestra serie constituye el 76.3 % de 38 cepas aisladas de hemocultivos de recién nacidos prematuros con septicemia.
2. La mayoría de nuestras cepas poseen la capacidad de producir "in vitro" una sustancia extracelular de naturaleza mucoide. Del total, un 60.5 % de las cepas son altas productoras y un 18.4 % escasas productoras.
3. Se observa una gran heterogeneidad en los valores de hidrofobicidad de superficie para las cepas de ECN en estudio. El rango oscila de 15 % a 100 %.
4. No se observa relación estadísticamente significativa entre la hidrofobicidad de superficie, capacidad de producir sustancia mucoide y especies de ECN.
5. La mayor o menor hidrofobicidad de superficie, así como la capacidad de producir sustancia mucoide por parte de una cepa de ECN no produce alteraciones significativas en el metabolismo del leucocito poli-

morfonuclear durante el proceso de la fagocitosis, estudiado por la emisión de quimioluminiscencia.

6. La incubación de las diferentes cepas de ECN en suero humano convierte las bacterias en totalmente hidrofílicas con independencia de sus valores iniciales de hidrofobicidad. Este efecto es debido fundamentalmente a la acción de la albúmina.
7. El tratamiento proteolítico con pepsina de cepas de ECN transforma las bacterias en totalmente hidrofílicas por desprendimiento de los grupos hidrofóbicos, lo que manifiesta el carácter protéico de los mismos. Este fenómeno no se produce con el tratamiento con tripsina.
8. Se observa una gran heterogeneidad en los requerimientos opsónicos de ECN para una adecuada fagocitosis en suspensión por leucocitos polimorfonucleares. Un 42 % de las cepas en estudio requieren la actuación del complemento para la opsonización mientras que el restante 58 % son adecuadamente opsonizadas en ausencia del mismo.
9. Las cepas de ECN que necesitan la acción de las opsoninas termolábiles para una adecuada fagocitosis en suspensión son significativamente más hidrófobas

que el resto de las cepas.

10. Obtenemos evidencia de que los grupos hidrofóbicos de ECN pueden actuar de manera similar a la proteína A de S.aureus fijando la IgG por su fracción Fc y haciéndola opsónicamente inactiva. Serían necesarios estudios utilizando grupos hidrofóbicos aislados para confirmar esta aseveración.
11. A diferencia de las cepas de S.aureus, la opsonización es un fenómeno absolutamente indispensable para la fagocitosis de ECN adherido a superficie plástica.
12. No existen diferencias significativas en los porcentajes de fagocitosis de S.aureus y ECN adheridos a superficie plástica una vez opsonizados en suero humano. Tampoco se observan diferencias cuando se utiliza como fuente opsónica suero descomplementado.
13. La fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares de ECN adherido a plástico no requiere la acción del complemento como opsonina, incluso en las cepas que muestran dependencia del complemento para una adecuada fagocitosis en suspensión. Este fenómeno se hace extensible a las cepas de S.aureus.

14. En nuestros estudios de fagocitosis "in vitro", la glicoproteína fibronectina no posee capacidad opsonizante para las cepas de ECN.
15. No observamos diferencias significativas en los porcentajes de fagocitosis entre cepas productoras y no productoras de sustancia mucoide, ni entre cepas hidrófobas e hidrófilas, tanto en fagocitosis en suspensión como en superficie.
16. La adherencia "in vitro" de ECN a catéteres plásticos aumenta en el tiempo y está mediada por uniones hidrofóbicas.
17. La adherencia de ECN a catéteres de poliuretano "in vitro" es significativamente más rápida que la adherencia a catéteres de teflón, especialmente en los primeros 90 minutos de incubación.
18. No observamos relación entre la capacidad de producir sustancia mucoide por ECN y la adherencia a catéteres plásticos "in vitro".
19. La conversión en hidrofílica de una de las superficies, bien la bacteriana o la del catéter, por diferentes tratamientos, se manifiesta en una disminución significativa de la adherencia de ECN.

20. La preincubación de los catéteres en solución de fibronectina no se traduce en un incremento de la adherencia de ECN "in vitro".

21. El desprendimiento de los grupos hidrofóbicos de ECN por acción proteolítica provoca una disminución significativa de la adherencia a catéteres plásticos, fenómeno más pronunciado en los catéteres de poliuretano.

B I B L I O G R A F I A

1. Christensen, G.D., Bisno, A.L., Parisi, J.K., McLaughlin, B., Hester, M.G., Luther, R.W. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant Staphylococcus epidermidis. Ann.Inter.Med. 96:1-10, 1982.
2. Wade, J.C., Schimpff, S.C., Newman, K.A., Wiernick, P.H. Staphylococcus epidermidis: an increasing cause in patients with granulocytopenia. Ann.Intern.Med. 97:503-508, 1982.
3. Karchmer, A.W., Archer, G.L., Dismukes, W.E. Staphylococcus epidermidis prosthetic valve endocarditis and clinical observations as guide to therapy. Ann.Intern.Med. 98:447-455, 1983.
4. Schoenbaum, S.C., Gardner, P., Shillito, J. Infections of cerebrospinal fluid shunts: epidemiology, clinical manifestations and therapy. J.Infect.Dis. 5:543-552, 1975.
5. Shurtlett, D.B., Foltz, E.L., Weeks, R.D., Loeser, J. Therapy of Staphylococcus epidermidis: infections associated with cerebrospinal fluid shunts. Pediatrics. 53:55-62, 1974.

6. Baird-Parker, A.C. Staphylococci and their classification. Ann.NY.Acad.Sci. 128:4-16, 1965.
7. Kloos, W.E., Schleifer, K.H. Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species. J.Clin.Microbiol. 1:82-88, 1975.
8. Kloos, W.E. Natural populations of the genus Staphylococcus. Ann.Rev.Microbiol. 34:559-566, 1980.
9. Sewel, C.M. Coagulase-negative staphylococci and the Clinical Microbiology Laboratory. Eur.J.Clin.-Microbiol. 3:94-95, 1984.
10. Sewell, C.M., Clarridge, J.E., Young, E.J., Cuthrie, R.K. Clinical significance of coagulase--negative staphylococci. J.Clin.Microbiol. 16:236--239, 1982.
11. Eng, R.H.K., Wang, C., Person, A., Kichn, T.E., Amstrong, D. Species identification of coagulase--negative staphylococcal isolates from blood cultures. J.Clin.Microbiol. 15:439-442, 1982.
12. Gill, V.J., Selepak, S.T., Williams, E.C. Species

identification and antibiotic susceptibilities of coagulase negative staphylococci isolated from clinical specimens. J.Clin.Microbiol. 18:1314-1319, 1983.

13. Wallman, K.G., Arremark, I., Telander, B. Staphylococcus saprophyticus: a frequent cause of acute urinary tract infections among female outpatients. J.Infect.Dis. 138:791-797, 1978.
14. Jordan, P.A., Irvani, A., Richard, G.A., Baer, H. Urinary tract infections caused by Staphylococcus saprophyticus. J.Infect.Dis. 142:510-515, 1980.
15. Fleer, A., Senders, R.C., Visser, M.R., Biljmer, R.P., Gerards, L.J., Kraijeveld, C.A., Verhoef, J. Septicemia due to coagulase negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: clinical and bacteriological features and contaminated parenteral fluids as a source of sepsis. Pediatr.Infect.-Dis. 2:426-431, 1983.
16. Verhoef, J., Fleer, A. Staphylococcus epidermidis endocarditis and Staphylococcus epidermidis infections in an intensive care unit. Scand.J.Infect.-Dis. 41 (suppl):56-63, 1983.

17. Young, L.S. Nosocomial infections in the immunocompromised adult. *Am.J.Med.* 70:383-404, 1981.
18. Haley, C.E., Gregory, W.W., Donowitz, L.G., Wenzel, R.P. Neonatal intensive care unit (NICU) bloodstream infections (BSI): emergence of gram positive bacteria as major pathogens. 22nd Intersci.Conf.-Antimicrob.Agents Chemother., Miami Beach, Abstr 691, American Society for Microbiology. Washington D.C. 1982.
19. Forse, R.A., Dixon, C., Bernard, K., Martinez, L., Mc Lean, A.P., Meakins, J.L. Staphylococcus epidermidis: an important pathogen. *Surgery.* 86:507-514, 1979.
20. Sitges-Serra, A., Puig, P., Jaurrieta, E., Garau, J., Alastrue, A., Sitges-Serra, A. Catheter sepsis due to Staphylococcus epidermidis during parenteral nutrition. *Surg.Gynecol.Obstet.* 151:481-485, 1980.
21. Martinez, F., Alvarez, C., León M., Suarez, A., Galvez, J., Perea, E.J. Bacteriemias secundarias a cánulas percutáneas intravasculares. *Med.Clin.* 84:734-737, 1985.

22. Rubin, J., Rogers, W.A., Taylor, H.M., Everett, E.D., Prowant, B.F., Frub, L.V., Nolph, K.D. Peritonitis during continous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann.Intern.Med.* 92:7-13, 1978.
23. Knight, K.R., Polak, A., Crump, J., Maskell, R. Laboratory diagnosis and oral treatment of CAPD peritonitis. *Lancet.* ii: 1301-1304, 1982.
24. Maki, D.G. Infections associated with intravascular lines. pp:309-364. In: Remington, J.S. and Swartz, N. (Eds). *Current Clinical topics in infectious diseases.* Mc Graw-Hill Book Company. New York, 1982.
25. Lowy, F.D., Hammer, S.H. Staphylococcus epidermidis infections. *Ann.Intern.Med.* 99:834-839, 1983.
26. Peters, G., Locci, R., Pulverer, G. Adherence and growth of coagulase negative staphylococci on surface of intravenous catheters. *J.Infect.Dis.* 146:-479-482, 1982.
27. Bayston, R., Penny, S.R. Excesive production of mucoid substance in Staphylococcus SII A: a possible factor in colonization of Holter shunts. *Dev.-Med.Child.Neurol.* 27 (supl):25-28, 1972.

28. Verhoef, J., Verbrugh, H.A. Host determinants in staphylococcal disease. *Ann.Rev.Med.* 32:107-122, 1981.
29. Granström, M., Julander, I.G., Hedström, S.A., Möllby, R. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against teichoic acid in patients with staphylococcal infections. *J.Clin.Microbiol.* 17:640-646, 1983.
30. Wheat, L.J., Wilkinson, B.J., Kohler, R.B., White, A.C. Antibody response to peptidoglycan during staphylococcal infections. *J.Infect.Dis.* 147:16-22, 1983.
31. Peterson, P.K., Verhoef, J., Sabath, L.D., Quie, P.G. Extracellular and bacterial factors influencing staphylococcal phagocytosis and killing by human polymorphonuclear leukocyte. *Infect.Immun.* 14:496-501, 1976.
32. Wheat, L.J., Humphreys, D.W., White, A. Opsonization of staphylococci by normal human sera: the role of antibody and heatlabile factors. *J.Lab.-Clin.Med.* 83:73-78, 1974.

33. Verbrugh, H.A., Van Dijk, W.C., Peters, R., Van Erm, M.E., Daha, M.R., Peterson, P.K., Verhoef, J. Opsonic recognition of staphylococci mediated by cell wall peptidoglycan: antibody-independent activation of human complement and opsonic activity of peptidoglycan antibodies. *J.Immunol.* 124:1167-1173, 1980.
34. Baehner, R.L., Nathan, D.G. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science.* 155: 835-836, 1967.
35. Wood, W.B. Jr, Smith, M.R., Watson, B. Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia. IV. The mechanism of phagocytosis in absence of antibodies. *J.Exp.Med.* 84:387, 1946.
36. Wood, W.R. Jr., Smith, M.R., Perry, W.P., Berry, J.W. Studies in the cellular immunology of acute bacteriemia. I. Intravascular leukocytic reaction and surface phagocytosis. *J.Exp.Med.* 94:521. 1951.
37. Smith, M.R., Wood, W.R. Jr. Surface phagocytosis: further evidence of its destructive action upon fully encapsulated pneumococci in the absence of type specific antibody. *J.Exp.Med.* 107:1, 1957.

38. Lee, D.A., Hoidal, J.R., Clawson, C.C., Quie, P.G., Peterson, P.K. Phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa adherent to plastic, agar or glass. J.Immunol.Methds. 63:103-114, 1983.
39. Lee, D.A., Hoidal, J.R., Garlich, D.J., Clawson, C.C., Quie, P.G., Peterson, P.K. Opsonic-independent phagocytosis of surface adherent bacteria by human alveolar macrophages. J.Leukocyte.Biol. 36:-689-701, 1984.
40. Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Thijssee H.M.W.M., Verhoef, J. Interaction between human polymorphonuclear leukocytes and Staphylococcus aureus in the presence and absence of opsonins. Immunology. 52:-427-435, 1984.
41. Locci, R., Peters, G., Pulverer, G. Microbial colonization of prosthetic devices. I. Microtopographical characteristics of intravenous catheters as detected by scanning electron microscopy. Zbl.-Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.B. 175:285-291, 1981.
42. Peters, G., Locci, R., Pulverer, G. Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intrave-

- nous catheters. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.B. 173:292-299, 1981.
43. Locci, R., Peters, G., Pulverer, G. Microbial colonization of prosthetic devices. III. Adhesion of staphylococci to lumina of intravenous catheters perfused with bacterial suspensions. Zbl.Bakt.Hyg. I.Abt.Orig.B. 173:300-307, 1981.
44. Ashkenazi, S., Mirelman, D. Adherence of bacteria to pediatric intravenous catheters and needles and its relation to phlebitis in animals. *Pediatr.Res.* 18:1361-1366, 1984.
45. Magnusson, K.E. Hydrophobic interaction, a mechanism of bacterial binding. *Scand.J.Infect.Dis.* 33-(suppl):32-36, 1982.
46. Rosenberg, M. Bacterial adherence to polystyrene. A replica method for screening for bacterial hydrophobicity. *Appl.Environ.Microbiol.* 42:375-377, 1981.
47. Kloos, E.E., Smith, P.B. Staphylococci. pp 83-87. In Lennette E.H., Balows, A., Hasler, W.J., Truant, J.P (Ed). *Manual of clinical microbiology*, 3^a

- edición. American society for Microbiology. Washington D.C., 1980.
48. Moore, G.E., Gener, R.E., Franklin, H.A. Culture of normal human leukocytes. JAMA. 199: 519-523, 1967.
49. Roord, J.J., Daha, M., Kuis, W., Verbrugh, H.A., Verhoef, J., Zegers, B.J., Stoop, J.B. Inherited deficiency of the third component of complement associated with recurrent pyogenic infections, circulating immunocomplexes and vasculitis in a Dutch family. Pediatrics. 71:81-86, 1983.
50. Verbrugh, H.A., Van Dijk, W.C., Peters, R., Van Der Tol, M., Peterson, P.K., Verhoef, J. Staphylococcus aureus opsonization mediated via the classical and alternative complement pathways. Immunology. 36:391-400, 1979.
51. Baird-Parker, A.C. Gram positive cocci. pp. 479-480 In. Buchanan R.E., Gibbons, N.E. (ed). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition. Williams and Wilkins. Baltimore, USA. 1974.
52. Kloos W.E., Wolfshohl, J.F. Identification of Staphylococcus species with the API STAPH-IDENT Sys-

- tem. J.Clin.Microbiol. 16:509-516, 1982.
53. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H. Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surface. Infect.Immun. 37:318-326, 1982.
 54. Rosenberg, R., Gutnick, D., Rosenberg, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett. 9:29-33, 1980.
 55. Hogt, H.A., Dankert, J., Feijen, J. Encapsulation, slime production and surface hydrophobicity of coagulase-negative staphylococci. FEMS Microbiol.-Lett. 18:211-215, 1983.
 56. Hogt, A.H. Dankert, J., De Vries, J.A., Feijen, J. Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. J.Gen.Microbiol. 129:2959-2968, 1983.
 57. Verhoef, J., Peterson, P.K., Quie, P.G. Kinetics of staphylococcal opsonization attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leukocytes: a quantitative assay using (³H) thymidine labeled bacteria. J.Immunol. Methods. 14: 303-311, 1977.

58. Boyüm, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 97:77-81, 1968.
59. Verbrugh, H.A., Peters, R., Peterson, P.K, Verhoef, J. Phagocytosis and intracellular killing of staphylococci by polymorphonuclear and mononuclear leukocytes. *J.Clin.Pathol.* 31:539-544, 1978.
60. Verbrugh, H.A., Van Kijk, W.C., Peters, R., Van Der Tol, M.E., Verhoef, J. The role of Staphylococcus aureus cell wall peptidoglycan, teichoic acid and protein A in the processes of complement activation and opsonization. *Immunology.* 37:615-621, 1979.
61. Gillis, T.P., Thompson, J.J. Quantitative fluorescent immunoassay of antibodies to, and surface antigens of Actinomyces viscosus. *J.Clin.Microbiol.* 7:202-207, 1978.
62. White, E.H., Brundrett, R.B. Chemiluminescence of acyl hydrazides, pp 231-244. In Danier, M.R., Hercules, D.M., Lee J. (Ed.), *Chemiluminescence and bioluminescence*. Plenum publishing Corp., New York, 1973.

63. Steven, P., Winston, D.J., Van Dijke, K. In vitro evaluation of opsonic and cellular granulocyte function by luminol-dependent chemiluminescence: utility in patients with severe neutropenia and cellular deficiency states. *Infect.Immun.* 22:41-55, 1978.
64. Mills, E.L., Rholl, K.S., Quie, P.G. Luminol-amplified chemiluminescence: a sensitive method for detecting the carrier state in chronic granulomatous disease. *J.Clin.Microbiol.* 12:52-56, 1980.
65. Sheth, N.K., Rose, H.D., Franson, T.R., Buckmire, F.L.A., Sohnle, PG. In vitro quantitative adherence of bacteria to intravenous catheters. *J.Surg.Res.* 34:213-218, 1983.
66. Verhoef, J., Peterson, P.K., Kim, Y., Sabath, L.D., Quie, P.G. Opsonic requirements for staphylococcal phagocytosis. *Inmunology.* 33:191-197, 1977.
67. Peterson, P.K., Wilkinson, B.J., Kim, Y., Scheling, D., Quie, P.G. Influence of encapsulation on staphylococcal opsonization and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect.Immun.* 19:-943-949, 1978.

68. Fleer, A., Verhoef, J. New aspects of staphylococcal infections: emergence of coagulase-negative staphylococci as pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 50:729-744, 1984.
69. Christensen, G.D., Paris, J.T., Bisno, A.L., Simpson, W.A., Beachey, E.H. Characterization of clinically significant strains of coagulase negative staphylococci. *J.Clin.Microbiol.* 18:258-269, 1983.
70. Baddour, L.M., Christensen, G.D., Hester, M.G., Bisno, A.L. Production of experimental endocarditis by coagulase-negative staphylococci: variability in species virulence. *J.Infect.Dis.* 150:721-727, 1984.
71. Gray, E.D., Peters, G., Verstegen, M., Regelman, W.E. Effect of extracellular slime substance from Staphylococcus epidermidis on the human cellular immune response. *Lancet*. 1:365-367, 1984.
72. Christensen, C.D., Simpson, W.A., Beachey, E.H. Microbial adherence in infection pp. 6-23. In Mandell, G.L., Gordon, D., Bennett, E. (Ed). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 2nd Edition. Wiley Medical Publication, New York, 1985.

73. Ljungh, A., Hjerte, S., Wadström, T. High surface hydrophobicity of autoaggregating Staphylococcus aureus strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test. *Infect.Immun.* 47:522-526, 1985.
74. Horwitz, M.A. Phagocytosis of microorganisms. *Rev. Infect.Dis.* 4:104-120, 1982.
75. Van Oss, C.J. Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annu.Rev.Microbiol.* 32: 19-26, 1978.
76. Lindahl, M., Faris, A., Wadström, Hjerten, S. A new test based on "salting out" to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim.Biophys.Acta.* 77:471-476, 1981.
77. Jonsson, P., Wadström, T. Cell surface hydrophobicity of Staphylococcus aureus by the salt aggregation test (SAT). *Curr.Microbiol.* 10:203-210, 1984
78. Jonsson, P., Wadström, T. High surface hydrophobicity of Staphylococcus aureus as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Curr.Microbiol.* 8:347-353, 1983.

79. Peterson, P.K., Verhoef, J., Schmeling, D., Quie, P.G. Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J.Infect.Dis.* 136:502-509, 1977.
80. Absolom, D.R., Van Oss, C.J., Zingg, W., Neumann, A.W. Phagocytosis as a surface phenomenon: opsonization by a specific adsorption of IgG as a function of bacterial hydrophobicity. *J.Reticuloendothel.-Soc.* 31:59-70, 1982.
81. Miller, D.S., Beck, S. Polymorphonuclear leukocyte phagocytosis: quantitation by a rapid radioactive method. *J.Lab.Clin. Med.* 86:344-348, 1975.
82. Proctor, R.A., Predergast, E., Mosher, D.F. Fibronectin mediates attachment of Staphylococcus aureus to human neutrophils. *Blood.* 59:681-689, 1982.
83. Eriksen, H.D., Espersen, F., Clemmensen, I. Opsonic activity of fibronectin in phagocytosis of Staphylococcus aureus by polymorphonuclear leukocytes. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 3:108-112, 1984.
84. Lanser, M.E., Saba, T.M. Fibronectin as a cofactor necessary for optimal granulocyte phagocytosis of

Staphylococcus aureus. J.Reticuloendothel. Soc.
30:415-424, 1981.

85. Verbrugh, H.A., Peterson, P.K., Smith, D.E., Nguyen, B.T., Hoidal, J.R., Wilkinson, B.J., Verhoef, J., Furcht, L.T. Human fibronectin binding to staphylococcal surface protein and its relative inefficiency in promoting phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes, monocytes and alveolar macrophages. Infect.Immun. 33:811-819, 1981.
86. Van De Water, L., Destree, A.T., Hynes, R.D. Fibronectin binds to some bacteria but does not promote their uptake by phagocytic cells. Science. 220:201-204, 1983.
87. Ludwicka, A., Switalski, L.M., Lundin, A., Pulverer, G., Wadström T. Measurement of bacterial attachment to a solid surface (synthetic polymers) by a bioluminescent assay. Zbl.Bakt.Hyg.I Abt.-Orig.A. 256:479-489, 1982.
88. Rotrosen, D., Gibson, T.R., Edwards, J.E. Adherence of Candida species to intravenous catheters. J.-Infect.Dis. 147:594, 1983.

89. Sugarman, B. In vitro adherence of bacteria to prosthetic vascular grafts. *Infection*. 10:13-16, 1982.
90. Franson, T.R., Sheth, N.K., Rose, H.D., Sohnle, P.G. Quantitative adherence in vitro of coagulase--negative staphylococci to intravascular catheters: inhibition with D-mannosamine. *J.Infect.Dis.* 149:-116, 1984.
91. Vaudaux, P, Suzuki, R., Waldvogel, F.A., Morgenthaler, J.J., Nydegger, V.E. Foreign body infection: role of fibronectin as a ligand for the adherence of Staphylococcus aureus. *J.Infect.dis.* 150:546-553, 1984.
92. Vaudaux, P.E., Waldvogel, F.A., Morgenthaler, J.J., Nydegger, V.E. Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of S.aureus adherence. *Infect.Immun.* 45:768-774, 1984.
93. Klebe, R.J., Bentley, K.L., Schoen, R.C. Adhesive substrates for fibronectin. *J.Cell.Physiol.* 109:-481-494, 1981.

94. Grinnell, F., Feld, M.K. Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity. *J.Biomed.Mater.Resp.* 15:363-367, 1981.
95. Grinnell, F., Feld, M.K. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J.Biol.Chem.* 257:4888--4893, 1982.
96. Bailey, M.J. Reduction of catheter associated sepsis in parenteral nutrition using low-dose intravenous heparin. *Br.Med.J.* 1:1671-1676, 1979.