

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ



**CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
RESISTENTES A QUINOLONAS AISLADAS DE OTORREA EN PACIENTES CON OTITIS
MEDIA CRÓNICA**

**PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA
Y CUELLO**

PRESENTA: MÓNICA RODRÍGUEZ VALERO

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar, médico adscrito a la División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

Dr. Rigoberto Hernández Castro, investigador del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos.

ASESORES

Q.C. Sara Arroyo Escalante, Laboratorio Clínico Sección de Microbiología Clínica.

M en C. Erika M. Carrillo Casas, investigadora del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad

Dra. Dina Fabiola González Sánchez, médico adscrito a la División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

M en C. Fernando Martínez Hernández, investigador del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos.

Q.B.P. David Moncada Barrón, Laboratorio Clínico Sección de Microbiología Clínica.

Dra. Ana Patricia Rodríguez Zulueta, Jefatura de División de Investigación Epidemiológica.

Dr. Ricardo Rafael Valdez Vázquez, Subdirector de Epidemiología.

AGOSTO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González por la División de Otorrinolaringología y el Departamento de Ecología de Agentes Patógenos.

Este trabajo de Tesis con No. 12-24-2011, presentado por la alumna Mónica Rodríguez Valero se presenta en forma con visto bueno por los Tutores principales de la Tesis Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar y Dr. Rigoberto Hernández Castro y por con fecha del 18 de agosto de 2011 para su impresión final.

Tutores Principales

**Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar
División de Otorrinolaringología
y Cirugía de Cabeza y Cuello
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”**

**Dr. Rigoberto Hernández Castro
Departamento de Ecología
de Agentes Patógenos
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”**

Autorizaciones

Dra. Elisa Vega Memije
Subdirección de Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de enseñanza
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Héctor Manuel Prado Calleros
Jefe de la División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar
Médico adscrito de la División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Rigoberto Hernández Castro
Investigador del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos.
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Agradecimientos

A mi mamá y papá por enseñarme los principios y valores de esta vida, por su amor y apoyo incondicional. Los adoro!!!

Rubén gracias por caminar junto a mí buscando siempre mi desarrollo personal y profesional. Te amo!

A Adrián y Yolis por increíble capacidad de hacerme reír y alegrarme cada día. Los adoro!

Dr. Prado le agradezco muchísimo todo su esfuerzo en la tarea de enseñarnos y dejarnos aprender... pero sobretodo por no limitarnos y darnos la oportunidad de ser mejores médicos cada día.

Gerardo gracias por tu enseñanza, confianza y apoyo en toda mi residencia.

Al Dr. González, Dra. Castillo y Dra. González por su confianza, por compartir sus conocimientos, por preocuparse por nuestro aprendizaje y por darnos los mejores tips quirúrgicos.

Rigo gracias por tu dedicación para enseñarme una probadita de biología molecular y por tu tiempo. Gracias a todo tu equipo que hizo posible este proyecto.

Paty gracias por tu apoyo en este trabajo.

Perla y Jime gracias por su amistad, esta residencia no sería lo mismo sin ustedes. Lo logramos!!!!

Oscar, Alex, Mike, Chio y Memo gracias por ser más amigos que residentes.

Mago y Mary gracias por hacer de otorrino una gran familia!

En especial a todos los pacientes que nos hacen ser lo que hoy somos.

Características moleculares de las bacterias Gram negativas resistentes a quinolonas aisladas de otorrea en pacientes con otitis media crónica.

Colaboradores:

Nombre: Dra. Dina Fabiola González Sánchez, médico adscrito a la División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

Firma: _____

Nombre: Dr. Ricardo Rafael Valdez Vázquez, Subdirector de Epidemiología.

Firma: _____

Nombre: Dra. Ana Patricia Rodríguez Zulueta, Jefatura de División de Investigación Epidemiológica.

Firma: _____

Nombre: M en C. Erika M. Carrillo Casas, investigadora del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad.

Firma: _____

Nombre: M en C. Fernando Martínez Hernández, investigador del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos.

Firma: _____

Nombre: Q.C. Sara Arroyo Escalante, Laboratorio Clínico Sección de Microbiología Clínica.

Firma: _____

Nombre: Q.B.P. David Moncada Barrón, Laboratorio Clínico Sección de Microbiología Clínica.

Firma: _____

INDICE

Resumen	9
Summary	10
1. Introducción	11
2. Métodos.....	15
3. Estadística	17
4. Resultados.....	18
8. Discusión	20
9. Conclusiones	23
10. Referencias	24
11. Tablas y figuras	26
12. Instrucciones a los autores (Anales de Otorrinolaringología Mexicana).....	37

**CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
RESISTENTES A QUINOLONAS AISLADAS DE OTORREA EN PACIENTES CON OTITIS
MEDIA CRÓNICA**

Autor responsable de la correspondencia

Dra. Mónica Rodríguez Valero

Médico residente de cuarto año

División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

Hospital General Dr. Manuel Gea González

Calzada de Tlalpan 4800, Col. Sector XVI, Delegación Tlalpan, CP 14080, México, DF.

Teléfono 40003000, ext. 3047

monirodval@yahoo.com

RESÚMEN

La otitis media crónica (OMC) es un proceso inflamatorio en oído medio mayor a 3 meses cuyo agente etiológico más prevalente es *Pseudomonas aeruginosa*, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp y *Escherichia coli*. El significado clínico de la resistencia antibiótica y el papel de biofilms bacterianos en OMC son inciertos.

Objetivo: identificar mutaciones puntuales en genes cromosomales *gyrA* y *parC* de los aislamientos bacterianos de otorrea de pacientes con OMC y determinar su producción de biofilms con el propósito de identificar factores de riesgo asociados a la falla al tratamiento médico.

Métodos: Se identificaron los aislamientos de bacterias Gram negativas de pacientes con OMC, se extrajo ADN cromosomal, se determinó la presencia de genes de resistencia a quinolonas (*gyrA* y *parC*), posteriormente se amplificaron estos genes y se comparó sus secuencias de nucleótidos con GenBank. Se determinó la producción de biofilms de cada aislamiento. Se realizó un análisis descriptivo.

Resultados: Se obtuvieron 12 aislamientos, 5 identificados como *E. coli*, 5 como *P. aeruginosa* y 2 como *K. pneumoniae*, el 50% presentaron resistencia a ciprofloxacino. El 58% presentó mutaciones en *gyrA* (posición 87 y 83) y todos presentaron mutación en *parC* (posición 84). La producción de biofilm fue mayor en los pacientes con recaídas y en el grupo de las *P. aeruginosa*.

Conclusiones: La presencia de *E.coli* resistente a ciprofloxacino y con genes de resistencia *gyrA* no implica falla en el tratamiento, cuando se aísla *P. aeruginosa* la producción de biofilm puede asociarse a falla en el tratamiento antibiótico.

SUMMARY

Chronic otitis media is a middle ear inflammatory process that last more than three months, its main etiologic agent is *Pseudomonas aeruginosa*, followed by *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, and *Escherichia coli*. The role of antibiotic resistance and biofilm formation is uncertain.

Objective: Identify punctual mutations in chromosomal genes *gyrA* and *parC* from the isolated bacteria from otorrea from patients with this disease and to determine the biofilm formation in order to identify risk factors associated with medical treatment failure.

Methods: Identification of bacteria from chronic otitis media otorrea, chromosomal DNA extraction, identification of quinolone resistance gene (*gyrA* y *parC*), amplification of these gene and comparison with GenBank. Determine the biofilm production of these bacteria. Descriptive analysis was done.

Results: Twelve isolations were made, 5 identified as *E. coli*, 5 as *P. aeruginosa*, and 2 as *K. pneumoniae*, half of them presented ciprofloxacin resistance. The 58% presented *gyrA* mutations (87 and 83 position) and *parC* mutation was presented in every isolation(84 position). Biofilm formation was higher in patients with clinical failure and in the *P. aeruginosa* group.

Conclusions: The presence of ciprofloxacin resistant *E.coli* with *gyrA* mutations does not imply clinical failure. Isolation of *P. aeruginosa* and biofilm production may be associated with clinical failure.

Introducción

La otitis media crónica (OMC) es un proceso de inflamación no resuelto en oído medio y mastoides mayor a 3 meses. La OMC se clasifica en colesteatomatosa y no colesteatomatosa. (1,2) Puede estar activa o quiescente y la duración de estos periodos varía en cada paciente.(1-4) Se caracteriza por presentar secreción persistente inicialmente no complicada, pero puede provocar cambios irreversibles en la mucosa, tejido de granulación, osteítis, petrositis, timpanosclerosis, erosión osicular, laberintitis osificante e hipoacusia entre otras secuelas (1,3,5).

Los principales factores de riesgo para la desarrollar complicaciones por OMC son factores propios del huésped como Diabetes Mellitus, desnutrición, inmunodeficiencia y tratamiento con algunos medicamentos; y anatomía del hueso temporal como las variaciones en el grosor óseo, aperturas naturales y anatomía vascular. (1,3) Hay poca evidencia sobre factores propios de las bacterias causantes.

BACTERIOLOGIA

La mayoría de los estudios muestran que *Pseudomonas aeruginosa* es el agente etiológico más prevalente (40% al 60%), seguida de *Staphylococcus aureus* (10% al 20%). Otras bacterias encontradas son *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* y *Bacteroides*.

En 2010 se publicó un estudio sobre OMC realizado en Korea que reportó que el 69% de la población padeció OMC no colesteatomatosa, 26% OMC colesteatomatosa y 4.9% no especificada, el 81% presentó crecimiento bacteriano en los cultivos. En el 25% de los cultivos creció *Pseudomonas aeruginosa*, 25% *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, 19% *Staphylococcus aureus* meticilino sensible, 13% *Staphylococcus coagulasa* negativa, 2% *Providencia* (9).

En el 2004 Arias-Mora *et al*, evaluaron a 60 pacientes con OMC en México y demostraron que la infección por *Pseudomonas aeruginosa* representa más del 50% de los patógenos obtenidos sus cultivos. Concluyeron que la ciprofloxacino en solución tópica es similar en eficacia a la neomicina-polimixina-fluocinolona pero con menos riesgos (10).

El tratamiento médico de la OMC tiene como objetivo controlar la infección, estabilizar el proceso inflamatorio para prevenir y detener el daño irreversible y el desarrollo de complicaciones graves.

El tratamiento local incluye aseo y aplicación tópica de medicamentos. El tratamiento de elección para controlar la otorrea no complicada es antibiótico tópico (2,7).

Los medicamentos óticos por lo general contienen uno o más antibióticos (neomicina, tobramicina, gentamicina, polimixina B, ciprofloxacino y ofloxacino) con o sin esteroide, sin embargo la diversidad de antibióticos en esta presentación es limitada. En general se prefiere el uso de gotas antibióticas de baja ototoxicidad como las de fluoroquinolonas en pacientes con perforación timpánica. (2,3)

El significado clínico de la resistencia antibiótica con la disponibilidad de los antibióticos tópicos es incierto, ya que estos fármacos alcanzan altas concentraciones en oído. La alta concentración en oído puede sobrepasar a la concentración mínima inhibitoria. La concentración del antibiótico después de su aplicación en la mucosa del oído medio es variable (7,8).

El tratamiento antibiótico oral generalmente no es efectivo para OMC, se reserva para las infecciones agudas, es decir, una infección aguda en un "oído crónico". En ocasiones se utiliza tratamiento sistémico adyuvante como ciprofloxacino o levofloxacino con o sin clindamicina y piperacilina con tazobactam.

El tratamiento quirúrgico está indicado cuando el paciente cursa la fase de remisión, es decir, después de tres a seis meses sin presentar otorrea. Los procedimientos quirúrgicos consisten en timpanoplastia y mastoidectomía simple.

La proximidad del oído medio al compartimento intracraneal eleva el riesgo de las complicaciones infecciosas. Por lo que el tratamiento antibiótico efectivo es de suma importancia.

QUINOLONAS

Son antibióticos de amplio espectro, tienen una excelente actividad contra la mayoría de los Gram negativos. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la actividad de la subunidad A de la girasa de ADN. Se considera bactericida. La solución de ciprofloxacino en concentración de 0.3 mg/mL, libre de propilenglicol, constituye una solución antibiótica útil para uso tópico en pacientes con infecciones crónicas del oído medio y secuelas en la membrana timpánica ya que alcanza altas concentraciones.

Las quinolonas tienen una actividad que depende de la concentración. Las fluoroquinolonas son muy activas frente a bacterias Gram negativas, siendo la más potente la ciprofloxacino.

La resistencia a quinolonas ha sido un problema desde la introducción del ácido nalidíxico hace más de 40 años. Las quinolonas han tenido un uso indiscriminado que ha llevado a un aumento creciente de la resistencia a estos antimicrobianos mediante diferentes mecanismos: modificaciones en las dianas moleculares (Topoisomerasas tipo II), disminución de la permeabilidad de membranas, expresión o sobre-expresión de sistemas de expulsión activa, resistencia mediada por plásmidos y acetilación.

BIOFILM

Los biofilms o biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total.

Normalmente los procesos infecciosos crónicos se asocian los biofilms bacterianos, como la OMC, y se distinguen por una mala respuesta al tratamiento antibiótico ya que no se logra eliminar por completo a la bacteria. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido. Probablemente por la incapacidad o variabilidad de la penetración del antibiótico a través de la matriz exopolisacáridica de la biopelícula.

La formación de biofilm se ha demostrado en mucosa patógenos de mucosas, como *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. No todas las cepas de una especie forman biopelícula.

Michael Robert Lee *et al*, publicaron recientemente un estudio sobre la presencia de biofilms en 20 pacientes con OMC. Reportaron que los biofilms son estadísticamente más frecuentes en pacientes con OMC por lo que sugieren una patogenia importante.

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La caracterización genética cromosomal y la mediada por plásmidos de la resistencia a antibióticos tópicos en otitis media crónica ha sido poco estudiada.

Anteriormente las quinolonas eran el fármaco de elección para tratar pacientes con infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. Desde la aparición y diseminación de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a ciprofloxacino el uso de cefalosporinas antipseudomonas y carbapenem ha aumentado, sin embargo aún no se han desarrollado presentaciones tópicas de estos medicamentos. La resistencia a los antibióticos cambia constantemente y en nuestro país aún no se ha descrito para OMC.

El uso tópico de fluoroquinolonas en padecimientos oftalmológicos, específicamente en úlceras corneales, aumentó la resistencia bacteriana del 5% al 12% en un año (11). Se ha descrito que la falta de absorción sistémica tras la aplicación tópica de fluoroquinolonas y la capacidad de alcanzar altas concentraciones en odio medio son razones por las que el uso de antibiótico tópico produce poca resistencia antimicrobiana, sin embargo en los últimos años la resistencia antibiótica de las bacterias gram negativas ha incrementado notablemente a nivel mundial.

Aún no se ha descrito estudios de resistencia antibiótica a nivel genético y biofilms en OMC, por lo que el objetivo de este estudio es identificar las características moleculares presentan las bacterias Gram negativas resistentes a quinolonas aisladas de otorrea de pacientes con OMC, específicamente la identificación las mutaciones puntuales en los genes cromosomales *gyrA* y *parC*; y determinar la producción de biofilms de estas bacterias. Todo lo anterior con el propósito de identificar un factor de riesgo asociado a la falla al tratamiento médico.

Métodos

Estudio

Se realizó un estudio descriptivo observacional y transversal. Se estudiaron los cultivos de bacterias Gram negativas aisladas de pacientes con diagnóstico de OMC con otorrea provenientes del Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, durante el periodo de abril a junio de 2011. Se eliminaron muestras repetidas, muestras contaminadas y aquellas donde se presentaron fallas en el procesamiento.

Las muestras se obtuvieron de pacientes con diagnóstico de OMC, la identificación de las cepas se realizó en el Laboratorio Clínico, sección Microbiología, con el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 Plus (Siemens), así como la sensibilidad y resistencia que se realizó por el método de Concentración Mínima Inhibitoria, con el mismo sistema. Posteriormente las cepas serán almacenadas a -80°C en una suspensión de caldo infusión cerebro corazón-glicerol 50% hasta ser utilizadas (15-17).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con la técnica de tiocinato de guanidina descrita por Pitcher *et al.*, (1989). El ADN cromosomal fue utilizado para determinación de genes de resistencia a quinolonas amplificando los genes *gyrA* y *parC*, y determinar la presencia o ausencia de mutaciones puntuales para el gen *gyrA* en las posiciones: Ser-83-Leu; Asp-87-Asn ó Tyr; y para el gen *parC*: Ser-80-Arg ó Ile; Glu-84-Lys ó Val.

Para identificar el gen *gyrA* se llevó a cabo una PCR que amplificó un producto de 344 pb. Se utilizaron los iniciadores 5'-ctctcccagaccaaagaca-3' y 5'-tcacgaccgataccacagcc-3'.

Para identificar el gen *parC*, se realizó una PCR utilizando los iniciadores, 5'-aaacctgttcagcgccgcatt-3' y 5'-gtggtgccgtaagcaaa-3', para amplificar un fragmento de 188 pb.

Purificación de productos de amplificación y secuenciación de ADN

Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el sistema comercial QIAquick de acuerdo a las condiciones del fabricante. Cada producto amplificado fue secuenciado en ambos sentidos mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing, utilizando el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730. Las secuencias

de ambas cadenas de los productos de PCR fueron alineados, y se obtuvo una secuencia consenso. La secuencia de nucleótidos fue comparada con la base de datos del GenBank para buscar la homología y determinar la variante genética mediante el sistema Blastn.

Los porcentajes de similitud entre las secuencias fueron determinadas mediante el uso del National Center of Biotechnology Information (NCBI). La alineación se realizó por medio del programa Vector NTI (15-17).

Ensayo de producción de *Biofilms* en microplaca de 96 pozos

Del cultivo inicial se realizó una dilución de 1:100 en el medio BHI-TT y se tomaron 100µl, se transfirieron por triplicado a una microplaca de polivinil de 96 pozos de fondo en "U". Se incubaron a 37° durante 48 h, una vez transcurrido este tiempo se removieron las células planctónicas mediante decantación y se realizaron tres lavados sumergiendo la microplaca en agua destilada estéril. Posteriormente se adicionó 125µl de cristal violeta al 0.1% durante 10 min a temperatura ambiente. Después se removió el excedente de colorante mediante dos lavados. A la microplaca se le agregó 200µl de etanol al 95% durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se transfirió 125µl de etanol y la biopelícula teñida a otra microplaca estéril de fondo plano en donde se efectuó la lectura en espectrofotómetro a una densidad óptica de 630 nm de absorbancia, con la finalidad de evidenciar la formación de biofilm. Se incluyó como cepas control la *E. coli* DH5-α y *P. aeruginosa* 27853, se tomaron como referencia sus valores de producción de biopelícula, la *E. coli* DH5-α como productor débil y la *P. aeruginosa* 27853 como productor fuerte.

Todos los pacientes recibieron ciprofloxacino tópico como tratamiento y se les recomendó cuidados de oído seco, fueron reevaluados en un periodo de 4 a 6 semanas y se determinó clínicamente si hubo mejoría o recaída.

Estadística

Se realizó un análisis descriptivo.

Resultados

Se obtuvieron 12 aislamientos de bacterias Gram negativas provenientes de pacientes con el diagnóstico de OMC del Hospital General Dr. Manuel Gea González. En la tabla 1 se muestran las características demográficas de los pacientes con OMC.

La edad promedio de los pacientes evaluados fue 33 años, la mayoría fueron hombres (9 de 12 pacientes). En cuanto a los antecedentes de riesgo para presentar OMC, 2 pacientes refirieron padecer Diabetes Melitus, 2 pacientes Hipertensión Arterial Sistémica, 2 jóvenes presentaron secuelas de labio y paladar hendido, 4 pacientes con antecedente de hospitalizaciones en los últimos 2 años. De los antecedentes otológicos, llama la atención que todos los pacientes presentaron OMC no colestomatosa, de 4 de ellos patología bilateral y 5 con historia previa de OMC. Los antecedentes quirúrgicos otológicos más relevantes fueron en 3 pacientes la colocación de tubos de ventilación timpánica, 2 pacientes con antecedente mastoidectomía simple y posteriormente mastoidectomía de muro bajo en los oídos afectados.

Los 12 aislamientos correspondieron a 12 oídos; donde 5 aislamientos fueron identificados como *E. coli*, 5 como *P. aeruginosa* y 2 como *K. pneumoniae* (ver tabla 2), el 50% de las bacterias aisladas presentaron resistencia a ciprofloxacino. Todos los aislamientos de *E. coli* y un aislamiento de *K. pneumoniae* fueron resistentes a quinolonas, mientras que todas las *P. aeruginosa* y un aislamiento de *K. pneumoniae* fueron sensibles. En siete aislamientos (58%) se presentaron mutaciones en *gyrA* y en todos los aislamientos se encontró una mutación en *parC*. Las mutaciones de *gyrA* se localizaron en la posición 87 (Aspargina en lugar de Ácido aspártico) y 83 (Leucina en lugar de Serina), en las posiciones 82, 84 y 106 no se encontraron mutaciones. En cuanto a *parC*, todas las cepas aisladas presentaron una mutación en la posición 84 (Glicina en lugar de Ácido Glutámico) y en la posición 80 y 78 no se encontraron mutaciones (Ver figuras 1-4). Sobresale que en los pacientes con antecedente de hospitalizaciones en los últimos 2 años, las mutaciones en *gyrA* estuvieron presentes en el 75%, mientras que en los que negaron este antecedente las mutaciones se presentaron en el 50% de las cepas aisladas.

La producción de biopelícula se presentó en la mitad de los pacientes como débil, en comparación con la *E. coli* DH5- α . La formación de biofilm elevada, en comparación a la *P. aeruginosa* 27853,

se presentó sólo en dos aislamientos de *Pseudomonas* (que fueron sensibles a quinolonas pero los pacientes presentaron recaídas). La producción de biofilm fue mayor en los pacientes con recaídas (Figura 5 y 6 y tabla 3). La formación de biopelícula fue superior en el grupo de las *P. aeruginosa*. En resumen, la resistencia a quinolonas se presentó en el 50% de las bacterias aisladas (6 cepas) de otorreas de pacientes con OMC, de los pacientes con estas bacterias el 50% (3 pacientes) presentó mejoría clínica tras recibir ciprofloxacino tópico. En cuanto al grupo de pacientes que presentaron bacterias Gram negativas sensibles a quinolonas, sólo un paciente (16%) con una *P. aeruginosa* aislada presentó mejoría clínica, el cual no presentó enfermedades crónicas degenerativas, cirugías previas u OMC bilateral o previa y dentro de este grupo es el único que presentó formación de biopelícula débil (76%), no presentó mutaciones en *gyrA* y sólo una mutación en *parC*. El resto de los pacientes presentaron recaídas, es importante mencionar que estas bacterias fueron fuertes productoras de biofilm. (Ver tabla 4)

Discusión

Hasta el momento no existen estudios publicados sobre la correlación de la producción de biofilm, resistencia a quinolonas y presencia de genes de resistencia a quinolonas en otitis media crónica. En 1996 Altuntas *et al* publicaron un estudio llevado a cabo en Turquía sobre la susceptibilidad a ciprofloxacino de los microorganismos aeróbicos encontrados en OMC supurativa. Estudiaron a 127 pacientes que presentaban otorrea persistente por más de 6 meses u otorrea en el momento de la evaluación con antecedente de recurrencia previa en 3 ocasiones en los últimos 12 meses. El 40% de los microorganismos aislados fue *Pseudomonas* spp., (6.2% resistentes a quinolonas), 21% *Proteus* spp (2.9% resistentes a quinolonas), 19% *S. aureus* (10% resistentes a quinolonas), 7% *E. coli* (8.3% resistentes a quinolonas) y 7% *Klebsiella* spp, entre los principales (12). (Ver Tabla 5).

Recientemente Sun Kyu Lee *et al*, compararon la susceptibilidad antibiótica de la *P. aeruginosa* aislada de muestras de otorrea y de secreciones provenientes de otras partes del cuerpo (9). Observaron que tanto la *P. aeruginosa* de los oídos como la aislada de otras secreciones tienen baja susceptibilidad a ciprofloxacino, levofloxacino y tobramicina y presenta mayor susceptibilidad a amikacina, ceftazidimia, cefepime e imipenem. Es importante mencionar estos últimos medicamentos no están disponibles en presentaciones tópicas. El 41% de las cepas de *P. aeruginosa* fueron susceptibles a ciprofloxacino, la sensibilidad fue mayor para otros antibióticos que no tienen presentaciones tópicas (83% de amikacina, 43% gentamicina, 46% tobramicina, 77% cefepime, 72% piperacilina, 82% piperacilina-tazobactam, 96% imipenem, 38% levofloxacino y 67% aztreonam) (9). En nuestro estudio, el 100% de las *P. aeruginosa* fueron susceptibles a ciprofloxacino.

Seung Geun Yeo y cols en 2007 publicaron un trabajo sobre la bacteriología de la OMC supurativa. Encontraron que el crecimiento bacteriano del 31% correspondió a *P. aeruginosa* (61% resistentes a ciprofloxacino), 24% a *S. aureus* meticilino resistente, 16% a *S. aureus* meticilino sensible y 11% a *S. coagulasa* negativo. (13)

En un estudio realizado en África, Van Hasselt *et al*, demostraron que el desarrollo de resistencia después del tratamiento con ofloxacino en pacientes con otitis media crónica no es la mayor causa de falla del tratamiento, sino la recolonización por otras bacterias. En este estudio la *P. aeruginosa* se aisló con mayor frecuencia. Los oídos en los que persistió la otorrea posterior al tratamiento tópico se atribuyó la persistencia a la reinfección por enterobacterias (11). Al comparar estos resultados con lo que encontramos en este estudio, es probable que la falla del tratamiento en esta población africana se debió a la alta producción de biofilm, muy similar a lo que nosotros presentamos en nuestros resultados.

En un estudio publicado por Sun Kyu Lee *et al* en 2010 demostró que el uso de quinolonas tópicos y limpieza frecuente es eficiente para el control de otorrea, sin embargo este estudio sólo se reporta la susceptibilidad antibiótica y no presenta una correlación clínica, tampoco muestra el seguimiento de los pacientes y los factores de riesgo de los pacientes como Diabetes Mellitus, inmunodeficiencias, antecedentes de cirugías otológicas previas, entre otras (9).

Supuyaphun *et al*, evaluaron el tratamiento tópico con ofloxacino en pacientes con otitis media crónica supurativa y otitis externa, demostró que de 103 oídos sólo 2 presentaron *Pseudomonas* resistentes a quinolonas, sin embargo ambos casos tuvieron una resolución clínica de la infección. En este estudio la resistencia bacteriana se definió con la presencia de una concentración mínima inhibitoria mayor de 8 mg/ml, sin embargo se sabe que los niveles de concentración mínima inhibitoria tienen un valor limitado al evaluar el uso de antibióticos tópicos, ya que las concentraciones son mucho mayores que el uso de antibióticos sistémicos. La tasa de éxito clínico fue del 92% para otitis media crónica supurativa (11).

La resistencia que encontramos en las cepas aisladas de pacientes con OMC se comparó con lo reportado en nuestro hospital sobre gérmenes nosocomiales. *E. coli* presenta una resistencia del 72%, *Pseudomonas* del 50% y la *K. pneumoniae* del 50%, la resistencia de los aislamientos de mientras que en nuestros resultados se observa una resistencia total a quinolonas de *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron similares a los aislamientos de infecciones nosocomiales, *Pseudomonas* es más sensible en nuestro medio (19).

El 50% de las bacterias aisladas en este estudio son fuertes productoras de biopelícula, a diferencia de lo reportado por Saunders en 2011, quien encontró que sólo el 14% de las bacterias aisladas en pacientes con OMC no colestomatosas son productoras de biofilms (20). Mientras que Burmolle en 2009 reporta una evidencia del 83% de biofilm en niños con OMC y del 80% en adultos con cirugías otológicas por OMC (21). La presencia de biofilms sugiere la persistencia de bacterias patógenas a pesar del tratamiento médico que provoca recaídas, sin embargo el rol del biofilm se debe estudiar más.

Existen pocos antibióticos tópicos para el oído, ciprofloxacino y la combinación de polimixina B y neomicina son los principales. Como se mencionó anteriormente la ciprofloxacina alcanza concentraciones muy altas en el oído y esto participa en una buena respuesta terapéutica. La polimixina B es un antibiótico altamente efectivo para infecciones provocadas por bacterias Gram negativas, debido a su efecto bactericida y a su acción como detergente catiónico. Este antibiótico es de utilidad en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias Gram negativas que son productoras de biofilm, como *P. aeruginosa*. En base a lo anterior, el uso tópico de polimixina B con neomicina puede ser una buena opción terapéutica para los pacientes con OMC en cuya otorrea se aisló *P. aeruginosa*. Esto con el propósito de erradicar por completo las bacterias causantes y evitar así las recaídas.

Conclusiones

Finalmente, a pesar de ser una muestra pequeña, con los resultados obtenidos podemos sugerir que:

1. Es importante tomar cultivos de la otorrea en pacientes con OMC ya que la especie aislada puede orientar la elección del antibiótico tópico.
2. En los pacientes en que se aísla *E.coli* aún siendo resistente a ciprofloxacino en el perfil de susceptibilidad y confirmándose la presencia de gene de resistencia *gyrA*, los pacientes presentaron mejoría clínica concordando con lo propuesto en la literatura que las altas concentraciones de ciprofloxacino aún en cepas resistentes pueden llevar a la cura clínica.
3. Cuando la OMC es causada por *P. aeruginosa*, especie que puede producir biofilm, aún cuando sea susceptible a quinolonas puede no presentar cura clínica bajo este tratamiento antibiótico.
4. Aún cuando el antibiograma reporte sensibilidad a quinolonas esto no excluye la presencia de mutaciones asociadas a resistencia pero como son de bajo nivel no se expresan en el perfil de susceptibilidad como es en el caso de la *P. aeruginosa* (ver tabla 4).

Con estas observaciones podríamos concluir que es necesario un estudio aleatorizado ciprofloxacino vs polimixina, en pacientes con OMC con gérmenes productores de biofilm, donde se haga un análisis multivariado de las otras variables (Diabetes Mellitus, malformaciones craneofaciales y hospitalizaciones previas) que podrían impactar en la cura clínica.

Referencias.

1. Bryon J Bailey, Jonas T Johnson. Head and Neck Surgery: Otolaryngology. EUA, 4 ed, Lippincott Williams and Wilkins, 2006.pp 2041-2093
2. David S. Haynes, John Rutka, Michael Hawke, Peter S. Roland. Ototoxicity of Otological Drops An Update . Otolaryngol Clin N Am 2007; 40: 669–683
3. Canalis RF, Lambert PR. The Ear Comprehensive Otolaryngology. EUA, Lippincott Williams and Wilkins, 2000. Pp 409-465
4. Sophie Couzos, Traven Lea, Reinhold Mueller, Richard Murray and Margaret Culbong. Effectiveness of otological antibiotics for chronic suppurative otitis media in Aboriginal children: a community-based, multicentre, double-blind randomised controlled trial. MJA 2003; 179: 185–190
5. Lundman L, Santi PA, Morizono T, Harada Y, Juhn SK, Bagger-Sjoberg D. Inner ear damage and passage through the round window membrane of pseudomonas aeruginosa exotoxin A in chinchilla model. Ann Otol Rhinol Laryngol 1992; 101:437-444
6. Fairbanks DNF. Antimicrobial Therapy in Otolaryngology— Head and Neck Surgery. EUA, The American Academy of Otolaryngology— Head and Neck Surgery Foundation, 2007. 13 ed pp 15-29
7. Ohyama M, Furuta S, Ueno K. Ofloxacin solution in patients with otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999;125: 337-40.
8. James E. Saunders, Ryan P. Raju, John L. Boone, Nathan W. Hales, Wayne E. Berryhill. Antibiotic resistance and otomycosis in the draining ear: culture results by diagnosis. Am J Otolaryngology head and neck medicine and surgery 2010 en prensa
9. Sun Kyu Lee, Mi Suk Lee, Su Young Jung, Jae Yong Byun, Moon Suh Park, MD, and Seung Geun Yeo. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from otorrhea of chronic suppurative otitis media patients. Otolaryngology–Head and Neck Surgery 2010; 143, 500-505
10. Arias-Mora José Manuel, Herrera-Ortiz Antonio, del Castillo-Gaxiola Blanca Olivia. Estudio comparativo entre ciprofloxacina vs. neomicina-polimixina-fluocinolona por vía ótica en pacientes con otitis media crónica y secuelas. An Orl Mex 2004; 49(2): 31-4
11. Peter C. Weber, Peter S. Roland, Maureen Hannley, Rick Friedman, Spiros Manolidis, Greg Matz, Fred Owens, Leonard Rybak, Michael G. Stewart. The development of antibiotic resistant organisms with the use of otological medications. Otolaryngol Head Neck Surg 2004;130:S89-S94.
12. A Altunas, A Asln, N Eren, A Unal, Y Nacla. Scsceptibility of microorganisms isolated from chronic suppurative otitis media to ciprofloxacín. Eur Arc Otorhinolaryngol 1996, 253:364-366
13. Seung Geun Yeo, Dong Choon Park, Seok Min Hong, Chang Il Cha, Myung Gu Kim. Bacteriology of chronic suppurative otitis media a multicenter study. Acta Oto-Laryngologica, 2007; 127: 1062_1067

14. P.C. Appelbaum, P.A. Hunter. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future Perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000; 16: 5–15
15. Moreno, E., Prats, G., Sabate, M., Perez, T., Johnson R. J. and Andreu, A. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57:204-211.
16. Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50:649-653.
17. Houdouin, V., Bonacorsi, S., Bidet, P., Bingen-Bidois, M., Barraud, D. and Bingen, E. Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 58:748-751.
18. Michael Robert Lee, Karen Sue Pawlowski, Amber Luong, Alexis Dorian Furze, Peter Sargent Roland. Biofilm presence in humans with chronic suppurative otitis media. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 2009; 141: 567-571
19. Boletín epidemiológico, Comité para la Detección y Control de Infecciones Nosocomiales, Subdirección de Epidemiología y Registros Médicos. 2011 (junio).
20. James Saunders, Michael Murray, Anthony Alleman. Biofilms in chronic suppurative otitis media and cholesteatoma: scanning electron microscopy findings. *American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery* 2011; 32: 32–37
21. Mette Burmølle, Trine Rolighed Thomsen, Mustafa Fazli, Irene Dige, Lise Christensen, Preben Homøe, et al. Biofilms in chronic infections -a matter of opportunity- monospecies biofilms in multispecies infections. *Immunol Med Microbiol* 2010; 59: 324–336

Tablas

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes con OMC

Edad	Género	Oído	Microorganismo	DM	HAS	Hospitalizaciones recientes	SLPH	Historia de OMC	OMC bilateral	TVT	MS	MMB	Antibióticos previos
17	M	I	<i>E. coli</i>				X	X	X	X			
49	M	D	<i>E. coli</i>	X	X								Ciprofloxacino (T)
79	M	I	<i>E. coli</i>		X								Amoxicilina con clavulanato (S)
8	M	D	<i>E. coli</i>			2 años		X	X		X	X	Polimixina B y neomicina (T), Rifampicina (S)
39	M	I	<i>K. pneumoniae</i>	X		1 mes		X					Ciprofloxacino (T)(S)
46	F	D	<i>K. pneumoniae</i>			1 mes							Polimixina B y neomicina (T)
67	F	I	<i>P. aeruginosa</i>										
8	M	D	<i>P. aeruginosa</i>										Cefuroxima (S)
15	F	D	<i>P. aeruginosa</i>										Cefalexina (S), Amoxicilina con
23	M	D	<i>P. aeruginosa</i>				X	X	X	X			
33	M	D	<i>P. aeruginosa</i>			1 mes		X	X	X	X	X	Polimixina B y neomicina (T), Ciprofloxacino (T)
18	M	D	<i>P. aeruginosa</i>										

n=12

F: femenino, M: masculino, D: derecho, I: izquierdo, DM: Diabetes Mellitus, HAS: Hipertensión

Arterial Sistémica, SLPH: secuelas de labio y paladar hendido, TVT: tubo de ventilación timpánica,

MS: mastoidectomía simple, MMB: mastoidectomía de muro bajo, T: tópico, S: sistémico

Tabla 2. Bacterias aisladas

	Resistentes		Sensibles	
	No. de pacientes	Mejoría clínica	No. de pacientes	Mejoría clínica
<i>E. coli</i>	5 (100%)	3/5	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	5 (100%)	1/5
<i>K. pneumoniae</i>	1 (50%)	0	1 (50%)	0

n=12

Tabla 3. Promedio de producción de biofilm por bacterias Gram negativas

	Evolución del paciente	
	Mejoría	Recaída
Resistentes	61% (3)	113% (3)
Sensibles	76% (1)	213% (5)

n=12

Tabla 4. Características de las bacterias Gram negativas aisladas de otorrea de pacientes con OMC y su desenlace

Cepa	Microorganismo	Ciprofloxacino MIC (mcg/ml)	Interpretación	Mutaciones en <i>gyrA</i>	Mutaciones en <i>parC</i>	Producción de biofilm (%)	Desenlace
548	<i>E. coli</i>	≥2	R	2	1	55	Mejoría
720	<i>E. coli</i>	≥2	R	2	1	58	Mejoría
784	<i>E. coli</i>	≥2	R	2	1	71	Mejoría
638	<i>E. coli</i>	≥2	R	2	1	77	Mejoría
631	<i>E. coli</i>	≥2	R	0	1	94	Recaída
660	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	S	2	1	323	Recaída
458	<i>K. pneumoniae</i>	≥2	R	2	1	84	Recaída
684	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	S	0	1	132	Recaída
792	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	S	0	1	161	Recaída
819	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	S	2	1	219	Recaída
609	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	S	0	1	222	Recaída
503	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	S	0	1	312	Recaída

n=12

R: resistencia, S: sensibilidad

Tabla 5. Comparación de bacterias aisladas y la resistencia a quinolonas en estudios previos.

	Turquía, 1996 (12)		Corea, 2007 (13)		México, 2011	
	Aislados	Resistencia	Aislados	Resistencia	Aislados	Resistencia
<i>Pseudomonas spp</i>	21%	6.2%	31%	61%	41%	0%
<i>E. coli</i>	7%	8.3%	NR	NR	41%	100%
<i>Klebsiella spp</i>	7%	NR	NR	NR	16%	50%

Figuras

Figura 1. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación del gen *gyrA*. Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 kb plus; Carriles 2 al 8: Muestras clínicas

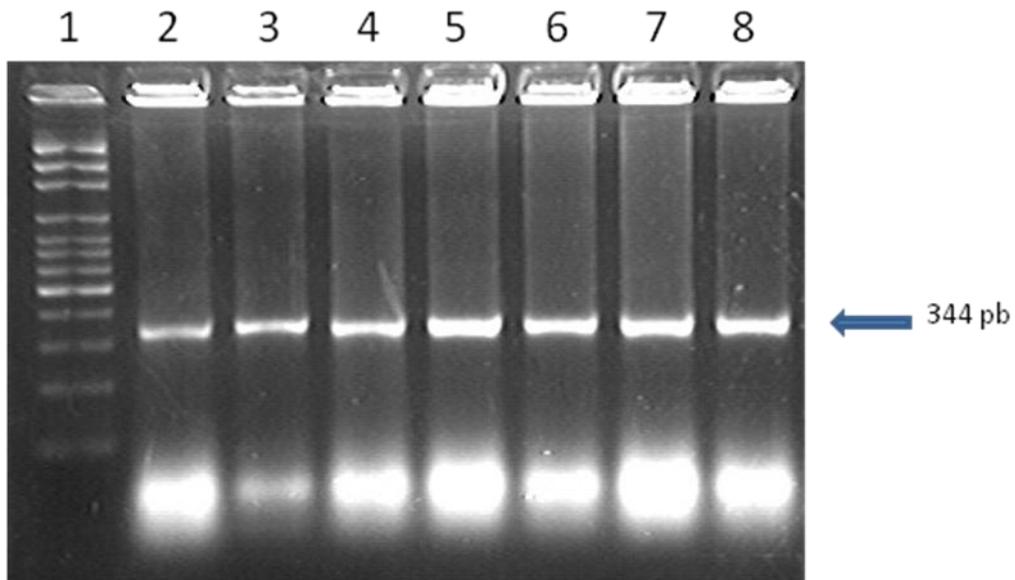


Figura 1. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación del gen *gyrA*. Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 kb plus; Carriles 2 al 8: Muestras clínicas

Figura 2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación del gen *parC*

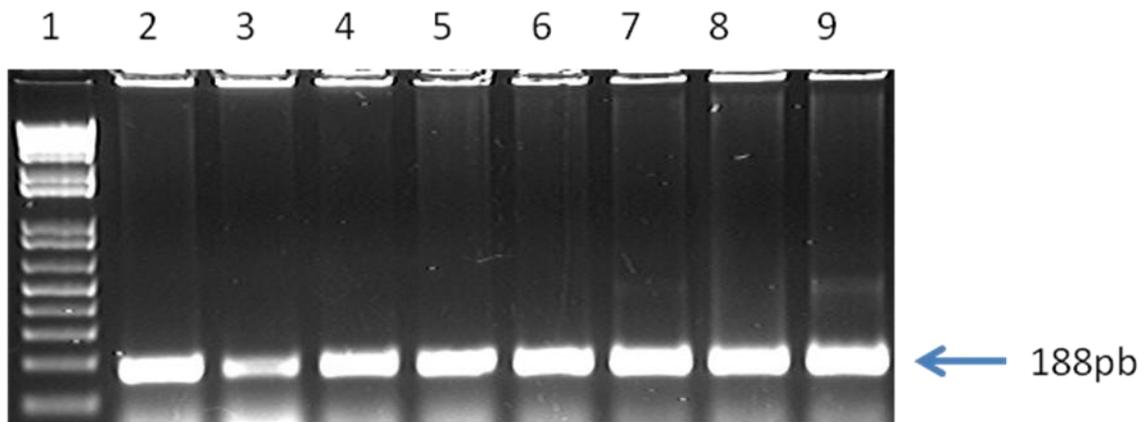


Figura2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación del gen *parC*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb plus; Carriles 2 al 8: muestras clínicas

Figura 3. Secuencia de aminoácidos de la región amplificada del gen *gyrA*; Las flechas localizan los puntos de mutación.

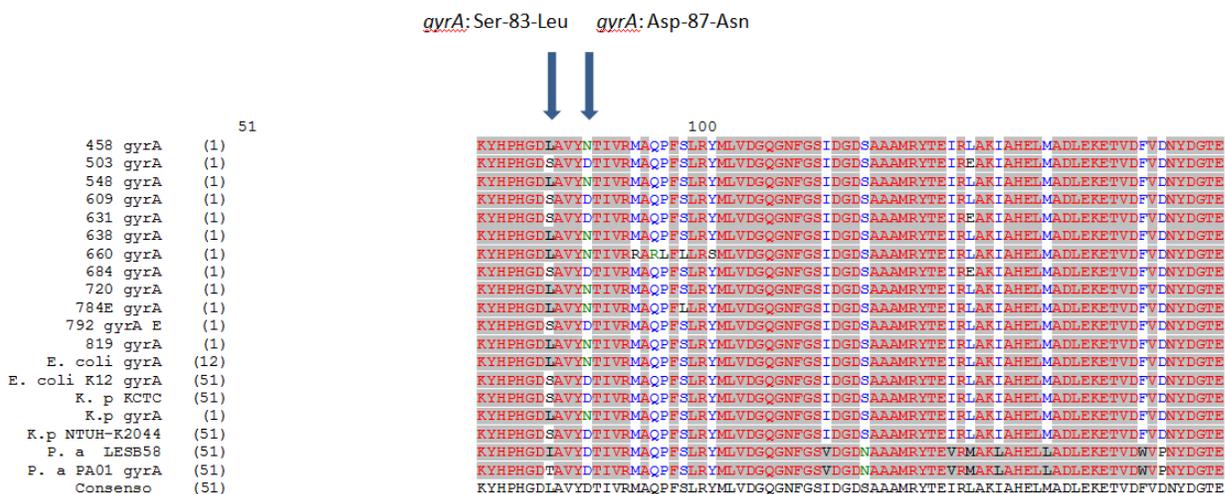


Figura 5. Imagen a la fuerte producción de biofilm por *P. aeruginosa*

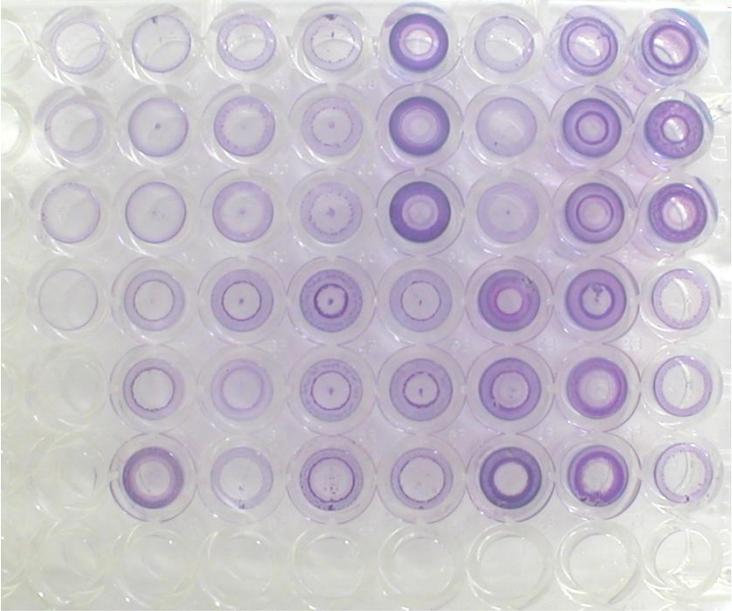
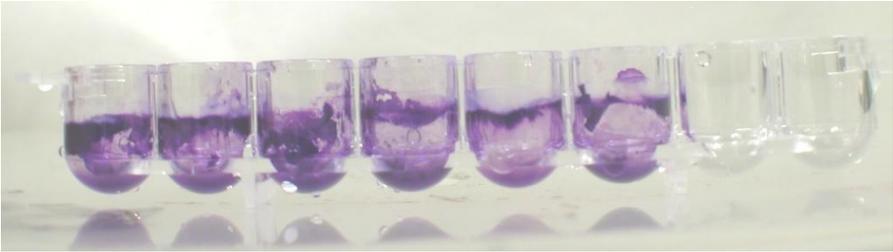


Figura 6. Gráfica sobre la producción de Biofilm de las bacterias Gram negativas aisladas de los pacientes con OMC

