

11234

24
EJ2

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO.**

FACULTAD DE MEDICINA

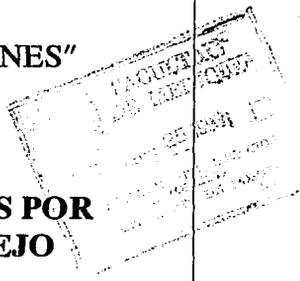
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST - GRADO.

**ASOCIACION PARA EVITAR LA CEGUERA
EN MEXICO.**

HOSPITAL "DR. LUIS SANCHEZ BULNES"

TITULO:

**ESTUDIO DE ULCERAS CORNEALES POR
PSEUDOMONA EN OJOS DE CONEJO**



TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO CIRUJANO OFTALMOLOGO

PRESENTA el Dr.:

VAN CHARLES LANSINGH ALBA

MEXICO, D.F.

ENERO DE 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN:

Se desarrolló un modelo animal de úlcera corneal producida por Pseudomona, con objeto de valorar la cantidad de ufc, capaz de producir una lesión útil para probar diferentes antibióticos y su respuesta terapéutica. Se inocularon 20 ojos en 20 conejos pigmentados, con 15,000 ufc (unidades formadoras de colonias) de una cepa de Pseudomona Aeruginosa, elastasa y proteasa alcalina positiva. Los ojos contralaterales, se inocularon con 150,000 ufc de la misma bacteria, permitiendo una evolución de 24 horas. El tratamiento fue aplicado en forma típica por 24 horas, cada 2 horas en ambos ojos asignados en forma ciega y aleatoria, graduando la queratitis pre y post-tratamiento.

Los antibióticos utilizados fueron : Gentamicina, Tobramicina, Cefacidima, Pefloxacima y un compuesto de polimixina-B, Neomicina y Bacitracina, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa.

INTRODUCCION:

Axenfeld en 1908, menciona por primera ocasión a la Pseudomona aeruginosa como un patógeno ocasional en distintas infecciones oculares, especialmente en algunos abscesos corneales anulares; mientras Duke Elder (1) menciona apenas 100 casos de úlcera corneal por dicha bacteria en la literatura mundial, la mayor parte asociadas al uso de soluciones contaminadas para lentes de contacto bien los mismos lentes de contacto contaminados. La evolución de tales casos ha sido vertiginosa y Liesegang afirma que las úlceras bacterianas más comunes en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica, son las causadas por Pseudomonas aeruginosa, así como el patógeno corneal más virulento (2,3). Las cepas más virulentas se caracterizan por una rápida destrucción del epitelio y del estroma corneal(4), que se acompaña de hipopión en cámara anterior y secreción conjuntival amarillo verdosa en cantidad abundante. La respuesta al tratamiento es de pobre a moderada, pero frecuentemente evolucionan a la perforación dada la gran y rápida destrucción proteica atribuida a la producción de proteasas de estas bacterias (5,6).

Todo este proceso no es posible si no existe un trauma corneal previo (5), que favorezca la adherencia bacteriana a la superficie corneal. Esta aseveración ha determinado que en modelos experimentales previos (7), se buscara la lesión

Roberto
Rivera
ASOCIACION PARA
EVITAR LA CEGUERA
EN MEXICO

epitelial y la aplicación superficial del inóculo bacteriano en forma de gotas. Estos modelos no ofrecieron resultados del todo reproducibles, por lo que en 1976 Kupferman y Leibowitz desarrollan un modelo por inoculación directa del estroma, el cual probó ser mucho más reproducible (8). En este trabajo se utiliza una modificación a este modelo, con objeto de buscar un modelo graduable y fácilmente reproducible, que al mismo tiempo permita estudiar la eficacia del tratamiento a antibióticos variados.

MATERIAL Y METODOS:

Se utiliza una *Pseudomona aeruginosa*, cepa Habs, serotipo I; productora de elastasa y proteasa alcalina; la cual se incubó por un período de 24 horas en agar soya tripticasa, y diluida en un mismo medio hasta alcanzar una absorción de 660 nm inicialmente, con lo cual se logró una equivalencia a 1,500,000 ufc (unidades formadoras de colonias) por ml, y los cuales se inocularon después de dos horas, posteriores a este periodo de inoculación en la forma que se describirá posteriormente. Previamente se realizaron CMI (concentraciones mínimas inhibitorias) in vitro para los siguientes antibióticos: Amikacina 4mcg/ml, Gentamicina 2 mcg/ml, Tobramicina 1 mcg/ml, Netilmicina 4 mcg/ml, Piperacilina 8 mcg/ml, Carbenicilina 32 mcg/ml, Ceftriaxona 8 mcg/ml, Ceftacidima 2 mcg/ml, Cefoperasona 2 mcg/ml, Cefotaxima 8 mcg/ml, Ciprofloxacina 0.59 u/ml, Norfloxacin 4.35 ug/ml, Pefloxacina 4.48 ug/ml.

Para obtener una concentración final de 15,000 ufc, se procedió a hacer dilución a partir de la solución con 1,500,000 ufc, con solución salina isotónica, se procedió a hacer el inóculo con una microjeringa con aguja calibre 30, en forma intraestromal, bajo visión directa utilizando un microscopio Topcon OMS 50. La liberación de el inóculo fué en varios trazos intraestromales, en ojos derechos de 20 conejos sin lesión epitelial y a los cuales previamente se les tomó muestra de la flora pre-existente, tiñéndose este frotis con Hematoxilina y Eosina. Los animales que se utilizaron fueron encontrados sanos en el segmento anterior y utilizados sin considerar su edad y sexo, el peso promedio de los animales osciló entre 2.1 y 3.3 kgs. En todos los casos fueron tranquilizados utilizando Ketamina 60 mgs por vía intramuscular e Hidrocloruro de Xilacina en dosis de 270 mgs como anestésico, utilizando la misma vía intramuscular. Se utilizó además instilación conjuntival de Tetracaína al 0.5 mg/ml, previa colocación de un blefarostato.

A las 96 horas post-inoculación, los conejos fueron divididos en grupos con

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

4 conejos cada uno (5 grupos en total), aplicándose 2 gotas cada dos horas por espacio de 24 horas de los siguientes antibióticos:

- a).- Polimixina B 500,000 U + Neomicina 175 mgs y Bacitracina 2.5 mg/100 ml.
- b).- Tobramicina 0.30 mg/100 ml.
- c).- Gentamicina 0.30 mg/100 ml
- d).- Pefloxacima 10 mg/ml
- e).- Ceftacidima 50 mg/ml

Estos dos últimos medicamentos fueron preparados a partir de soluciones para uso parenteral, diluyéndose en 10 cc de Alcohol polivinílico. Todos los grupos fueron administrados en forma ciega y aleatoria, tratando solamente de agrupar las lesiones en grupos semejantes, de acuerdo a su severidad.

Utilizando la misma metodología se aplicó en ojos izquierdos un inóculo con 150000 ufc, y por su agresividad se requirió iniciar el tratamiento a las 24 horas de inoculado.

Todos los animales fueron sacrificados a las 24 horas de haber sido iniciado el tratamiento. El método para sacrificar los conejos fué la inyección intraperitoneal de 0.063 g/ml de pentobarbital sódico.

El grado de queratitis fué considerando los siguientes parámetros:

- 0= ningún cambio
- 1= nubécula
- 2= úlcera absceso menor de la mitad de la cornea
- 3= absceso úlcera que cubre toda la cornea, sin hipopión y
- 4= daño corneal total, con panofalmitis usualmente.

Después del tratamiento se graduó el cambio en la queratitis de la siguiente forma:

- a).- sin cambio
- b).- mejora
- c).- importante mejora
- d).- sin restos de infección.

Cabe señalar que sólo los dos primeros autores calificaron el grado de mejoría, no difiriendo en más de un número en ningún caso.

El análisis de significación estadística se realizó por medio de un modelo unidireccional de varianza, ya que se utilizó a cada ojo en forma independientemente, como modelo de un solo ojo, así como por existir más de un tratamiento; tomando a p menor de 0.05 como estadísticamente significativo.(10-11)

RESULTADOS:

El grupo **a** fué asignado a la combinación de Neomicina, Polimixina y Bacitracina; el **d** a Pefloxacima, el **b** a Tobramicina, el **c** a Gentamicina y el **e** a Ceftacidima.

Los conejos 1 a 4 correspondieron al grupo **a**, los conejos 5 a 8 al grupo **d**, los conejos 9 a 12 al grupo **b**, los conejos 13 al 6 al grupo **c** y por último los conejos 17 al 20 al grupo **e**.

En el inóculo de 15,000 ufc, a las 96 horas del inóculo, se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA # 1

# DE OJOS	CAMBIO	GRADO
7	ninguno	0
7	lesiones pequeñas	1
2	microabscesos	3
2	casos con abscesos	2
3	abscesos francos en el sitio de punción.	3

Dentro de los 7 conejos calificados con grado 0, sólo tres no tuvieron absolutamente ningún cambio, ya que posteriormente los conejos 3 y 20 desarrollaron ambos conjuntivitis, con abundante secreción verdosa, el conejo 15 posteriormente desarrolló una queratitis grado 1 y finalmente el conejo número 18 un absceso puntiforme.

En los 7 conejos con queratitis grado 1, la distribución de los casos es según se enumera a continuación:

El conejo 1 desarrolló un microabsceso, el conejo 2 desarrolló microabsceso, aunque desapareció la queratitis, el conejo 5 permaneció estable, mientras que el conejo 6 desarrolló un absceso, los conejos número 13 y 17 progresaron a un grado 2, sólo que en el caso 17 en que además había bandas de fibrina en la cámara anterior, por último el conejo 19 hubo progreso de la lesión hasta desarrollar vascularización corneal superior. Recordemos que los conejos 1 y 2, fueron tratados con Neomicina-Polimixina y Bacitracina, el 5 y 6 con Pefloxacima, el conejo número 13 fué tratado con Gentamicina, los conejos 17 y 19 fueron tratados con Ceftacidima. En el grupo de conejos con una queratitis grado 2, no se observaron cambios ostensibles en los conejos número 10,12 y 14 (éste último mostraba además un absceso corneal central), siendo los dos primeros tratados con Tobramicina y el último con Gentamicina. Finalmente el conejo 4, el 11 y el 16, continuaron con un absceso central a pesar del tratamiento con Polimixina-Neomicina y Bacitracina, Tobramicina y Gentamicina respectivamente.

Respecto al modelo de 150000 ufc, a las 24 horas del inóculo corneal, sólo los conejos 1 y 6 no mostraron cambios de queratitis, ni siquiera en otras 24 horas después. Sólo el conejo número 3 desarrolló una queratitis grado 1, el cual progresó a grado 4 con hipopión, a pesar del tratamiento con Polimixina-Neomicina y Bacitracina.

De la misma forma, sólo los conejos 9 y 13 una queratitis grado 2, el primero progresando a un grado 3, y el segundo progresando a un absceso y presencia de hipopión, aún con el tratamiento con Tobramicina y Gentamicina respectivamente.

Cinco conejos desarrollaron una queratitis grado 3; el 5,7,12,17 y 18, todos ellos progresando a un grado cuatro e incluso dos de ellos evolucionaron a perforación (conejos 5 y 17); independientemente que el tratamiento de los dos primeros fué Pefloxacima, el número 12 Tobramicina y los dos últimos Ceftacidima. Los 9 conejos restantes desarrollaron queratitis grado 4, los cuales progresaron en el desarrollo de hipopión, mientras que los conejos 8,15 y 17 evolucionaron a perforación central a pesar de los diferentes tratamientos instaurados.

Por último, vale la pena mencionar el 50% de los conejos desarrollaron conjuntivitis a las 24 horas, con abundante secreción amarillo verdosa, sólo los conejos 9,15,18 y 19 presentaron mejora en éste parámetro, el primero con Tobramicina, el segundo con Gentamicina y los dos últimos con Ceftacidima.

No fué posible realizar cultivo de la flora pre-inoculación, pero en la mayoría de los casos (50%) se encontraron bacilos Gram negativos; en 6 fué negativo a bacterias y 4 presentaron cocos Gram positivos (el conejo 20 presentó flora mixta Gram + y -); mientras que en el conejo 4 v coexistieron Moraxella con bacilos Gram negativos.

DISCUSION:

La administración tópica de antibióticos, es la principal vía de administración, así como la más práctica para el tratamiento de infecciones bacterianas de la córnea (8); sin embargo, Baum y colaboradores (15) en un estudio publicado en 1983, encontraron que para alcanzar las concentraciones adecuadas de Gentamicina por vía tópica, se debe administrar cada 15-30 minutos, comparada con la vía subconjuntival subtenoniana que solo requiere aplicación una vez al día, realizada por personal calificado y cooperación del paciente; pero también se demostró que no es necesario alcanzar los picos de concentración alcanzados con ésta vía con respecto a la actividad bactericida. Resultados similares fueron encontrados por Golden (16) y Oakley (17), quienes demostraron asimismo que el sitio de aplicación subconjuntival no establecía diferencia importante; éste último, también demostró que la aplicación intramuscular de la Gentamicina no era adecuada para alcanzar concentraciones satisfactorias en humor acuoso y en vítreo.

Con respecto a la Tobramicina, Davis(18) y Punnell (19) comprobaron la mayor eficacia de la vía tópica que la subconjuntival o intramuscular, haciendo énfasis en el inicio temprano de éste antibiótico. Ningún estudio ha demostrado la eficacia de la admisión tópica asociada a vía subconjuntival o intramuscular.

Con lo que respecta al modelo experimental, numerosos autores (7,9,20,21,22) han utilizado la técnica de Cignetti, que consiste en provocar una abrasión corneal con una cucharilla de chalazión en epitelio y estroma, con el fin de depositar una gota de una suspensión de Pseudomona aeruginosa, sin embargo; adolecían de numerosos defectos como el no reportar el número de colonias utilizadas (ufc) y por lo tanto, con una gran variabilidad intra y trans experimental,

lo que en general, no permite la extrapolación y comparación adecuada con otros trabajos. Es hasta 1976 que Kupferman y Leibovitz (8) idearon un método en que es posible cuantificar la cantidad uniforme de ufc que se inoculan y que hacen la comparación con otros autores posible. Nosotros realizamos algunas variaciones a éste respecto, básicamente conservando el epitelio íntegro y aplicando el inóculo en varios trayectos intraestromales, así como diferentes cantidades administrados desde 1000 hasta 250,000 ufc .

En nuestra experiencia y con el afán de uniformar el modelo, sólo se inoculó 10 microlitros de la suspensión de Pseudomona, independientemente de su concentración. Parece ser que el modelo de 15,000 ufc es mucho más graduable, siendo posible observar cada una de las etapas en forma independientemente y pausada, a fin de valorar en forma más objetiva la posibilidad de antibióticos en forma profiláctica.

Con lo que respecta al modelo de 150,000 ufc, pensamos que para los fines de nuestra investigación y los objetivos de la misma, no es muy útil, al menos con nuestra cepa en particular, ya que mostró ser muy agresiva y de evolución muy rápida, que no permite en todo caso evaluar la antibióticoterapia. El desarrollar un modelo con éstos fines entonces deberá ser con una cantidad intermedia.

En ésta experiencia inicial no se observó ninguna ventaja de algún antibiótico, lo cual ya ha sido reportado en otros casos (23,26). A pesar de que se intentó dividir las lesiones de acuerdo a similitud ante los diferentes antibióticos, parecerá que la Pefloxacima, fué el único antibiótico con mejor efecto sobre la queratitis, aunque no tuvo un resultado estadísticamente significativo. Al revisar artículos recientes y publicaciones de trabajos presentados en ARVO (24,25), se demostraron mayores efectividades de las fluoroquinolonas a bajas dosis comparadas con la Gentamicina, especialmente la ciprofloxacima y la Oofloxacima.

El uso de la Pefloxacima en el presente estudio se debió a estar disponible en éste país. La Gentamicina y su efecto benéfico ha quedado bien demostrado en estudios en que se ha comparado contra aminoglucósidos como Eritromicina, bien antibióticos como Carbenicilina y Ticarcilina (1,7,14,20,22,26).

Smolin y cols. (21) mostraron una ligera ventaja de la Tobramicina sobre la Gentamicina, sin demostrar diferencia estadísticamente significativa,

recomendando evitar la asociación con esteroides, ya que aún resuelta la queratitis se han demostrado recidivas en algunos casos.(1,14).

De reciente asociación son los beta-lactámicos tipo cefalosporinas, los cuales entre más reciente generación tienen más efectos sobre las enterobacterias, teniendo la ventaja de penetrar y lograr mayor concentración en el humor acuoso (28).

Es sorprendente que dada la relativa frecuencia de queratitis por *Pseudomona*, no se hayan realizado estudios demostrativos y válidos sobre antibióticos que resulten en definición de criterios para su uso. Creemos que en el momento actual el antibiótico de elección en un caso de queratitis por *Pseudomona* siguen siendo los aminoglucósidos reforzados en forma tópica.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Burns,R., Pseudomonas aeruginosa keratitis: Mixed infections of the eye. *Am. J. Ophthalmol* 67:257-262, 1969.
- 2.- Liesegang,T.J.,Forster,R.K.: Spectrum of antimicrobial keratitis in south Florida. *Am. J. Ophthalmol.* 90:3,8-47,1980.
- 3.- Stern,G.A.,Lubniewski,A,Allen,C.: The interaction between Pseudomona aeruginosa and the corneal epithelium. An electron microscopy study. *Arch. Ophthalmol.* 103:1221-1225,1985.
- 4.- Kessler,E.,Safrin,M., Growth of Pseudomonas aeruginosa and secretion of protease in the presence of the protease inhibitors. *Metab Pediatr and system Ophthalmol* 6:331-336,1988.
- 5.- Ramphal,R.,McNeice,M.T.,Poclack,F.A., Adherence of Pseudomonas aeruginosa to the mouse cornea: A step in the pathogenesis of Corneal Infections. *Ann Ophthalmol.* 13:421-425,1981.
- 6.- Tanaka,Y., Effects of Habekacin, a novel Aminoglycoside antibiotic, on experimental Corneal infection due to Pseudomonas aeruginosa, *The J. of Antibiot.* 34:892-897,1981.
- 7.- Furgiule,F.P., Kyesel,L., Martin R. Pseudomonas infection in the rabbit cornea, treated with Gentamycin. A preliminary report. *Am. J. Ophthalmol.* 60:818-822,1966.
- 8.- Kupferman, A,Leibowitz,H. Quantitation of bacterial infection and antibiotic effect in the Cornea. *Arch. Ophthalmol.* 94:1981-1984,1976.
- 9.- Smolin,G.,Okumoto,M,Wilson,F.: The effect of Tobramycin on Gentamycin resistant strains in Pseudomonas keratitis. *Am.J.Ophthalmol* 77:583-586,1974.
- 10.- Ray,W.,O'Day,D.M.,Head,S.,Robinson,R.: Statistical analysis for experimental models of ocular disease: Continous response measures.*Curr eye res.* 4:5857-5859,1985.
- 11.- Ederer,F.: Shall we count numbers of eyes or numbers of subjects? *Arch. Ophthalmol.* 89:12,1973.
- 12.- Munsch, D.C., Sugar,A.,Meyer,R.F.: Demographic and predisposing factors in corneal ulceration. *Arch. Ophthalmol* 101:154-158,1989.
- 13.- Hjortdal,J.,Ehlers,N.: Exogenous ocular and systemic factors associated with keratic ulceration. *Acta Ophthalmologica.* 67:169-173,1989.
- 14.- Harbin,T.: Recurrence of a corneal Pseudomonas infection. *Am. J. Ophthalmol* 58:670-674,1964.
- 15.- Baum,J.Barza,M.,:Topical vs subconjunctival treatment of bacterial corneal

ulcer. *Ophthalmology* 90:1628-1632,1963.

16.- Golden,B., Coppel,S. Ocular Tissue absorption of Gentamycin. *Arch Ophthalmol* 84:792-796,1970.

17.- Oakley,D.,Weeks,R,Ewllis,P.: Corneal distribution of subconjunctival antibiotics. *Am.J. Ophthalmol.* 81:307-312,1976.

18.- Davis,S.,Sarff,L.,Hyndiuk,R.: Comparison of therapeutic routes in experimental Pseudomonas keratitis. *Am.J.Ophthalmol* 87:710-716.1979.

19.- Purnell,W.A., McPherson,S.: An evaluation of Tobramycin in experimental corneal ulcers. *Am.J.Ophthalmol* 78:318-320,1974.

20.- Stern.G.: The effect of combined Gentamycin-corticosteroid,treatment on Gentamycin resistant Pseudomonas keratitis. *Ann.Ophthalmol.* 101-114,1980.

21.- Smolin,S.,Okumoto,M.,Wilson,F.: The effect of Tobramycin on Pseudomonas keratitis. *Am.J.Ophthalmol* 76:555-560,1973.

22.- Furgiule,F.: Ocular penetration of Gentamycin. *Am.J.Ophthalmol.* 69:300-306,1970.

23.- Gordon, D.: Gentamycin sulfate in external eye infections. *Am.J.Ophthalmol.* 69:300-306,1970.

24.- Sugar,A.,Cohen,M.,Bien,P.,Griffin,P.: Experimental Pseudomonas corneal ulcers treated with Enoxacin, a quinolone antibiotic. *Arch.Ophthalmol.* 104:1230-1232,1986.

25.- Cutarell, P.,Jacobs,M.,Putnam,S.: Comparative antibacterial activity of fluoroquinolones against common corneal pathogens. *ARVO* 222654,1990.

26.- Bohigian,G.,Okumoto,M.,Valenton.M.: Experimental Pseudomona keratitis. *Arch Ophthalmol.* 86:432-437,1971.

27.- Davis,S.Sarff,L.,Hyndiuk, R: Experimental Pseudomonas Keratitis in Guineapigs: Therapy of moderately severe infections. *Br.J.Ophthalmol* 63:436-439,1979.

28.- Axelrod,J.Kochman,R.: Cefazidime concentrations in human Aqueous humor. *Arch.Ophthalmol* 102:923-925,1984.

29.- Barza,M.: New antimicrobial agents for infections of the anterior ocular segments. *The cornea: Transactions of the World Congress on the Cornea III*, 467-474,1988.