



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

TESIS

“CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA MICROBIOTA
DEL COLESTEATOMA ADQUIRIDO PEDIATRICO MEDIANTE
SECUENCIACION DE GEN S16”.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

OTORRINOLARINGOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

DRA. LUZ ELVIRA HERNÁNDEZ ALCÁNTARA.

TUTOR:

DR. CARLOS DE LA TORRE GONZÁLEZ.



CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Ciudad de México, Mayo 2019

HOJA DE FIRMAS

TUTORES

DR. SARBELIO MORENO ESPINOSA
DIRECTOR DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DR. CARLOS DE LA TORRE GONZÁLEZ
JEFE DE SERVICIO DEL DEPARTAMENTO DE
OTORRINOLARINGOLOGÍA PEDIÁTRICA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DRA. NORMA VELAZQUEZ GUADARRAMA
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS
DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN INFECTOLOGÍA
ÁREA DE BACTERIOLOGÍA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ



AGRADECIMIENTOS

A mis padres que siempre han creído en mí y me han apoyado incondicionalmente en este camino, por el amor inmenso que me tienen y me demuestran.

Mi hermana que es mi pequeña mejor amiga, por darme ánimos y escucharme. Estoy muy orgullosa de ti.

A mi compañero de vida, colega y cómplice Ángel, por estar para mí. Apoyarme en cada decisión, caminar a mi lado.

Al Dr. Carlos de la Torre, gracias por sus enseñanzas y su ímpetu por la investigación, las ganas de compartirlo, es un gran maestro y logra motivarnos a mejorar cada día.

Al servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil Federico Gómez tanto mis maestros (Dra. Álvarez, Dr. Neri) gracias por su paciencia y dedicación, así como la oportunidad que me brindaron para seguir con mi formación. A mis compañeros de la sub especialidad (Dra. Perla Villamor, Dra. Cristina Cortés, Dr. Alejandro Azamar, Dra. Esmeralda Godoy, Dra. Silvia Zavala) por su solidaridad y soporte durante estos años de formación.

INDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCION.....	7
3. ANTECEDENTES.....	9
4. MARCO TEORICO.....	11
5. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.....	15
6. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	16
7. JUSTIFICACIÓN.....	17
8. HIPÓTESIS.....	18
9. OBJETIVOS.....	19
10. METODOLOGIA.....	20
11. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
12. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.....	30
13. RESULTADOS DEL ESTUDIO.....	31
14. DISCUSION.....	33
15. CONCLUSIÓN.....	37

16. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	38
17. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
18. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO.....	44
19. ANEXOS.....	45

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

Las bacterias aeróbicas y facultativas, principalmente *Staphylococcus aureus* y bacilos Gram-negativos (incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*), han sido durante muchos años los principales patógenos causantes de otitis media crónica en niños.

Se ha evidenciado que la otitis media colestomatosa en niños tiende a ser más agresiva, frecuentemente asociado a una bolsa de retracción de la membrana timpánica secundario a una disfunción crónica de la Trompa de Eustaquio.²⁷ Así mismo, se ha reportado que el colestoma pediátrico tiene tendencia al crecimiento más acelerado con una ocupación de todo el oído medio, dificultando el tratamiento quirúrgico.

Por otra parte, la disección químicamente asistida con MESNA ha mostrado ser efectiva tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos con humanos, facilitando la disgregación de la estructura del colestoma y de las biopelículas asociadas, disminuyendo las tasas de enfermedad residual. Lo anterior ha modificado el panorama en términos del pronóstico, en especial en población pediátrica.

Objetivo: Evaluar los cambios que ocurren en la microbiota del colestoma de pacientes pediátricos, posterior a la aplicación de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) mediante técnicas de biología molecular como es la secuenciación del ADN ribosomal bacteriano S16.

Materiales y métodos: Pacientes pediátricos con diagnóstico de otitis media crónica colestomatosa operados de mastoidectomía primaria o de revisión en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez entre diciembre de 2017 y diciembre de 2018.

El día previo al evento quirúrgico se solicitó la preparación de la dilución del MESNA a una concentración del 4%, el cual fue proporcionado por SAFE Productos Hospitalarios S.A. de C.V. Las muestras fueron procesadas y enviadas a Zymo Research, en California para su análisis y secuenciación.

Resultados: Se obtuvieron 26 muestras durante la cirugía de mastoides, tanto primaria como de revisión, por otitis media crónica con colesteatoma. Se incluyeron 13 niños , 9 hombres y 4 mujeres , de 1 año a 17 años (edad media, 10.3 años).

Conclusiones: En otras investigaciones se ha concluido que el MESNA no causa lisis bacteriana ni muestra propiedades bactericidas. Sin embargo, en nuestro estudio se apreció la desaparición de bacterias en algunas muestras previamente reportadas. Este hallazgo quizá pueda deberse a la precisión del método de secuenciación que haya eliminado la presencia de gérmenes en las muestras y no por el efecto del medicamento.

2. INTRODUCCIÓN

La otitis media colestetatomatosa es una entidad con alta morbilidad, recurrencia y secuelas para quienes la padecen debido a su comportamiento destructivo. El colesteatoma es una lesión quística de inclusión epidérmica que contiene queratina proveniente del epitelio queratinizado descamativo que lo recubre. Su localización más frecuente es el oído medio y otras áreas del hueso temporal.

Su incidencia en niños se ha reportado de 3 casos en 100.000 pacientes al año. Tiene una predominancia masculina, siendo 1.4 veces más frecuente en hombres que en mujeres (hasta 4 veces más frecuente en algunos estudios).^{1,2}

En cuanto al cuadro clínico, el colesteatoma puede presentarse de forma asintomática ó como una otitis media crónica supurativa, con otalgia y otorrea fétida característica. La hipoacusia progresiva también es frecuente como resultado de la erosión ósea con compromiso de la cadena osicular. Otros síntomas pueden derivarse de compromiso del oído interno, nervio facial o espacio intracraneal, tales como vértigo o hipoacusia neurosensorial . La edad de inicio de síntomas suele ser entre los 6 y 10 años.^{2,3}

El manejo quirúrgico, es el patrón de oro para el manejo del colesteatoma tanto en niños como adultos. El objetivo principal de la cirugía es la resección de la lesión con el mejor desenlace posible, erradicando la enfermedad, preservando en la medida de lo posible estructuras anatómicas, previniendo enfermedad residual o recurrente.⁴ Sin embargo, en pacientes pediátricos la tasa de recidiva posquirúrgica es tan alta como el 70%.⁵ Lo anterior está relacionado con el comportamiento biológico del colesteatoma, que en los niños difiere respecto a población adulta. En pacientes pediátricos suele tener un patrón de crecimiento agresivo y mayores tasas de recurrencia que en adultos.

En años recientes las investigaciones han aportado información relevante acerca del papel de las infecciones en la patogénesis y progresión del colesteatoma, destacando la identificación de biopelículas bacterianas en la otitis media y en el colesteatoma.^{6,7}

La importancia de conocer la composición microbiológica y el comportamiento biológico de las biopelículas bacterianas radica en su potencial resistencia y tolerancia al manejo antimicrobiano lo cual representa un reto en el tratamiento del colesteatoma en población pediátrica.⁸

La dificultad para erradicar las infecciones asociadas a biopelículas con antibioticoterapia sistémica ha llevado al interés en utilizar terapias alternativas que pudieran afectar la estructura y composición bacteriana de las biopelículas. En estudios previos, se ha demostrado que el 2-mercaptoetanol sulfonato de sodio (MESNA) es capaz de desintegrar y separar la estructura de las biopelículas en colesteatomas pediátricos.^{9,10} Sin embargo, se desconoce si el MESNA podría afectar las características de la microbiota del colesteatoma pediátrico.

La identificación de organismos pertenecientes a comunidades microbianas por métodos bacteriológicos convencionales provee un panorama parcial e incompleto de la biodiversidad microbiana, debido a que más de 80% de los microorganismos son no cultivables. El desarrollo de métodos moleculares basados en el gen codificante para la subunidad 16S del rRNA, tales como tecnologías para secuenciación de nueva generación, han facilitado la caracterización, identificación y clasificación taxonómica de organismos de una comunidad residente en un órgano en particular.¹¹

3. ANTECEDENTES

Desde el nacimiento, cada milímetro del cuerpo humano que está expuesto al mundo exterior está colonizado por miles de bacterias de diferentes especies y el oído medio no es la excepción. Se ha demostrado que el phylum de Proteobacteria predomina en la mucosa normal del oído medio de niños y adultos, seguido de actinobacteria, firmicutes y bacteroides ⁹. Sin embargo, esta microbiota normal en casos de otitis media crónica se ve afectada por cambios de inflamación crónica que favorecen el crecimiento y establecimiento de bacterias patógenas. Los mediadores expresados durante la inflamación como IL-1, PAF y TNF-alfa inducen hipersecreción de mucina, hiperproliferación de células epiteliales y queratinocitos y resorción ósea por activación de colagenasas y osteoclastos. ¹² Adicionalmente, el uso frecuente e inapropiado de antibióticos tópicos y soluciones antisépticas crea un entorno adecuado para la resistencia a los microorganismos. ¹³

Las biopelículas juegan un papel en la patogénesis de la otitis media crónica^{14,15} El colesteatoma frecuentemente se infecta en forma crónica y la formación de biopelículas bacterianas parece ser la responsable de la resistencia a los antibióticos tópicos y sistémicos. ⁸ Se ha demostrado histológicamente que la mayor carga bacteriana y formación de biopelículas ocasionan progresión y agresividad en la otitis media crónica, en especial, por su asociación a reclutamiento de osteoclastos y erosión ósea. ^{16, 8}

Las bacterias aeróbicas y facultativas, principalmente *Staphylococcus aureus* y bacilos Gram-negativos (incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*), han sido durante muchos años los principales patógenos causantes de otitis media crónica en niños ^{17,18} Un reporte que incluyó 20 estudios con 2254 pacientes pediátricos, durante los años 1978 y 2003, mostró una tasa de recuperación bacteriana de solo el 35%. ¹⁹ Quizá esto se deba a que no todas las bacterias son cultivables mediante métodos tradicionales. Algunas técnicas de biología molecular como la secuenciación del gen 16sRNA permitirían la identificación más amplia de estos patógenos asociados a la cronicidad y severidad del colesteatoma pediátrico.

Un estudio previo que comparó la microbiota de adultos y niños sanos versus con otitis media crónica mediante secuenciación de gen 16S rRNA encontró una menor prevalencia de proteobacteria con una mayor prevalencia de Firmicutes en pacientes con otitis media crónica.²⁰

Una de las características del colesteatoma en el niño que lo diferencia del adulto es su comportamiento clínico, el cual suele ser más agresivo e invasivo y con mayores tasas de recidiva. Algunos autores han propuesto que la composición histopatológica es uno de los factores decisivos que pudieran explicar este comportamiento.⁶ Como se mencionó previamente, existen publicaciones recientes que sugieren que las biopelículas bacterianas tienen un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana, cronicidad, recurrencia y agresividad de la enfermedad.⁷

Yilmaz y colaboradores en el 2004 publicaron el primer estudio usando 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) para el manejo de otitis media adhesiva con bolsillos de retracción observando lisis de las adherencias entre la mucosa del oído medio y la membrana timpánica con lo que se facilitaba su disección.²¹ Posteriormente, Kalcioğlu y Vicenti publicaron la efectividad del MESNA en el colesteatoma residual observando tasas significativamente menores de recidiva postratamiento, demostrando que el medicamento fragmentaba las capas de queratina.^{22, 23}

En el 2016, el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México realizó un estudio prospectivo sobre la utilidad de la aplicación del MESNA intraoperatorio en pacientes pediátricos con otitis media crónica colesteatomatosa, demostrando cambios en la estructura del colesteatoma (separación de láminas de queratina y desorganización de su estructura).²⁴ Recientemente, De La Torre y colaboradores demostraron que el MESNA es capaz de desintegrar y separar la estructura de las biopelículas bacterianas en colesteatomas pediátricos.¹⁰

En la actualidad se dispone de un solo estudio de las bacterias asociadas a colesteatoma mediante técnicas de biología molecular como el gen 16 sDNA. Sin embargo, en esta investigación, se incluyeron pacientes sin colesteatoma y abarcó tanto niños como adultos.⁹ Hasta el momento, no existe información sobre el impacto del MESNA en la microbiota del colesteatoma, tanto en adultos como en población pediátrica.

4. MARCO TEÓRICO

El colesteatoma es una condición patológica que afecta al oído medio y hueso temporal, caracterizado por la migración de epitelio escamoso hacia el oído medio y mastoides.²⁵

A medida que la migración se incrementa, el acúmulo de queratina forma una masa de crecimiento progresivo localmente destructiva. La lisis ósea y sus características recurrentes hacen del colesteatoma una patología de difícil manejo.

No es una lesión neoplásica, pero si tiene un comportamiento altamente destructivo.²⁶

Aunque la fisiopatología del colesteatoma aún no se ha dilucidado en su totalidad, se presume que se trata de una enfermedad multifactorial. Existen cuatro teorías básicas de la patogénesis del colesteatoma adquirido: (1) invaginación de la membrana timpánica, (2) hiperplasia de células basales, (3) migración del epitelio a través de una perforación y (4) metaplasia escamosa del epitelio del oído medio. La patogénesis más ampliamente reconocida del colesteatoma adquirido es la teoría de que la presión negativa causa una bolsa de retracción cada vez más profunda que, cuando se obstruye, la queratina descamada no puede eliminarse del receso y se produce un colesteatoma.^{7,25} Se cree que el origen de este bolsillo de retracción es la disfunción de la trompa de Eustaquio u otitis media con derrame con la resultante presión negativa en el oído medio. Por lo general, la *pars flaccida*, (estructura menos fibrosa y menos resistente al desplazamiento), es la fuente del colesteatoma.⁷

Su incidencia niños se ha reportado de 3 casos en 100.000 pacientes al año. Tiene una predominancia masculina, siendo 1.4 veces más frecuente en hombres que en mujeres (hasta 4 veces más frecuente en algunos estudios).^{1,26}

Se ha evidenciado que la otitis media colesteatomatosa en niños tiende a ser más agresiva, frecuentemente asociado a una bolsa de retracción de la membrana timpánica secundario a una disfunción crónica de la Trompa de Eustaquio.²⁷ Así mismo, se ha reportado que el colesteatoma pediátrico tiene tendencia al crecimiento más acelerado con una ocupación de todo el oído medio, dificultando el tratamiento quirúrgico.

La tasa de recurrencia de colesteatoma es 2 a 3 veces mayor en población pediátrica que en adultos. ²⁵ Vartiainen reporta una incidencia del 25,6% de colesteatoma recurrente en niños comparada con un 10.5% en adultos. Estos resultados han llevado a múltiples debates sobre los diversos procedimientos quirúrgicos aplicables a la población pediátrica. ²⁹

Chole y colaboradores en el 2002 realizaron un estudio experimental con muestras de colesteatoma de oído medio humano, así como de colesteatoma en modelo animal mediante microscopia de luz y electrónica, encontrando biopelículas bacterianas en la mayoría de las muestras. ¹⁶

Saunders y colaboradores en el 2011 identificaron biopelículas bacterianas en 3 de 5 muestras de colesteatoma infectado (60%), y en sólo 1 de 7 casos con otitis media supurativa no colesteatomatosa. ²⁹

Las bacterias dentro de las biopelículas no son homogéneas, lo cual se debe a que todas ellas tienen diversos microambientes debido a variaciones en el pH, disponibilidad de nutrientes y potencial oxidativo, desencadenando diferentes señales de transcripción y características fenotípicas diversas.

Por otra parte, la transferencia de ácido desoxiribonucleico (ADN) entre las células, llamada “transferencia génica horizontal” provee ventajas a las células aumentando la probabilidad de mutaciones adaptativas tales como la resistencia antimicrobiana. ¹⁴

El 2-mercaptoetanosulfonato de sodio ($C_2H_5NaO_3S_2$) o MESNA es un compuesto sintético que pertenece a la clase de los compuestos tío. ²¹ Se usa como agente mucolítico ya que rompe los puentes de disulfuro de las cadenas polipeptídicas del moco. ³⁰

La utilidad de este compuesto en otología ha sido demostrada en múltiples estudios. Zini y colaboradores reportaron resultados preliminares de sus observaciones y su utilidad en la separación de la matriz del colesteatoma de los tejidos circundantes. ³⁰ Posteriormente en el año 2004 Yilmaz fue el primero en realizar un estudio experimental con MESNA observando que, en pacientes con otitis media adhesiva y bolsas de retracción, el fármaco ayudaba a la separación de la membrana timpánica al lisar las adherencias entre ésta y el oído medio. ²¹

La seguridad del MESNA en el contexto de ototoxicidad ha sido evaluada en diversos estudios. En 1999 Vicenti y colaboradores, utilizando modelo animal, concluyeron que no hubo cambios anatómicos ni auditivos asociados a la aplicación del MESNA. ³¹

Posteriormente, en el año 2014, los mismos autores realizaron un estudio en humanos para evaluar los efectos cocleares del MESNA mediante su aplicación en el oído medio de los pacientes durante la cirugía otológica. Los estudios audiológicos demostraron su perfil de seguridad.²³

Chen y colaboradores realizaron un estudio experimental para investigar los efectos inhibitorios del fármaco sobre la formación de biopelículas de *E. coli in vitro* revelando³²:

Inhibición de las fases iniciales de adhesión y formación de las biopelículas de *E. coli*.

Destrucción de las membranas maduras de las biopelículas.

Reducción de los niveles de proteínas extracelulares y de exopolisacáridos.

Inhibición de la expresión de genes asociados a proteínas de adhesión y expresión de exopolisacáridos.

En microbiología clínica, la identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial para el diagnóstico y aplicación posterior de un tratamiento adecuado. En la actualidad, la mayor parte de las bacterias de interés clínico pueden identificarse fácilmente mediante técnicas microbiológicas convencionales, que requieren el aislamiento previo del agente patógeno y se basan en características fenotípicas. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica requiere mucho tiempo, resulta difícil o, incluso, imposible. En estas circunstancias, la identificación molecular puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.³³

La identificación basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S se centra principalmente en cepas cuya identificación por métodos fenotípicos es difícil o requiere mucho tiempo, permitiendo la identificación de:

- Bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas.
- Bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida.
- Bacterias para las cuales la caracterización fenotípica sea sustancialmente deficiente.

- Bacterias con requerimientos nutricionales especiales.
- Bacterias de crecimiento lento, que retrasa considerablemente la identificación convencional.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con los estudios publicados y expuestos previamente, es claro que el comportamiento clínico del colesteatoma en niños es agresivo, invasivo y con altas tasas de recidiva. Las biopelículas bacterianas tienen un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana, cronicidad, recurrencia y agresividad de la enfermedad, por lo que identificar las bacterias asociadas a otitis media crónica colesteatomatosa permitirá obtener más conocimientos que favorezcan el desarrollo de tratamientos alternativos que pudieran modificar el comportamiento clínico de la enfermedad.

Por otra parte, la disección químicamente asistida con MESNA ha mostrado ser efectiva tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos con humanos, facilitando la disgregación de la estructura del colesteatoma y de las biopelículas asociadas, disminuyendo las tasas de enfermedad residual. Lo anterior ha modificado el panorama en términos del pronóstico, en especial en población pediátrica.

El estudiar el impacto del MESNA en la microbiota en otitis media crónica colesteatomatosa pediátrica permitiría aportar avances en su tratamiento, así como mejorar el pronóstico y curso clínico.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen cambios en la microbiota de la otitis media crónica colesteatomatosa posterior a la aplicación del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) en niños atendidos en el Hospital Infantil de México entre Diciembre de 2017 y Diciembre de 2018?

7. JUSTIFICACIÓN

Existen pocos estudios publicados en la literatura que evalúen la composición de la microbiota en otitis media crónica colesteatomatosa y solo uno de ellos mediante técnicas de biología molecular. Sin embargo, en dicho estudio, se incluyeron pacientes adultos y pediátricos, así como pacientes sin colesteatoma.²⁰

En la actualidad no existen aún estudios experimentales ni clínicos publicados que evalúen los efectos del MESNA sobre la microbiota del colesteatoma de oído medio en ninguna población.

Se sabe que el MESNA , además de sus efectos en la modificación de la estructura de la queratina en la matriz del colesteatoma con impacto en las tasas de recidivas , produce cambios cualitativos en el biofilm. Es por ello que el papel del MESNA en la microbiota del colesteatoma debe ser precisado a raíz de estos hallazgos cualitativos. Los cambios que resulten en la microbiota permitirán diseñar estrategias de manejo que ayudarán a evitar las recidivas, sobre todo en la población pediátrica.

8. HIPÓTESIS

Existen cambios en la microbiota del colesteatoma en niños posterior a la aplicación del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) que pueden ser documentados mediante técnicas de biología molecular como es la secuenciación del ADN ribosomal bacteriano S16.

9. OBJETIVOS

Objetivo General: Evaluar los cambios que ocurren en la microbiota del colesteatoma de pacientes pediátricos, posterior a la aplicación de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) mediante técnicas de biología molecular como es la secuenciación del ADN ribosomal bacteriano S16.

Objetivos específicos:

1. Realizar extracción de ADN bacteriano de colesteatomas pediátricos de pacientes operados de mastoidectomía en el Hospital Infantil de México.
2. Realizar amplificación de ADN bacteriano mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) con iniciadores específicos para la región S16.
3. Secuenciación de la amplificación del gen bacteriano S16.
4. Análisis de la secuencia para identificación de bacterias que conforman la microbiota del colesteatoma.
5. Comparar la microbiota del colesteatoma antes y después de la aplicación de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA)

10. METODOLOGÍA

Lugar de estudio: Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Tipo de Estudio: Cuasi-experimental.

Población de estudio: Pacientes pediátricos con diagnóstico de otitis media crónica colestomatosa operados de mastoidectomía primaria o de revisión en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez entre diciembre de 2017 y diciembre de 2018.

Criterios de selección:

Criterios de inclusión:

1. Pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de otitis media crónica colestomatosa candidatos a cirugía otomastoidea primaria o de revisión.
2. Contar con los siguientes estudios complementarios: Tomografía computarizada simple de hueso temporal y/o resonancia magnética con difusión pesada, así como audiometría menor a 12 meses.
3. Sin historial de reacciones adversas o alergia conocida al MESNA.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes y/o padres que no acepten participar en el estudio.
2. Expediente clínico incompleto al momento del estudio.

Criterios de eliminación:

1. Muestra de colestatoma insuficiente o con preservación inadecuada que no permita la extracción, amplificación y secuenciación de ADN bacteriano.

Muestreo: Se realizó un muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

Descripción del estudio:

El grupo de estudio se conformó con pacientes con diagnóstico clínico de otitis media

crónica colesteatomatosa y que cumpliendo los criterios de inclusión estuvieron programados para cirugía otomastoidea primaria o de revisión.

Se contará con consentimiento informado que explique ampliamente al paciente y al familiar responsable los objetivos del protocolo de investigación, la técnica quirúrgica, obtención de muestras, riesgos y posibles complicaciones.

El día previo al evento quirúrgico se solicitó la preparación de la dilución del MESNA a una concentración del 4%, el cual fue proporcionado por SAFE Productos Hospitalarios S.A. de C.V.

Técnica quirúrgica:

1. Paciente bajo anestesia general balanceada, antisepsia de la región quirúrgica con solución ChloroPrep.
2. Incisión retroauricular, disección por planos hasta tejido muscular, elevación de colgajo de Palva para exponer región mastoidea.
3. Mastoidectomía primaria en oídos sin antecedente de cirugía otomastoidea o bien, mastoidectomía de revisión en aquéllos con cirugía otológica previa.
4. Identificación y toma de muestra basal del tejido de colesteatoma colocándose en un frasco con solución fisiológica.
5. Colocación de dilución de MESNA al 4% sobre el tejido de colesteatoma durante 10 minutos para posteriormente realizar toma de muestra y colocación de la misma en un frasco con solución fisiológica..
6. Realización de mastoidectomía para retiro del resto del colesteatoma con técnica de muro alto o muro bajo de acuerdo a los hallazgos transoperatorios.
7. Las muestras de colesteatoma basal y con MESNA fueron llevadas de forma inmediata al laboratorio de enfermedades infecciosas del Hospital Infantil de México donde permanecieron en solución fisiológica refrigeradas a 4°C.

8. Obtención de DNA total

- La extracción de DNA genómico total se realizó a partir de las muestras refrigeradas en solución.
- El DNA genómico total se aisló con TRIzol® Reagent (ambion RNA by Life Technologies).

- Lisis y separación de fases con empleo de RNAsa para eliminar al RNA y quedarse con la fase acuosa que contiene el DNA.
- A cada tubo con la muestra de colesteatoma se adicionó 1mL de TRIzol y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se adicionaron perlas de vidrio para macerar el tejido durante la incubación de la muestra en TRIzol.
- Se empleó el vórtex en la muestra por 15 minutos.
- Se adicionó 400L de cloroformo por mL de TRIzol, y se mezcló con vórtex 15 segundos.

9. Precipitación de DNA

- Se centrifugó la muestra a 13000 rpm a 4°C; se almacenó la fase acuosa a -70°C, la cual contiene para continuar procesando la fase orgánica.
- Se adicionó 1mL de etanol por mL de TRIzol para la obtención de un pellet de DNA por medio de centrifugación a 3000 rpm a 4°C.
- El sobrenadante fenol-etanol que contiene proteínas se guardó a -70°C.

10. Lavados de DNA

- Se resuspendió el pellet de DNA con solución de citrato de sodio 0.1M en etanol al 10%.
- Se adicionó 1mL de citrato de sodio por mL de TRIzol, incubando por 30 minutos a temperatura ambiente y mezclando ligeramente el contenido dentro del tubo eppendorf.
- Al finalizar el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar a 3000 rpm para eliminar el sobrenadante y repetir el procedimiento una vez más.
- Finalizado el segundo lavado, se procedió a eliminar el sobrenadante para adicionar etanol al 75% para incubar 20 minutos a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente por inversión.
- Se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante con micropipeta.
-

11. Solubilización de DNA

- El DNA obtenido se secó parcialmente y se resuspendió en 0.5mL de NaOH 8mM por pipeteo para centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C y transferir el sobrenadante libre de particular y materiales insolubles a un tubo nuevo y ajustar el pH con HEPES.
- Se cuantificó el DNA genómico total extraído y revisó la calidad del DNA en el equipo EPOCH. Se comprobó la integridad del DNA obtenido en un gel de agarosa.
- Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

12. Creación de librerías metagenómicas

Las muestras fueron enviadas a un prestador de servicios, Zymo Research, CA, localizado en California para el análisis metagenómico de las regiones variables V1 V3 a través de la tecnología Illumina.

El protocolo de trabajo para la secuenciación por Illumina consta de 4 pasos básicos:

I. Preparación de la muestra

Pese al número creciente para preparación de la muestra, todos los métodos adicionan adaptadores a los extremos de los fragmentos de DNA. Por medio de la reducción de ciclos de amplificación, se adicionan secuencias adicionales, como el sitio de unión para secuenciación y las regiones complementarias a los iniciadores que se encuentran en la celda de flujo.

Las muestras de DNA son fragmentadas aleatoriamente para generación de extremos romos 5' fosforilados por medio de reparación de extremos. El fragmento Klenow de la DNA polimerasa es empleado para el anclaje de una

base 'A' al extremo 3' de los fragmentos de DNA, para la ligación de los adaptadores. Posterior a la ligación de los adaptadores a ambos extremos, los fragmentos de DNA son desnaturalizados, para que el DNA de cadena sencilla sea anclado a cámaras de reacción localizadas en una superficie sólida y ópticamente transparente, conocida como celda de flujo.

II. Generación de agrupaciones (clusters)

El agrupamiento se define como el proceso en el que cada fragmento se amplifica de manera isotérmica. La celda de trabajo es similar a un portaobjetos con carriles. Cada uno de estos carriles es un canal cubierto por césped, compuesto por dos tipos de oligonucleótidos para posterior hibridación y amplificación por puente (amplificación clonal).

Los fragmentos de DNA anclados son extendidos y amplificados por PCR en puente, para obtener una señal de luz suficiente para detección oportuna.

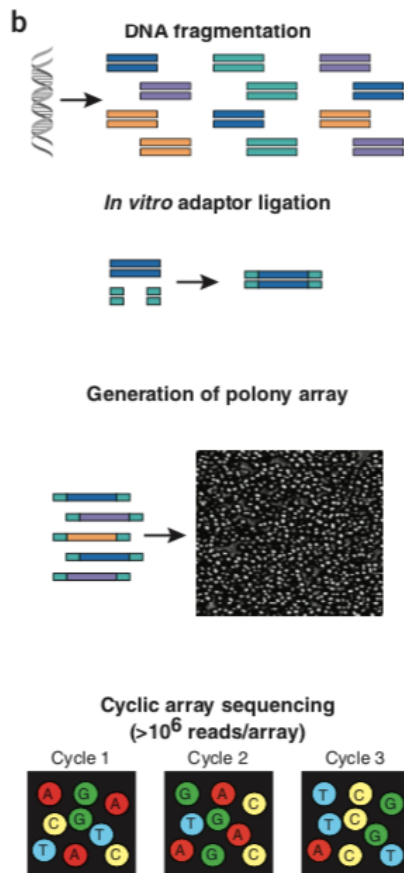
La amplificación por PCR en puente puede crear un arreglo de secuenciación de ultra-alta densidad sobre la celda de flujo, conteniendo cientos de millones de agrupaciones, donde cada una contiene aproximadamente 1000 copias de la misma plantilla de DNA.

III. Secuenciación.

Para iniciar el proceso, la plantilla de DNA es anclada a una secuencia complementaria a la region del adaptador, la cual iniciará el anclaje de la DNA polimerasa a la región de DNA de doble cadena. Durante cada ciclo, se añade una mezcla de dideoxinucleótidos individuales marcados con fluoróforos específicos y bloqueados por el extremo 3' (dNTPs). Se inicia con la extensión de la primera secuencia del iniciador para producir la primera lectura. En cada ciclo, los dNTPs compiten por la adición a la cadena creciente. Solo uno es incorporado, basado en la secuencia de la plantilla de DNA. Posterior a la incorporación de un dNTP a cada cadena complementaria en elongación, se

procede a la remoción de los dNTPs que no se emplearon para fotografiar la superficie e identificar el dNTP que fue incorporado en cada agrupación. Tanto el fluoróforo como el grupo bloqueado pueden ser removidos para iniciar un nuevo ciclo.

Después del primer ciclo posterior a la adición de cada nucleótido, las agrupaciones son excitadas por una fuente de luz y hay emisión de una señal fluorescente característica. La identificación del dNTP que fue incorporado es lograda a través de la microscopía de reflexión fluorescente interna total, donde se emplean al menos dos canales láser. Cada dNTP es ligado a un fluoróforo específico para el tipo de base, requiriendo de cuatro canales de imagen.



Workflow en plataformas de nueva generación. Procesamiento de las muestras para secuenciación por síntesis.

IV. Análisis de datos

En la década pasada, la metagenómica basada en los datos obtenidos de NGS se ha vuelto un campo rápidamente creciente en microbiómica. Asimismo ha crecido la bioinformática, ofreciendo de manera similar, incontables algoritmos, herramientas y softwares para direccionar toda clase de tareas relacionadas con la metagenómica basada en NGS, desde pre-procesamiento, análisis, evaluación y representación gráfica.

Cuando se analiza una comunidad ambiental, una de las preguntas fundamentales concierne la composición taxonómica de la comunidad y la relación filogenética de sus miembros. El estudio de los genes de marcadores específicos puede ejemplificarse con el uso del gen de la subunidad pequeña 16S del rRNA, que ha permitido a los investigadores analizar hábitats tan diferentes y complejos[40]. El gen 16S rRNA es particularmente útil ya que es ubicuo en procariotes, y es una parte integral del ribosoma; evoluciona a un índice constante, funcionando como un reloj filogenético que consiste de 9 regiones altamente conservadas intercaladas con 9 regiones hipervariables que facilitan la alta especificidad para distinguir entre organismos, funcionando en clasificaciones filogenéticas como una manera rápida y firme de obtener el fingerprinting taxonómico de una comunidad. La distribución taxonómica resultante es asociada a datos ambientales derivados del sitio de muestreo.

La gran utilidad de la secuenciación de nueva generación ha sido demostrada para aplicaciones que involucran la biología de patógenos y epidemiología genómica. Una de las mayores aplicaciones de esta tecnología es la caracterización comparativa de microbiomas en estados de salud y enfermedad; en el campo de la infectología el reemplazo de los métodos convencionales por métodos independientes de cultivo para la identificación y caracterización de microorganismos comensales y patógenos residentes en el humano.

Análisis Bioinformático

Enormes cantidades de datos metagenómicos resultan del empleo de las tecnologías de secuenciación, como Illumina. Los retos para los estudios metagenómicos incluyen el muestreo directo del material genético de las comunidades microbianas, almacenamiento y análisis de datos.

Sin embargo aclaramos que esto fue realizado por la empresa no por nosotros.

13. Análisis de secuencias

- Las secuencias en crudo se procesarán en el software Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME2)
- Como criterios de selección de secuencias:
- Se descartarán aquellas secuencias:
 - Con una longitud <1000bp
- Se conservarán aquellas muestras que conserven el <75% de la longitud original
- B. Muestras con número de lecturas <1000
- C. Quimeras
- Detección de quimeras. Para revisar las secuencias quiméricas entre las diferentes categorías de secuencias, se empleará UCHIME.
- Las lecturas restantes con al menos 97% de identidad serán agrupadas en OTUs a nivel especie con ayuda de QIIME2.
- Se realizará la asignación taxonómica empleando la base de datos Greengenes.
- Criterios de exclusión posteriores a la asignación taxonómica:
 - OTUs con número de lecturas = 1
 - Muestras con número de lecturas <1,000
- Se realizará la determinación de α , β y γ diversidad

11. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis descriptivo con medidas de tendencia central para las variables que así lo permitieron mediante Excel versión 14.4.3.

Consideraciones éticas

La Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en su Título Segundo "De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos", capítulo I, artículo 14.V establece que la investigación que se realice en seres humanos deberá contar con consentimiento informado del sujeto de investigación o su representante legal, por lo cual se solicitó dicho documento a los pacientes y sus padres (Anexo).

12. VARIABLES DEL ESTUDIO Y ESCALAS DE MEDICIÓN

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Microbiota identificada (variable dependiente)	Bacterias identificadas por medio de secuenciación del ADNr bacteriano S16.	Tipo de bacteria identificada	Cualitativa nominal
Edad (variable independiente)	Años del paciente desde el nacimiento hasta el momento de la cirugía.	Años del paciente basado en fecha de nacimiento y fecha de cirugía.	Cuantitativa discreta
Género (variable independiente)	Conjunto de seres que tienen uno o varios caracteres comunes	Masculino o femenino	Cualitativa dicotómica
Mastoidectomía (variable independiente)	Procedimiento quirúrgico que consiste en remover el hueso cortical, así como las celdillas mastoideas.	Primaria o de revisión	Cualitativa dicotómica

13. RESULTADOS

Se obtuvieron 26 muestras durante la cirugía de mastoides, tanto primaria como de revisión, por otitis media crónica con colesteatoma. Se incluyeron 13 niños, 9 hombres y 4 mujeres, de 1 año a 17 años (edad media, 10.3 años).

La presencia y abundancia relativas de diferentes bacterias se muestran en la Tabla 1.(ANEXOS)

Sin embargo, la negatividad de una bacteria en el perfil 16S no fue un indicador completamente confiable de su verdadera ausencia: a menudo pequeñas cantidades de bacterias permanecieron sin ser descubiertas.

El ADN se aisló de las muestras recolectadas y se procedió a su análisis mediante pirosecuenciación basado en el gen 16SrRNA para caracterizar la microbiota bacteriana. Durante la clasificación taxonómica utilizando los datos del subconjunto, pudimos clasificar más del 98% de las secuencias a nivel de *phyla*, clase, orden y familia; sin embargo, esta tasa disminuyó a menos del 92% a nivel de especie.

De las 26 muestras analizadas, pre y post aplicación de MESNA, la mayoría correspondieron a: Firmicutes 31.7%, Proteobacteria 29.8%, Actinobacteria 28.3%, Cyanobacteria 1.4%, Bacteroidetes 6.8%.

El 31.9% pertenecían a bacterias gram positivas, mientras que 67.5% eran bacterias gram negativas.

En ninguna de las muestras se obtuvo un solo agente bacteriano. En las tablas podemos observar la diversidad bacteriana de cada paciente.

De las bacterias Firmicutes se obtuvieron las clases Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichia, Negativicutes. De las proteobacterias recabamos alphaproteobacteria, betaproteobacterias, deltaproteobacterias, epsilonproteobacterias, gammaproteobacterias. Actinobacterias, la clase más predominante fue la actinobacteria. De los Bacteroides se presentaron la clase bacteroidia, Cythophagia, Flavobacteriia, Sphingobacteriia.

Obtuvimos 4 especies del grupo de Actinomyces, los cuales estaban presentes en 2/13 muestras en la primera toma y en 5/13 muestras posterior al uso de MESNA.

Se obtuvieron 8 especies del grupo Corynebacterium. En 8 muestras hubo más 1 de especie posterior al uso de MESNA.

De la familia Corynebacteriaceae, de género y especie no identificada, se demostró su presencia en el 3.70% del total, con 7/13 en la toma de muestra pre MESNA y en 5/13 post MESNA. *Turicella otitidis* fue hallada en 6.70% de las tomas; en 5/13 pre-aplicación de MESNA (5/13) y en 0/13 post MESNA.

Propionibacterium acnes se encontró en el 10.7 %; 11/13 pre MESNA, y en 12/13 post MESNA. Cabe señalar que en 6 muestras presentó un aumento en su concentración.

S. capitis-caprae-epidermidis fue reportado en el 12.7% del total de muestras, sobre todo en el paciente 99 A (92.70%) donde fue el patógeno dominante. En este caso logró concentrarse al 100% posterior a la colocación de MESNA. Este agente se reportó en 5/13 de las muestras pre MESNA y en 8/13 post MESNA.

Se identificó *Pelomonas saccharophila* en 3%; con 3/13 de las muestras pre y en 8/13 post MESNA.

Pseudomonas fluorescens-yamanorum en 4.6 %; en 6/13 de las muestras pre y en 6/13 post aplicación de MESNA mostrando aumento en su concentración en 4 muestras, y disminución o desaparición en 5.

Escherichia-Shigella coli se obtuvo en el 4.6% , correspondientes a 6/13 y 4/13 pre y post MESNA respectivamente.

Streptococcus mitis-oralis-sanguinis se encontró en 2.4%. En la muestra 60A en un 26.7%, con disminución al 3.4 % posterior a la aplicación de MESNA.

14. DISCUSIÓN

Aunque no observamos agentes causales dominantes novedosos, nuestros resultados pueden contribuir al conocimiento de las especies que rara vez se ven en la OMC colesteatomatosa.

El desarrollo de nuevas tecnologías con enfoques moleculares ha permitido realizar una investigación detallada de la diversidad y complejidad de los microorganismos que pueden estar presentes en las diversas muestras de tejidos.³⁴

T. otitidis fue un patógeno claramente dominante en 5 muestras. Hasta ahora, al igual que en otras investigaciones^{34,35}, la discusión sobre el papel de este agente como colonizador del conducto auditivo externo o como patógeno ha sido motivo de múltiples debates; nuestros resultados sugieren que, en algunos casos de OMC, podría ser un agente causal, como ha sido reportado en otros estudios.³⁶

La proporción de *A. otitidis* en el total de nuestras muestras de OMC fue menor al reportado en estudios previos, y solo fue el patógeno dominante en un solo paciente.

Debido a la cuantificación relativa que es una característica del perfil del gen 16S, podemos distinguir las patógenas dominantes presentes en grandes cantidades de las señales de las bacterias presentes en pequeñas cantidades, cuya participación patógena podría ser poco probable.

Propionibacterium forma parte del microbiota normal de la piel, boca e intestino. Se cree que desempeñan un papel en la estabilización de la microbiota normal al ocupar sitios que luego no pueden ser invadidos por patógenos.³⁵ Es posible que se produzcan perturbaciones en el microbiota común debido, por ejemplo, al uso excesivo de antibióticos y / o la inmunidad comprometida y que esto favorezca la aparición de la enfermedad. En nuestra investigación fue hallado en 23/26 tomas, representando el 10.7% del total de las muestras.

Se cree que la OMC con colesteatoma es el resultado de bacterias que ascienden desde la nasofaringe a través de la trompa de Eustaquio o que invaden el conducto auditivo externo a través de una perforación de la membrana timpánica.¹⁸

En otros estudios se ha demostrado la detección de géneros bacterianos asociados con su capacidad para la formación de biopelículas como sucede con especies de *Pseudomonas*¹⁰. En este estudio, *Pseudomona* estuvo presente en el 4.6% de las muestras.

Los hallazgos preliminares de nuestro estudio deberán validarse en el futuro con tamaños de muestra más grandes.

Como ya ha sido reportado por otros autores, confirmamos que la NGS nos permite obtener mayor positividad del método y esto puede explicarse por su capacidad para detectar microbiomas acumulativos en una muestra y su capacidad para detectar bacterias en baja abundancia.^{37,38} Este método también permite la identificación de organismos raros dentro de una comunidad polimicrobiana que de otra manera serían enmascarados por bacterias dominantes en un ensayo tradicional basado en cultivos.

Sin embargo, esto dió como resultado bacterias no tan relevantes para nuestro padecimiento.

Los estudios del oído medio relacionados con 16S rRNA comenzaron en los años 80 y principios de los 90.³⁴ En nuestra investigación pudimos observar que con una pequeña cantidad de muestra fue posible obtener aislamientos de microorganismos, que de otra forma, y con el empleo de técnicas convencionales no hubiera sido posible.

P. aeruginosa, *Proteus* spp., *S. aureus*, *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. y *Bifidobacterium* spp. son bacterias que se han reportado en los casos de colesteatoma extenso y asociado a complicaciones.^{37,38}

De acuerdo con nuestros resultados preliminares, la presencia de bacterias gramnegativas, grampositivas, aerobias y anaeróbicas en muestras de colesteatoma está acorde con diversas publicaciones.¹⁸

La colonización nasal con *Staphylococcus*, y eventos como la rinitis pueden alterar el microbioma del oído medio, de tal forma que pudiéramos encontrarlo también dentro del oído medio.³⁹

Un informe anterior mostró que las bacterias Actinobacteria y Firmicutes comprenden un gran porcentaje de los microbiomas en oído medio y nariz. Estudios recientes también revelaron que la mayoría de las bacterias aisladas de oído medio normal de individuos sanos eran especies de *Staphylococcus coagulasa negativas* (63% –83%) y *Corynebacterium diphtheriae* (19% – 32%). Los estafilococos coagulasa negativos y *Corynebacterium diphtheriae* son generalmente considerados como microorganismos comensales del oído medio que pueden contribuir o incluso ser causa de enfermedad.³⁵ En esta investigación pudimos observar que los estafilococos coagulasa negativo son microorganismos que se presentan en las muestras de pacientes con patología mas agresiva, con recurrencia.

Como se ha visto en otros trabajos sobre el uso de MESNA en OMC colestomatosa en niños, además de tener efecto en las láminas de queratina (rompiendo los enlaces disulfuro), provoca alteraciones en la estructura del biofilm y su la separación del tejido de colestoma. En este trabajo pudimos observar que quizá el MESNA favorezca que los grupos de bacterias se concentren mayormente y debido a que se han disminuido las proteínas de adhesión y expresión de exopolisacaridos relacionados a la unión y formación de las biopelículas, perdiendo su protección y cuestionándonos ¿de que si las bacterias podrían quedar más susceptibles para su erradicación con algún tratamiento ?

Debido a las hipótesis que se han formulado en trabajos previamente publicados, el MESNA pudiera ser un facilitador para otras opciones terapéuticas al alterar la estructura de biofilm. Los efectos del MESNA en las biopelículas no se ha estudiado exhaustivamente. Un estudio reciente con *E. coli* mostró que el compuesto era capaz de inhibir las fases iniciales de adhesión y formación de biopelículas, destruyendo las membranas maduras, reduciendo los niveles de proteínas extracelulares y exopolisacáridos e inhibiendo la expresión de genes asociados con proteínas de adhesión y la expresión de exopolisacáridos.

Finalmente, el papel del MESNA en la OMC colestomatosa pudiera ubicarse plenamente en el manejo quirúrgico de esta entidad con resultados altamente satisfactorios.⁴⁰ Los estudios previos que mostraron disgregación de la biopelícula¹⁰ en el motivaron a la búsqueda de los efectos del MESNA en los microorganismos presentes en esta patología, sin embargo, los resultados preliminares de esta investigación no muestran efectos positivos en cuanto a lisis o propiedades bactericidas en los gérmenes bacterianos. Sin embargo, si observamos cambios

en la microbiota. La expresión y repercusión clínica de dichos cambios deberá ser motivo de otros estudios, con un tamaño de muestra más representativo.

15. CONCLUSIÓN

En otras investigaciones se ha concluido que el MESNA no causa lisis bacteriana ni muestra propiedades bactericidas. Sin embargo, en nuestro estudio se apreció la desaparición de bacterias en algunas muestras previamente reportadas. Este hallazgo quizá pueda deberse a la precisión del método de secuenciación que haya eliminado la presencia de gérmenes en las muestras y no por el efecto del medicamento.

Desafortunadamente el tamaño de la muestra es muy pequeño para poder demostrar el efecto del MESNA en la eliminación bacteriana. No obstante, pudimos demostrar cambios en la microbiota del colesteatoma posterior a su aplicación que pudieron ser documentados mediante técnicas de biología molecular como es la secuenciación del ADN ribosomal bacteriano S16.

La expresión y repercusión clínica de los cambios observados deberá ser motivo de otros estudios, con un tamaño de muestra más representativo.

16. CRONOGRAMA

Periodo/ Etapa	Julio 2018	Agosto 2018	Septie mbre 2018	Octubr e 2018	Novie mbre 2018	Dicm ebre 2018	Ener o 2019	Febr ero 2019	Mar zo 201 9	Abr il 201 9	Mayo 2019
Elección de tema	XX										
Búsqueda de bibliografía		XX	XX	XX							
Elaboración de Anteproyecto					XX						
Aprobación de Protocolo						XX					
Recolección de Datos						XX	XXX	XXX			
Procesamiento y análisis de los datos									XX X		
Redacción de tesis										XX	
Presentación de resultados.											XX

17. REFERENCIAS

1. Nevoux J, Lenoir M, Roger G et al. Childhood cholesteatoma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2010; 127:143–150.
2. Morita Y, Yamamoto Y, Oshima S, Takahashi K, Takahashi S. Pediatric middle ear cholesteatoma: the comparative study of congenital cholesteatoma and acquired cholesteatoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 2015;273(5):1155-1160.
3. Flint P, Cummings C, Chole, R. Cummings otolaryngology. 6th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders; 2015. Chapter 139, Chronic Otitis Media, Mastoiditis, and Petrositis. *Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery*
4. Bluestone C, Rosenfeld R. Surgical atlas of pediatric otolaryngology. 5th ed. Canada: BC Dekker Inc; 2002. Chapter 5, Mastoidectomy and Cholesteatoma.
5. Morita Y, Yamamoto Y, Oshima S, Takahashi K, Takahashi S. Acquired cholesteatoma in children: Clinical features and surgical outcome. *Auris Nasus Larynx.* 2014;41(5):417-421.
6. Bassiouny M, Badour N, Omran A, Osama H. Histopathological and immunohistochemical characteristics of acquired cholesteatoma in children and adults. *Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences.* 2012;13(1):7-12.
7. Maniu A., Harabagiu O., Perde Schrepler M., Cătană A., Fănuță B., Mogoantă C.A. Molecular biology of cholesteatoma. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2014;55:7–13
8. Galli J, Calò L, Giuliani M, Sergi B, Lucidi D, Meucci D et al. Biofilm's Role in Chronic Cholesteatomatous Otitis Media. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery.* 2016;154(5):914-916.
9. Minami S, Mutai H, Suzuki T, Horii A, Oishi N, Wasano K et al. Microbiomes of the normal middle ear and ears with chronic otitis media. *The Laryngoscope.* 2017;127(10):E371-E377.

10. De la Torre González C, Huante-Guido M, Velázquez Guadarrama N, Preciado D, Patiño López G. Changes in biofilm in chronic cholesteatomatous otitis media in children following the application of sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA). *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2018;110:48-52.
11. Kalcioğlu M, Guldemir D, Unaldi O, Egilmez O, Celebi B, Durmaz R. Metagenomics Analysis of Bacterial Population of Tympanosclerotic Plaques and Cholesteatomas. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 2018;159(4):724-732.
12. Frickmann H. Cholesteatoma ? A Potential Consequence of Chronic Middle Ear Inflammation. *Otolaryngology*. 2012;02(03).
13. Kaya E, Dag I, Incesulu A, Gurbuz M, Acar M, Birdane L. Investigation of the Presence of Biofilms in Chronic Suppurative Otitis Media, Nonsuppurative Otitis Media, and Chronic Otitis Media with Cholesteatoma by Scanning Electron Microscopy. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:1-6.
14. Post J, Hiller N, Nistico L, Stoodley P, Ehrlich G. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 2007;15(5):347-351.
15. Post J. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *The Laryngoscope*. 2015;125(9):2003-2014.
- 16.- Chole R, Faddis B. Evidence for Microbial Biofilms in Cholesteatomas. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2002;128(10):1129.
17. Brook I. Bacteriology of chronic otitis media. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1979;241(5):487-488.
18. Madana J, Yolmo D, Kalaiarasi R, Gopalakrishnan S, Sujatha S. Microbiological profile with antibiotic sensitivity pattern of cholesteatomatous chronic suppurative otitis media among children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2011;75(9):1104-1108.

19. Brook I. The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: Implications for medical therapy. *Anaerobe*. 2008;14(6):297-300.
20. Minami S, Mutai H, Suzuki T, Horii A, Oishi N, Wasano K et al. Microbiomes of the normal middle ear and ears with chronic otitis media. *The Laryngoscope*. 2017;127(10):E371-E377.
21. Yilmaz M, Goksu N, Bayramoglu I, Bayazit Y. Practical Use of MESNA in Atelectatic Ears and Adhesive Otitis Media. *ORL*. 2006;68(4):195-198.
22. Kalcioğlu M, Cicek M, Bayindir T, Ozdamar O. Effectiveness of MESNA on the success of cholesteatoma surgery. *American Journal of Otolaryngology*. 2014;35(3):357-361.
23. Vincenti V, Magnan J, Saccardi M, Zini C. Chemically Assisted Dissection by Means of Mesna in Cholesteatoma Surgery. *Otology & Neurotology*. 2014;35(10):1819-1824.
24. Mantilla E, De la Torre C, et al. Uso de MESNA en el tratamiento de colesteatoma adquirido de oído medio en niños. Evaluación mediante microscopía de luz y electrónica. "Tesis sub-especialidad" Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016 39p.
25. Preciado D. Biology of cholesteatoma: Special considerations in pediatric patients. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2012;76(3):319-321.
26. Morita Y, Yamamoto Y, Oshima S, Takahashi K, Takahashi S. Pediatric middle ear cholesteatoma: the comparative study of congenital cholesteatoma and acquired cholesteatoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2015;273(5):1155-1160.
27. Prescott C. Cholesteatoma in children—the experience at The Red Cross War Memorial Children’s Hospital in South Africa 1988–1996. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 1999;49(1):15-19.
28. Ahn S, Oh S, Chang S, Kim C. Prognostic factors of recidivism in pediatric cholesteatoma surgery. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2003;67(12):1325-1330.

29. Saunders J, Murray M, Alleman A. Biofilms in chronic suppurative otitis media and cholesteatoma: scanning electron microscopy findings. *American Journal of Otolaryngology*. 2011;32(1):32-37.
30. Casale M, Di Martino A, Salvinelli F, Trombetta M, Denaro V. MESNA for chemically assisted tissue dissection. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2010;19(6):699-707.
31. Vincenti V, Mondain M, Pasanisi E, Piazza F, Puel J, Baccius et al. Cochlear Effects of Mesna Application into the Middle Ear. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;884(1):425-432.
32. Chen S, He N, Yu J, Li L, Sun F, Hu y et al. Inhibitory effect of 2-mercaptoethane sulfonate on the formation of *Escherichia coli* biofilms in vitro. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12(4):5223-5230.
33. Petti C, Polage C, Schreckenberger P. The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(12):6123-6125.
34. Kalcioglu M, Guldemir D, Unaldi O, Egilmez O, Celebi B, Durmaz R. Metagenomics Analysis of Bacterial Population of Tympanosclerotic Plaques and Cholesteatomas. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 2018;159(4):724-732.
35. Ricciardiello F, Cavaliere M, Mesolella M, Iengo M. Notes on the microbiology of cholesteatoma: clinical findings and treatment. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2009;29:197–202
36. Neeff M, Biswas K, Hoggard M, Taylor M, Douglas R. Molecular Microbiological Profile of Chronic Suppurative Otitis Media. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(10):2538-2546.
37. Ju F, Zhang T. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(10):4119-4129.

38. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W et al. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2011;11(3):333-343.

39. Santos-Cortez R, Hutchinson D, Ajami N, Reyes-Quintos M, Tantoco M, Labra P et al. Middle ear microbiome differences in indigenous Filipinos with chronic otitis media due to a duplication in the A2ML1 gene. *Infectious Diseases of Poverty*. 2016;5(1).

40. De la Torre C, Villamor P. Chemically Assisted Dissection With Sodium 2-Mercaptoethanesulfonate (MESNA) in the Surgical Management of Pediatric Cholesteatoma. *Otology & Neurotology*. 2019;40(5):645-650.

18. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Debido a lo costoso del procesamiento de las muestras, el tamaño de la muestra es muy pequeño para poder demostrar el efecto del MESNA en la eliminación bacteriana.

19 . ANEXOS

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GÓMEZ Servicio de Otorrinolaringología
Protocolo de investigación: “Cambios en la microbiota en la otitis media crónica
colestomatosa en niños posterior a la aplicación de 2- mercaptoetanosulfonato de
sodio (MESNA) mediante estudio de biología molecular gen 16S”.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Les invitamos a participar en un estudio experimental en el cual se evaluarán los cambios en la biopelícula bacteriana del tejido de colestatoma posterior a la aplicación de un medicamento llamado MESNA. La participación en el estudio es totalmente voluntaria y no están forzados a participar si así lo desean. Les solicitamos lean la siguiente información. Si existiera alguna duda o pregunta infórmenlo a la persona que les proporcionó este documento.

Objetivo del estudio

El manejo del colestatoma en niños es difícil debido al comportamiento clínico agresivo y a las elevadas tasas de recidiva del mismo. Estas características han sido asociadas a la presencia bacteriana en el colestatoma, por lo cual este trabajo pretende evaluar si existen cambios en las bacterias posterior a la aplicación de un fármaco llamado MESNA.

Responsables del estudio

El protocolo se está llevando a cabo en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez y cuenta con el apoyo del laboratorio de enfermedades infecciosas del hospital, así como especialistas en el área de microbiología molecular y genómica.

Dentro del servicio de Otorrinolaringología los responsables del estudio son el Jefe de Servicio Dr. Carlos de la Torre González y la Dra. Luz Elvira Hernández Alcántara, residente de 6to año de la supraespecialidad. Puede contactarlos al teléfono 52289917 ext. 2033.

Toma de muestras

Durante la cirugía que se le realizará al paciente se tomará una primera muestra del tejido de colesteatoma y posteriormente una segunda muestra después de la aplicación del fármaco MESNA, mismas que serán procesadas para su evaluación.

La seguridad del fármaco aplicado dentro del oído ha sido comprobada en estudios experimentales en seres humanos por lo cual no existen riesgos con su utilización.

Permanencia durante el estudio

Si usted decide retirarse del estudio puede hacerlo de forma libre en cualquier momento durante el mismo y esto no afectará la atención que seguirá recibiendo en nuestra institución.

Confidencialidad

La información obtenida se manejará de forma confidencial y no se compartirá con ninguna persona que no sea responsable de su cuidado médico o que no sea participante del protocolo de investigación. No se utilizarán nombres durante la generación de resultados del estudio y tampoco aparecerán en los reportes derivados del mismo.

Es importante aclarar que no se ofrece ningún pago a los participantes del estudio.

Entiendo y acepto que mi hijo(a) participe en el protocolo de investigación.

Nombre y firma de la persona legalmente responsable

Testigo

Testigo

Testigo

Fecha

TABLA 1
BACTERIAS POR GENERO Y ESPECIE REPORTADAS.

PREMESNA

POST MESNA

Taxonomy	97A	97B	97C	97D	97E	97F	97G	97H	97I	97J	97K	97L	97M	97N	97O	97P	97Q	97R	97S	97T	97U	97V	97W	97X	97Y	97Z	97AA	97AB	
None;Other;Other;Other;Other;Other;Other	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99B																													
07B																													
08B																													
09B																													
14B																													
29B																													
46B																													
60B																													
63B																													
66B																													
79B																													
88B																													
98B																													
99A																													
c__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Acidobacteria;o__NA;f__VA;g__Blastocella;f__s__sp304	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Actinomyetales;f__Actinomycetaceae;g__Actinomyces;s__meylei-odontolyticus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Actinomyetales;f__Actinomycetaceae;g__Actinomyces;s__naesiindli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri3;c__Actinobacteria;o__Actinomyetales;f__Actinomycetaceae;g__Actinomyces;s__naesiindli-oris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Actinomyetales;f__Actinomycetaceae;g__Actinomyces;s__odontolyticus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Actinomyetales;f__Actinomycetaceae;g__Actinomyces;s__oris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Actinomyetales;f__Actinomycetaceae;g__Variabaculum;s__cambiense	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium;s__caeniulatum-kashiwanohense-pseudocatenulatum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__accollens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__amycolatum	1	0	0	0	0	4	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__amycolatum-argentoratense	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__aurimucosum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__callunae	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__lipophiloflavum	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__mucifaciens	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__pseudogenitalium-tuberculoestearicum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c__Bacteria;p__Actinobacteri1;c__Actinobacteria;o__Corynebacteriales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__pseudogenitalium-tuberculoestearicum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pasteurellales;f__Pasteurell aceae;g__Haemophilus;s__pa ainfluenzae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.70	0.00	0.00	
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pasteurellales;f__Pasteurell aceae;g__Haemophilus;s__pit maniae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pasteurellales;f__Pasteurell aceae;g__Haemophilus;s__sp 32189	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Mora cellaceae;g__Acinetobacter;s baumanni-calcoaceticus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.40	0.00	0.00	
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Mora cellaceae;g__Acinetobacter;s calcoaceticus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Mora cellaceae;g__Acinetobacter;s johnsonii	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Mora cellaceae;g__Acinetobacter;s lwoffii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Mora cellaceae;g__Enhydrobacter- Moraxella;s__aerosaccus- sloensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.20	0.00	0.00	0.00	0.00
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Mora cellaceae;g__Moraxella;s__ca arrhali-nonliquefaciens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Pseu domonadaceae;g__Pseudomo nas;s__alcaligenes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Pseu domonadaceae;g__Pseudomo nas;s__constantinii- fluorescens-poaie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Pseu domonadaceae;g__Pseudomo nas;s__fluorescens- ramanorum	4	0	5	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0.00	0.00	0.00	0.00	25.3	3.30	26.0	0.00	0.00	2.90	4.50	17.8	0.00	
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Pseu domonadaceae;g__Pseudomo nas;s__putida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Pseudomonadales;f__Pseu domonadaceae;g__Pseudomo nas;s__pseudoalcaligenes- stutzeri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Xanthomonadales;f__Xanth omonadaceae;g__Lysobacter; s__brunescens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
__Bacteria;p__Proteobacteri 3;c__Gammaproteobacteria;o __Xanthomonadales;f__Xanth omonadaceae;g__Stenotroph omonas;s__rhizophila	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00