



Facultad de Medicina



**Presencia de Bacterias Productoras de Biofilm en Tejido Amigdalino de
Pacientes Pediátricos con Faringoamigdalitis de Repetición**

**QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y
CIRUGIA DE CABEZA Y CUELLO**

PRESENTA EL DR. GALO SANTIAGO SOBERON MARMISSOLLE DAGUERRE

**Directores de tesis: Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar
Dr. Rigoberto Hernández Castro**

México., D.F.

Julio 2014



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 y en la Sección de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello bajo la Dirección del Dr. Hector Manuel Prado Calleros.

Este trabajo de Tesis con No. 1922-2014, presentado por el alumno Galo Santiago Soberón Marmissolle Daguerre se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar y Dr. Rigoberto Hernandez Castro y la División de Enseñanza a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez con fecha del 24 de julio del 2014 para su impresión final.



División de Enseñanza
Dr. Octavio Sierra Martínez



Tutor principal
Dr Gerardo Arturo Bravo Escobar



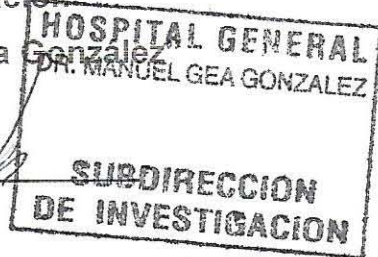
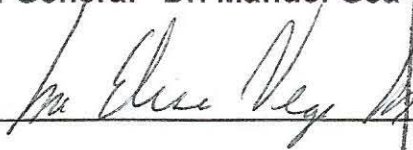
Tutor Principal
Dr. Rigoberto Hernandez Castro

Autorizaciones

Dra. María Elisa Vega Memije

Subdirección de Investigación

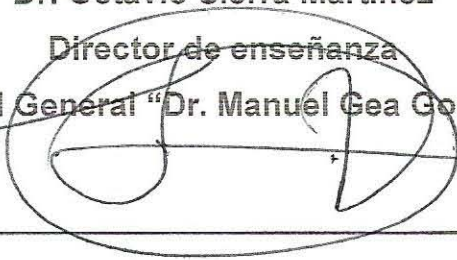
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dr. Octavio Sierra Martínez

Director de enseñanza

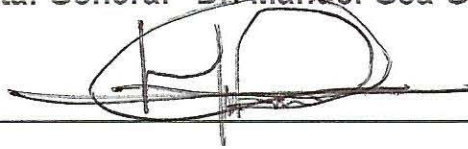
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dr. Hector 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

Medico 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"

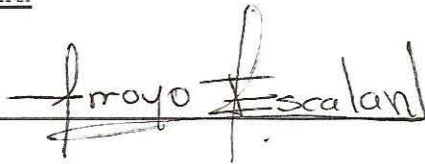


Presencia de Bacterias Productoras de Biofilm en Tejido Amigdalino de
Pacientes Pediátricos con Faringoamigdalitis de Repetición

Colaboradores:

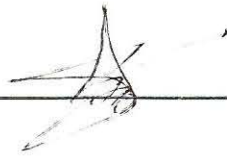
Nombre: Q.C. Sara Arroyo Escalante, Departamento de Biología Molecular e
Histocompatibilidad

Firma: _____



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

Firma: _____



INDICE

Glosario	7
Relación de figuras y tablas	8
Resumen	9
Abstract	10
1. Introducción	11
2. Antecedentes	11
3. Marco de Referencia	14
4. Planteamiento del problema.....	15
5. Justificación	15
6. Objetivos principales y secundarios	16
7. Hipótesis.....	16
8. Diseño	16
9. Materiales y Método	17
a) Universo de estudio.....	17
b) Tamaño de la muestra.....	17
c) Criterios de selección.....	17
d) Definición de variables.....	18
e) Descripción de procedimientos.....	18
10. Validación de datos	20
11. Presentación de Resultados	20
12. Resultados	20
13. Discusión	29
14. Conclusiones.....	30
15. Consideraciones éticas	31
16. Referencias bibliográficas	31
17. Anexos	34

GLOSARIO

Biofilm: comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte (dispositivos médicos) o un tejido vivo.

Espectrofotómetro: instrumento que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones y la concentración o reacciones químicas que se miden en una muestra.

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Variables Principales.

Tabla 2. Datos demográficos y generales.

Tabla 3. Antibiograma de cepas aisladas.

Grafica 1. Aislamientos bacterianos de muestras de pacientes con faringoamigdalitis de repetición.

Grafica 2. Porcentaje de sensibilidad y resistencia a antibióticos.

Figura 1-8. Detección cualitativa de biofilm en agar rojo congo muestra 1-8.

Figura 9-10. Producción de biofilm en placas de poliestireno teñida con cristal violeta al 0.1%.

Figura 11. Placa fondo plano para lectura con espectrofotómetro OD 630.

Grafica 3. Producción de biofilm en placa de poliestireno medida por espectrofotometría OD₆₃₀.

Grafica 4. Tipo de producción de biofilm medido por espectrofotometría OD₆₃₀.

Grafica 5. Porcentaje de producción de biofilm por muestra, mayor a cepa de control basal.

RESUMEN

Introducción: La faringoamigdalitis de repetición y la hipertrofia amigdalina se cree están relacionadas por bacterias productoras de biofilm. Las infecciones crónicas causadas por bacterias productoras de biofilm se distinguen por una mala respuesta al tratamiento antibiótico. El tratamiento quirúrgico (amigdalectomía) de la faringoamigdalitis de repetición conlleva los riesgos relacionados al mismo así como un impacto psicológico y económico al paciente y los padres. Estudiar la presencia de biofilm, y en el futuro, su tratamiento, en amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis de repetición representa la base para buscar nuevas alternativas de tratamiento más seguras y con menor impacto económico.

Objetivos: Mediante este estudio se determinó la presencia de bacterias productoras de biofilm en tejido amigdalino de pacientes pediátricos postoperados de amigdalectomía por faringoamigdalitis de repetición en la División de Otorrinolaringología del Hospital Dr. Manuel Gea González.

Métodos: La identificación de bacterias productoras de biofilm se realizó mediante técnicas indirectas por método cualitativo (producción en agar rojo Congo) y cuantitativo (producción de biofilm en placa de poliestireno), y lectura mediante espectrofotometría OD₆₃₀ de las placas de poliestireno.

Resultados: Se estudiaron las muestras de 8 pacientes pediátricos postoperados de amigdalectomía por faringoamigdalitis de repetición. Se aislaron un total de 8 cepas bacterianas de las cuales 6 cepas correspondieron a *Staphylococcus aureus*, 1 cepa a *Serratia mercensens* y 1 cepa a *Enterococcus faecalis* se observó que todas las cepas mostraron sensibilidad a los antibióticos probados. Con respecto a los resultados del método cualitativo obtenidos en el Agar Rojo Congo se observó producción de biofilm en todas las cepas cultivadas. Por método cuantitativo (placas poliestireno y espectrofotometría OD₆₃₀) el 75% de los casos se encontraron bacterias altas productoras de biofilm y en un 25% con producción intermedia.

Conclusiones: Mediante este estudio se comprobó la presencia de bacterias productoras de biofilm en pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición postoperados de amigdalectomía. Uno de los primeros trabajos que reafirma mediante técnicas indirectas la presencia de bacterias productoras de biofilm en este grupo de pacientes por lo que sienta las bases para realizar estudios de tratamiento para la erradicación de las mismas.

Abstract

Introduction: It is believed that recurrent acute tonsillitis and tonsillar hypertrophy are related to biofilm-producing bacteria. Chronic infections caused by biofilm-producing bacteria are characterized by having a poor response to medical treatment. Surgical treatment (Tonsillectomy) of recurrent acute tonsillitis and tonsillar hypertrophy entails risks itself and also has an economic and psychological impact on patients and parents. Studying the biofilm presence and i in the tonsils of patients suffering from recurrent acute tonsillitis and tonsillar hypertrophy represents the foundation for searching new and safer treatment options with less economic impact.

Objective: Determine the presence of biofilm-producing bacteria in tonsillar tissue in post surgical pediatric patients who underwent tonsillectomy as a result of recurrent acute tonsillitis at Manuel Gea González Hospital, Division of Otolaryngology.

Methods: Biofilm-producing bacteria identification was performed by using indirect techniques with a qualitative method, (production agar red congo) and quantitative method (biofilm production in polystyrene plaque) and reading through spectrophotometry 630OD.

Results: Samples of 8 post surgical pediatric patients who underwent a Tonsillectomy as a result of recurrent acute tonsillitis were studied. Eight bacterial strains out of which, 6 corresponded to *Staphylococcus aureus*, 1 strain to *Serratia mercensens* and 1 strain to *Enterococcus faecalis*. It was observed that all strains showed sensitivity to antibiotics tested.

With respect to qualitative method outcomes obtained in Agar Red Congo, biofilm production was observed in all strains cultured, Through the quantitative method (polystyrene plaques and spectrophotometry OD 630) in 75% of cases strong biofilm-producing bacteria were found, and 25% intermediate.

Conclusions: Trial demonstrated the presence of biofilm-producing bacteria in pediatric patients with recurrent acute tonsillitis who underwent Tonsillectomy.

This is one of the first research works that confirm, by using indirect techniques, the presence of biofilm-producing bacteria in this group of patients, therefore it sets the foundation to perform treatment trials in order to eradicate them.

1. Introducción

La faringitis aguda viral y bacteriana se encuentra dentro de las primeras causas de atención médica. La faringoamigdalitis de repetición y la hipertrofia amigdalina se manifiesta por varios grados de obstrucción de vía aérea en niños asociado con múltiples complicaciones como alteraciones obstructivas del sueño, déficit de atención con hiperactividad, alteraciones del desarrollo neurocognitivo, enuresis, falla de crecimiento, complicaciones cardiopulmonares. La hipertrofia amigdalina es la principal indicación de amigdalectomía en Estados Unidos. Aparte de las complicaciones quirúrgicas, también hay un impacto psicológico y económico secundario al procedimiento quirúrgico.

La faringoamigdalitis de repetición y la hipertrofia amigdalina se cree están relacionadas por bacterias resistentes productoras de beta-lactamasas y biofilm. Los procesos infecciosos crónicos se asocian a bacterias productoras de biofilm como en la faringoamigdalitis de repetición. Se distinguen por una mala respuesta al tratamiento antibiótico ya que no se logra eliminar por completo a la bacteria. Existen pocos trabajos de investigación sobre la presencia de biofilm en pacientes con faringoamigdalitis de repetición.

2. Antecedentes

La faringitis aguda es diagnosticada en 11 millones de pacientes en el departamento de urgencias y servicios ambulatorios en Estados Unidos cada año. La mayoría de los episodios son virales (adenovirus, parainfluenza, virus sincicial respiratorio, herpes simple, influenza A y B, virus Epstein Barr). El agente bacteriano que más comúnmente causa amigdalitis bacteriana es *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A, otros organismos aeróbicos reportados son *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus epidermidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Hemophilus parainfluenza*, *Neisseria spp.* *Lactobacillus spp.*, *Eikenella corrodens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* y anaerobios (*Bacteroides spp.*, *Petococcus spp.*, *Peptoestreptococcus spp.*, *Actinomycosis spp.*, *Eubacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, y *Prevotella spp.*). (1)

La infección por *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A representa del 15-30% de los casos con faringitis aguda en niños. La faringitis aguda tiene un pico de incidencia entre los 5 y 6 años de edad. Se manifiesta con faringodinia, malestar general, fiebre, odinofagia, disfagia, otalgia, cefalea y adenopatías cervicales. A la exploración física se observa resequedad de mucosas, amígdalas eritematosas con exudado y aumentadas de tamaño, así como petequias en paladar. El diagnóstico es principalmente clínico, aunque los signos y síntomas son comunes a otros agentes etiológicos por lo que en población pediátrica se recomienda realizar una prueba rápida y un exudado faríngeo. La prueba rápida para la detección de antígenos tiene una sensibilidad del 70% y una especificidad del 90-99% para la detección de infección por estreptococo B hemolítico del grupo A por lo que en caso de ser negativo el resultado se deberá confirmar con un exudado faríngeo. El exudado faríngeo tiene una sensibilidad del 90 al 95%. (1)

Generalmente el tratamiento está indicado contra bacterias aeróbicas que se asocian a la faringitis (principalmente estreptococo beta hemolítico del grupo A). El antibiótico de elección es la penicilina. Se han encontrado otros patógenos anaerobios como *Bacteroides* productores de B-lactamasas por lo que en caso de falla del tratamiento se deberán utilizar penicilinas con un inhibidor de la B-lactamasa.

Las complicaciones de faringitis aguda se dividen en supurativas (absceso periamigdalino y parafaríngeo) y no supurativas (escarlatina, fiebre reumática y glomerulonefritis postestreptocócica). (2)

La faringoamigdalitis de repetición se define como 6 o más episodios de faringitis aguda en 1 año, 5 episodios al año por 2 años consecutivos o tres episodios al año por 3 años consecutivos. Se relaciona con hipertrofia amigdalina que se manifiesta por varios grados de obstrucción de vía aérea en niños asociado con múltiples complicaciones como alteraciones obstructivas del sueño, déficit de atención con hiperactividad, alteraciones del desarrollo neurocognitivo, enuresis, falla de crecimiento, complicaciones cardiopulmonares. La hipertrofia amigdalina es la principal indicación de amigdalectomía en Estados Unidos. (2)

Se estima que a nivel mundial 44 a 120 de cada 10,000 niños menores de 15 años se someten a adenoamigdalectomía. Aparte de las complicaciones quirúrgicas, también hay un impacto psicológico y económico secundario al procedimiento quirúrgico. La terapia médica parece ser una opción más viable y segura. (3)

La faringoamigdalitis de repetición y la hipertrofia amigdalina se cree están relacionadas por bacterias resistentes productoras de B-lactamasas y biofilm.(4)

Los biofilm o biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte (dispositivos médicos) 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. Puede tener materiales no celulares como cristales de minerales, particular corrosivos, componentes hemáticos. La unión de los microorganismos a las células depende de las características hidrofílicas de la célula, presencia de fimbrias y flagelos y la producción de exopolisacáridos. La matriz de exopolisacáridos está formada por ácido D-glucurónico, D-galacturónico, ácido manurónico, ácido teicóico, proteínas, agua. La arquitectura del biofilm es heterogénea en tiempo y espacio, en constante cambio por los procesos externos e internos. Se ha demostrado que diversos agentes patógenos bacterianos interactúan con otros agentes y se asocian como *Legionella pneumophila*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae*, entre otros.(5)

Los procesos infecciosos crónicos se asocian a bacterias productoras de biofilm como en la faringoamigdalitis de repetición. 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 500 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 exopolisacarídica del biofilm. Estas bacterias evaden los

mecanismos inmunitarios del huésped, convirtiéndose en colonizadores persistentes y fuentes para producir infecciones crónicas. (3)

Las infecciones crónicas relacionadas a la presencia de biofilm son altamente resistentes a los tratamientos sistémicos antibióticos convencionales. La terapia con medicamentos tópicos (mupirocina, violeta de genciana, N acetil cisteína) y los probióticos (*Lactobacillus casei*), son un probable tratamiento prometedor en un futuro. (6)

3. Marco de Referencia

Los biofilm se han identificado en la mucosa del oído medio en pacientes pediátricos que sufren de otitis media crónica, en pacientes con rinosinusitis y el en tejido amigdalino y adenoideo. (7)

Al Mazrou y colaboradores en 2008 (3) demostraron en un estudio prospectivo de pacientes pediátricos que se sometieron a adenoamigdalectomía (76 pacientes) por problemas obstructivos de la vía aérea o infecciones recurrentes la presencia de biofilm en el 61% de los pacientes mediante microscopía electrónica de barrido. En el 85% de los pacientes tratados por infección se detectaron presencia de biofilm y en el 41% de los tratados por problemas obstructivos.

Chole RA y colaboradores en 2003 (4) demostraron en un estudio prospectivo la presencia de biofilm mediante microscopía electrónica en criptas de amígdalas con infecciones crónicas obtenidas por amigdalectomía en el 76% de 19 pacientes.

Woo JH y colaboradores en 2012 (8), en un estudio controlado demostraron la presencia de biofilm mediante microscopía electrónica de barrido en el 80% de pacientes (20 pacientes) con faringoamigdalitis de repetición en comparación el grupo control (20 controles) donde solo se encontró en el 45% de los casos. (P<0.05).

Díaz RR y colaboradores en 2011 (9) demostraron la relación entre la hipertrofia adenoidea y amigdalina, la presencia de adenomegalias en cuello y el síndrome de apnea obstructiva del sueño con la presencia de biofilm en el tejido amigdalino. De un total de 36 pacientes, entre 1 y 6 años de edad, sometidos a adenoamigdalectomía por hipertrofia amigdalina, adenoidea, y problemas

respiratorios del sueño el 77.28% tenían presencia de biofilm en amígdalas demostrado mediante microscopia electrónica.

Stoodley P y colaboradores en 2009 (10) demostraron la presencia de biofilm mediante microscopía confocal y microelectrodo en litos amigdalinos los cuales se forman y están asociados a infecciones crónicas dentro de este tejido. De un total de 19 pacientes, se encontraron biofilm en el 100% de los litos amigdalinos.

Actualmente existen diversos métodos en el área médica para detectar la producción de biofilm. Existen métodos cuantitativos y cualitativos. El abordaje cuantitativo más versátil y no destructivo es la microscopia electrónica de laser confocal, la cual es comparable con el uso de microplacas y detección de biofilm mediante espectrofotometría (cultivo tisular). Otro método cuantitativo es la realización de PCR para detección de genes productores de biofilm. Los métodos cualitativos incluyen el test de adherencia a tubo y medio rojo Congo. El método de cultivo y posteriormente detección por espectrofotometría es el estándar de oro para el estudio de biofilm en laboratorios. (11)(12)

4. Planteamiento del problema

¿Hay presencia bacterias productoras de biofilm en tejido amigdalino de pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición?

5. Justificación

El tratamiento quirúrgico (amigdalectomía) de la faringoamigdalitis de repetición conlleva los riesgos relacionados al mismo así como un impacto psicológico y económico al paciente y los padres. Estudiar la presencia de biofilm, y en el futuro, su tratamiento, en amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis de repetición representa la base para buscar nuevas alternativas de tratamiento más seguras y con menor impacto económico.

Las infecciones respiratorias agudas ocupan en México el primer lugar dentro de las causas de morbilidad y como demanda de atención médica entre los menores de 5 años. Se estima que tres de cada cuatro consultas que se otorgan en los

servicios de salud para atender enfermedades infecciosas, corresponden a padecimientos respiratorios agudos. (13)

El 99% de los casos que se notifican, afectan vías respiratorias superiores y solamente el 1% a vías respiratorias inferiores, como la neumonía y bronconeumonía. Se ubican asimismo, entre las diez principales causas de defunción en la población general y dentro de las tres primeras causas de muerte entre los menores de 5 años. (13)

Las complicaciones relacionadas con la amigdalectomía son dolor, hemorragia, obstrucción de vía aérea, edema pulmonar postoperatorio, insuficiencia velofaríngea, estenosis nasofaríngea, y muerte. La incidencia de complicaciones quirúrgicas serias es de 15 casos por 1000. La hemorragia postoperatoria es la complicación seria más frecuente, se presenta del 0.5 al 10% de los casos. (2)

6. Objetivo Principal y Secundarios

Objetivo principal

Determinar la presencia de bacterias productoras de biofilm en tejido amigdalino de pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición.

Objetivos secundarios

Determinar resistencia a antimicrobianos de bacterias productoras de biofilm en tejido amigdalino de pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición.

7. Hipótesis

No requiere por tratarse de un estudio descriptivo

8. Diseño

Descriptivo, abierto, observacional, transversal y prolectivo.

9. Materiales y Método

A) Universo de estudio: Tejido amigdalino obtenido de pacientes pediátricos operados por el servicio de Otorrinolaringología y Cirugía y Cabeza y Cuello del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por faringoamigdalitis de repetición.

B) Tamaño de la muestra:

Se procesó el tejido amigdalino que cumplió con los criterios de selección en el periodo comprendido entre Junio a Julio del 2014.

Tamaño aproximado de la muestra para este periodo: 8 muestras.

C) Criterios de selección

Criterios de inclusión:

Tejido amigdalino de pacientes pediátricos tratados quirúrgicamente en el servicio de Otorrinolaringología y Cirugía y Cabeza y Cuello del Hospital General Dr. Manuel Gea González por faringoamigdalitis de repetición., que hayan firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

No hay criterios de exclusión.

Criterios de eliminación

Tejido amigdalino en condiciones inadecuadas para el estudio, aislamientos bacterianos no viables.

D) Definición de Variables

VARIABLES PRINCIPALES	
VARIABLE	ESCALA
Edad	Cuantitativa discreta: años
Sexo	Nominal: Femenino o Masculino
Número de cuadros de faringoamigdalitis/ año	Cuantitativa discreta
Resultado de cultivo	Nominal (microorganismo)
Presencia de biofilm por espectrofotometría	Dicotómica SI/NO
Tipo de biofilm producido	Nominal (baja, intermedia, alta)

Tabla 1. Variables Principales

Resultado de cultivos: Se identificaron cepas microbiológicas en cultivos anaerobios y aerobios de acuerdo a los protocolos del laboratorio clínico, sección microbiología del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Presencia de biofilm en microplaca de poliestireno (espectrofotometría): Se determinó si la cepa microbiológica presente en el cultivo es productora de biofilm mediante la técnica de microplaca de poliestireno descrita en procedimientos.

Tipo de productor de biofilm: se clasificó la producción de biofilm en baja, intermedio o alta productora al hacer un análisis comparativo con cepas control de *E. coli* DH5- α y el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 respectivamente.

E) Descripción de procedimientos

Se estudiaron las piezas quirúrgicas (tejido amigdalino) de pacientes pediátricos sometidos a amigdalectomía por faringoamigdalitis de repetición en el servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, durante el periodo del estudio. Se excluyeron muestras contaminadas y aquellas donde se presentaron fallas en el procesamiento.

Las piezas quirúrgicas (tejido amigdalino) se enviaron al laboratorio clínico, sección microbiología, del Hospital General Dr. Manuel Gea González para cultivo e identificación bacteriana.

Las muestras se recibieron en frasco estéril, las cuales previo registró y verificación de muestra por el personal de laboratorio se les agregó medio de tioglicolato y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente se resembraron las muestras en medio de cultivo agar sangre y medio McConkey. A las 24 h se realizó lectura de placas para identificación y sensibilidad.

La identificación de las cepas se realizó con el sistema automatizado Vitek2 (Biomérieux). Posteriormente las cepas se almacenaron a -80°C en una suspensión de caldo infusión cerebro corazón-glicerol 50% para ser utilizadas en el ensayo de producción de biofilm.

Producción de Biofilm en agar Rojo Congo

Ensayo de producción de biofilm en agar rojo Congo: se observó la capacidad de producción de biofilm comparando el tipo de crecimiento en el agar y comparándolo con las cepas descritas por Johanes K.-M. (2002). (15)

Brevemente se utilizaron 37 g/L de infusión cerebro-corazón, 50 gr de sucrosa, 10 gr de agar bacteriológico y 800 mg de colorante rojo Congo. Las cepas fueron inoculadas en agar sangre (5% de sangre ovina) a 37°C durante 36 h, en una atmosfera enriquecida con 5% de CO₂, posteriormente cada cultivo fue inoculado en placas de agar rojo Congo e incubadas a 37°C durante 24 h. Las bacterias que producen colonias de color negro, opacas y firmes fueron consideradas productoras de biofilm, por otro lado las colonias rosa brillante fueron consideradas negativas a la producción de biofilm. (16)

Producción de Biofilm en microplaca de 96

Ensayo de producción de Biofilm en microplaca de 96 pozos (método cuantitativo): Del cultivo inicial se realizó una dilución de 1:100 en el medio BHI-TT y se tomaron 100 ml, se transfirieron por triplicado a una microplaca de poliestireno de 96 pozos de fondo en "U". Se incubaron a 37°C 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 adicionaron 125 ml 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 200 ml de etanol al 95% durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se transfirió 125 ml 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 OD₆₃₀ nm de absorbancia, con la finalidad de evidenciar la formación de biofilm. (17) Se incluirán como cepas control la *E. coli* DH5 y *S. aureus* ATCC 29213 se tomarán como referencia sus valores de producción de biopelícula, la *E. coli* DH5 como productor bajo y el *S. aureus* ATCC 29213 como productor alto.

Los resultados se capturaron en la hoja de datos.



10. Validación de datos

Se utilizó estadística descriptiva: medidas de tendencia central y dispersión: rango, media, mediana, moda, desviación estándar, proporciones o porcentajes.

11. Presentación de resultados

Se utilizaron tablas y/o gráficas (pastel, barras, histogramas, líneas, puntos).

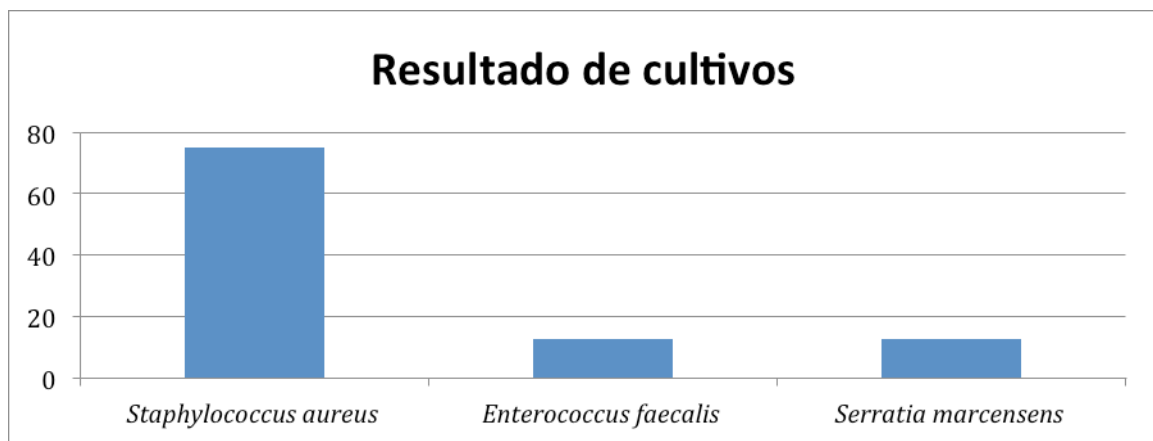
12. Resultados

En el estudio se incluyeron las muestras de 8 pacientes postoperados de amigdalectomía por faringoamigdalitis de repetición. La edad promedio fue de 5 años, con 6 cuadros por año, sin predominio de género (Tabla 1).

Edad promedio (años)	5.125
Hombres	50%
Mujeres	50%
No. Cuadros de faringoamigdalitis de repetición por año	6.375

Tabla 2. Datos demográficos y generales.

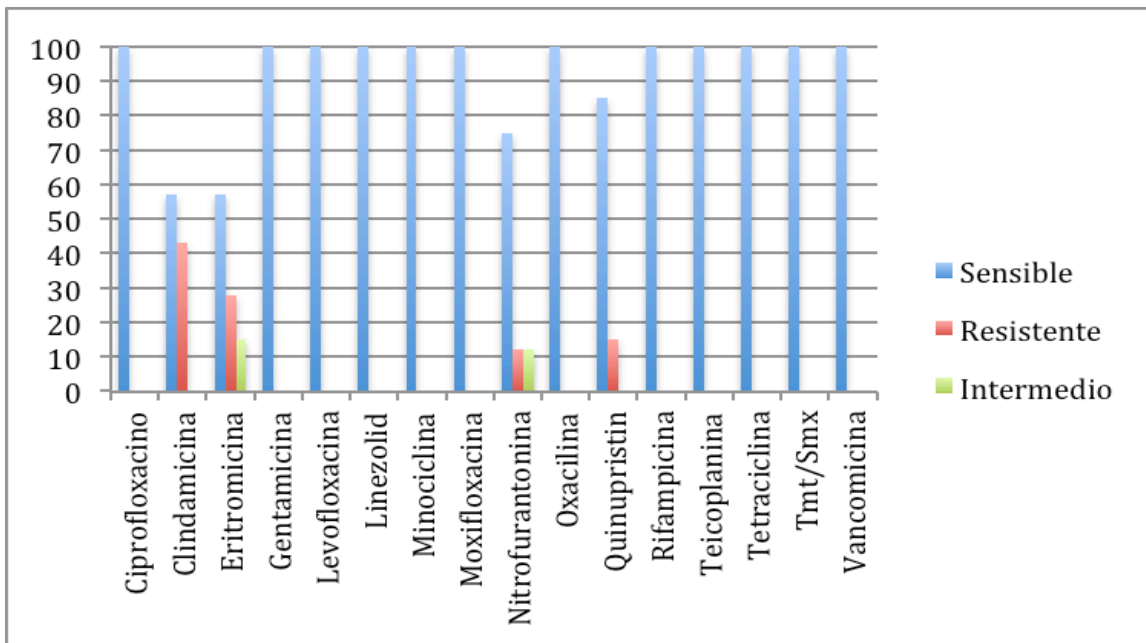
Se aislaron un total de 8 cepas bacterianas de muestras de amígdalas de 8 pacientes, de las cuales 6 cepas correspondieron a *Staphylococcus aureus*, 1 cepa a *Serratia mercensens* y 1 cepa a *Enterococcus faecalis* (Grafica 1). Por otro lado se observó que todas las cepas fueron sensibles a los antibióticos probados.



Grafica 1. Porcentaje de aislamientos bacterianos de muestras de pacientes con amigdalitis.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
	<i>S.aureus</i>	<i>E. Faecalis</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>
Antibiótico								
Ciprofloxacino	s	s	s	s	s	s	s	s
Clindamicina	r	r	NA	s	s	s	r	s
Eritromicina	r	i	NA	s	s	s	r	s
Gentamicina	s	s	s	s	s	s	s	s
Levofloxacina	s	s	NA		s	s	s	s
Linezolid	s	s	NA	s	s	s	s	s
Minociclina	s	s	NA		s	s	s	s
Moxifloxacina	s	s	NA	s	s	s	s	s
Nitrofurantonina	s	s	r	s	i	s	s	s
Oxacilina	s	NA	NA	s	s	s	s	s
Quinupristin	s	r	NA	s	s	s	s	s
Rifampicina	s	NA	NA	s	s	s	s	s
Teicoplanina	s	s	NA	s	s	s	s	s
Tetraciclina	s	s	NA	s	s	s	s	s
Tmt/Smx	s	NA	s	s	s	s	s	s
Vancomicina	s	s	NA	s	s	s	s	s

Tabla 3. Antibiograma de cepas bacterianas aisladas. S: sensible. R: resistente. I: intermedio. NA. No aplica.



Grafica 2. Porcentaje de sensibilidad, resistencia e intermedio a cada uno de los antibióticos.

Asimismo las cepas fueron evaluadas en la producción de biofilm utilizando un método cualitativo (agar rojo congo) y con un método cuantitativo (producción de biofilm en placa de poliestireno), y posteriormente se realizó lectura mediante espectrofotometría OD₆₃₀.

Con respecto a los resultados del método cualitativo obtenidos en el Agar Rojo Congo se observó producción de biofilm en todas las cepas cultivadas, con la morfología típica seca cristalina en la mayoría de los casos, descrita por Johanes K.-M. (2002).

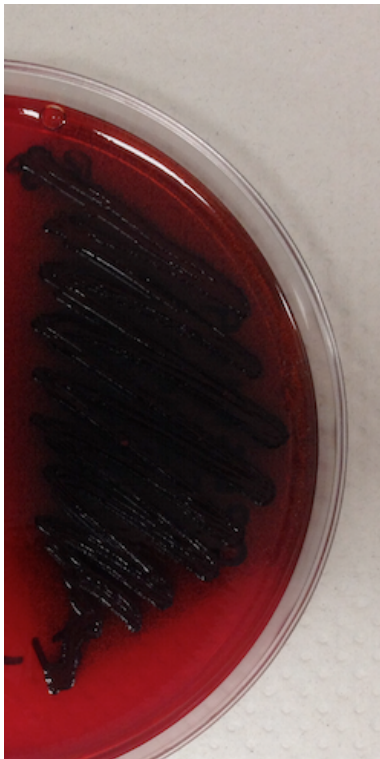


Figura 1. Muestra 1. Agar rojo congo. Se observa producción de biofilm (trazos negros) con una morfología típica cristalina seca compatible con producción alta de biofilm.

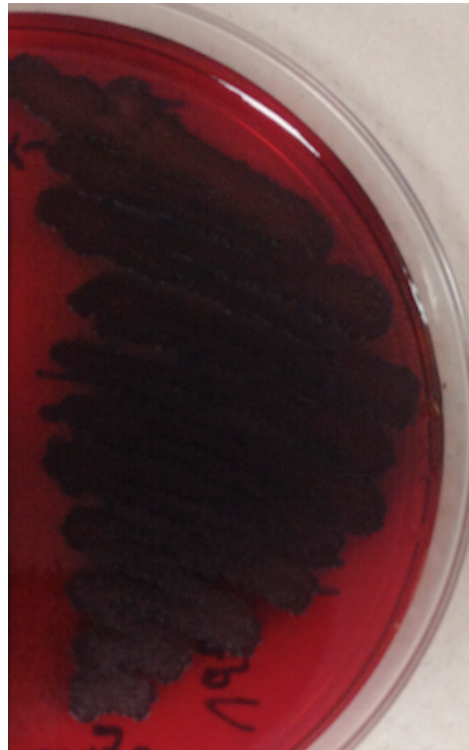


Figura 2. Muestra 2. Agar rojo congo. Se observa producción de biofilm (trazos negros), poco más húmedo,

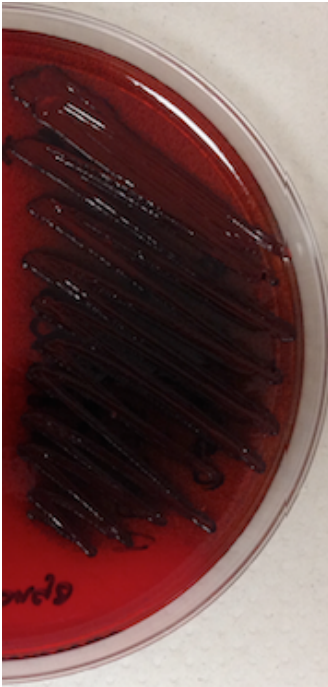


Figura 3. Muestra 3. Agar rojo congo. Se observa producción de biofilm (trazos negros), poco más húmedo, contorno ligeramente más irregular, morfología compatible con producción intermedia de biofilm.



Figura 4. Muestra 4. Agar rojo congo. Se observa producción de biofilm (trazos negros) con una morfología típica cristalina seca compatible con producción alta de biofilm.

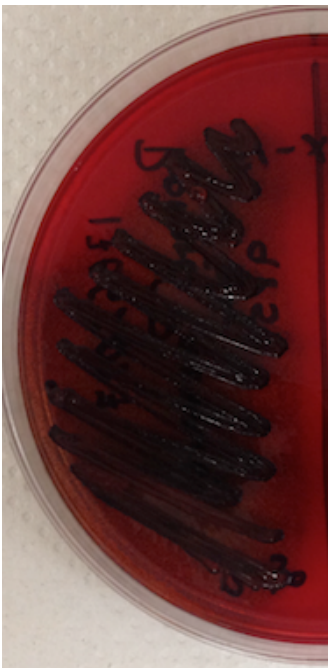


Figura 5. Muestra 5. Agar rojo congo. Se observa producción de biofilm (trazos negros) con una morfología típica cristalina seca compatible con producción alta de biofilm.



Figura 6. Muestra 6. Agar rojo congo. Se observa producción de biofilm (trazos negros) con una morfología típica cristalina seca compatible con producción alta de biofilm.

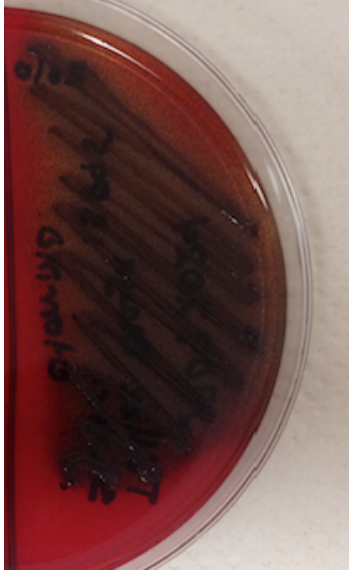


Figura 7. Muestra 7. Agar rojo congo. Se observa producción de biofilm (trazos negros) con una morfología típica cristalina seca compatible con producción alta de biofilm.

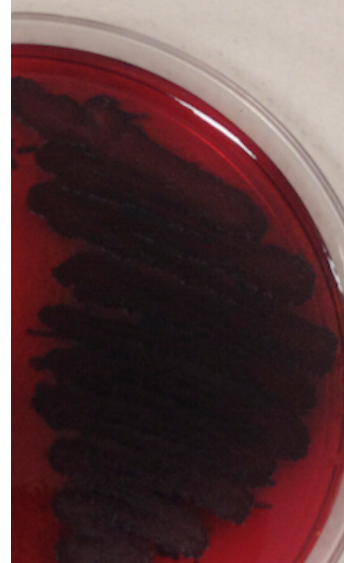


Figura 8. Muestra 8. Agar rojo congo. Se observa producción de biofilm (trazos negros) con una morfología típica cristalina seca compatible con producción alta de biofilm.

A continuación se presentan los resultados del método cuantitativo de producción de biofilm en placa de poliestireno y estimados a una OD_{630} nm. (Figura 9-10)

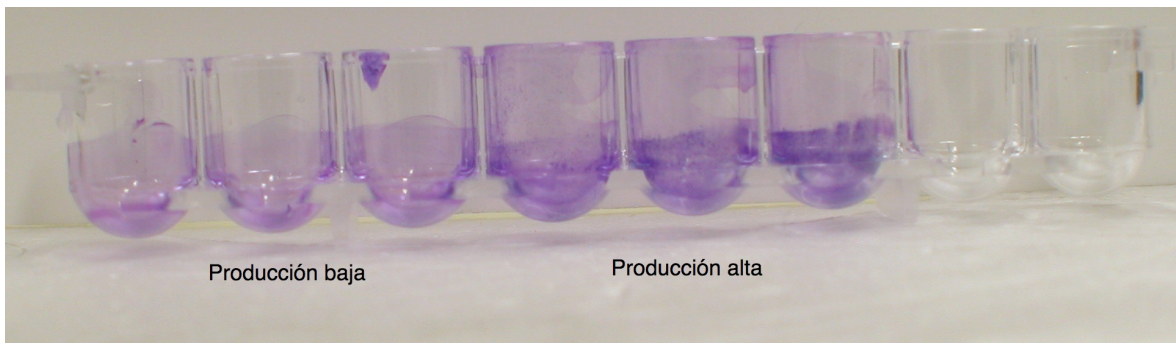


Figura 9. Producción de biofilm en placas de poliestireno teñida con cristal violeta al 0.1%. Los tres primeros pozos muestran el biofilm producido al aplicar etanol al 100% en una cepa baja productora (*E. coli* DH5). Los tres siguientes pozos pertenecen a una cepa alta productora (*S. aureus* ATCC 29213). La determinación se realiza por triplicado en cada cepa.

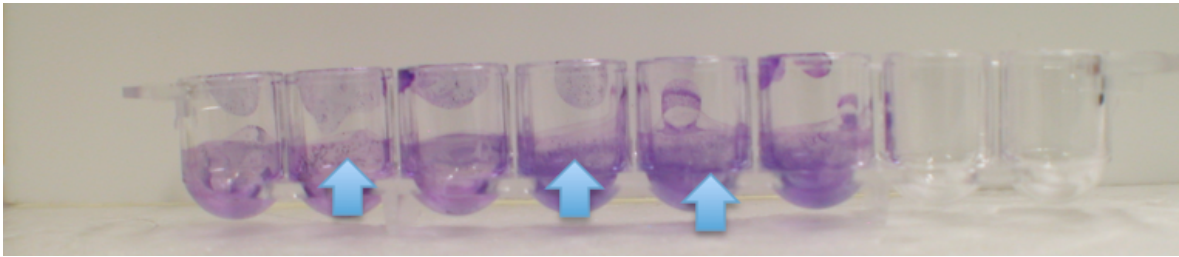


Figura 10. Producción de biofilm en placas de poliestireno teñida con cristal violeta al 0.1%. Pocillos de fondo en U, los tres primeros pozos pertenecen a la muestra 7 productora alta de biofilm, los tres siguientes pozos pertenecen a la muestra 8 productora alta de biofilm. Se señala la producción de biofilm adherida a la placa de poliestireno.

Posterior a la técnica cuantitativa de producción de Biofilm utilizando placas de poliestireno se midió la absorbancia a una OD₆₃₀. (Figura 11)

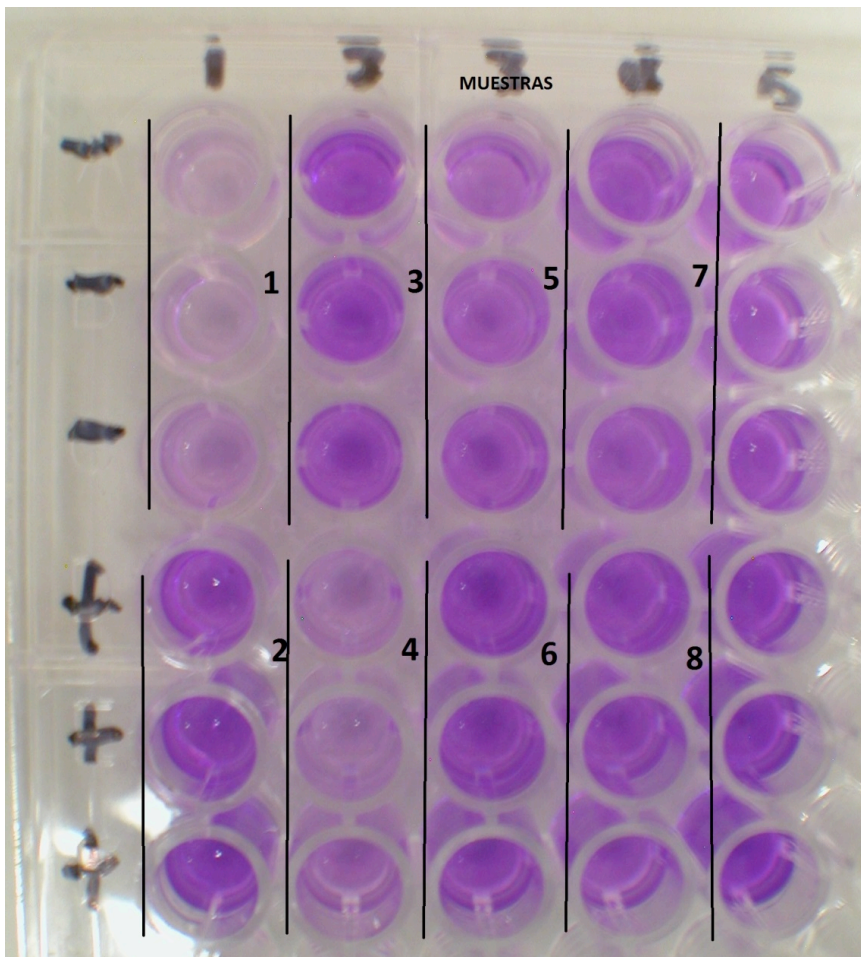
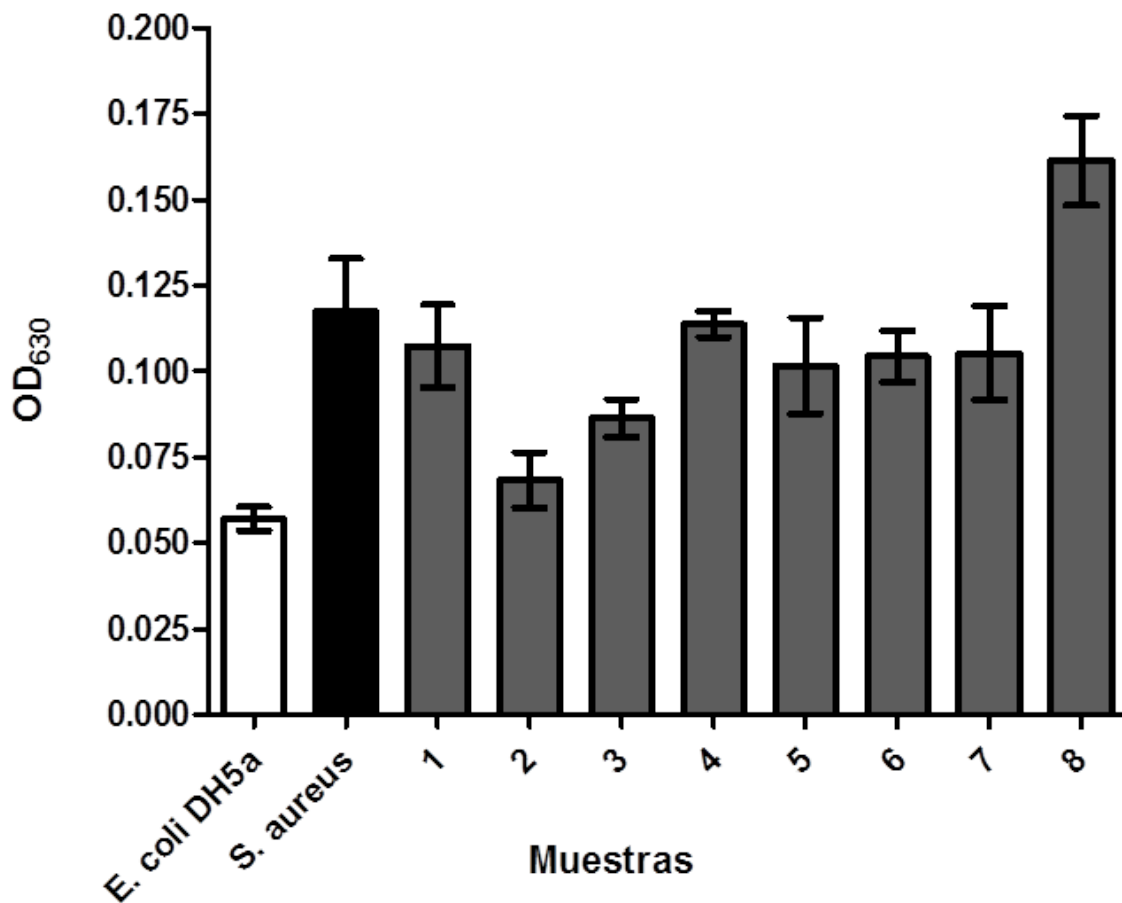
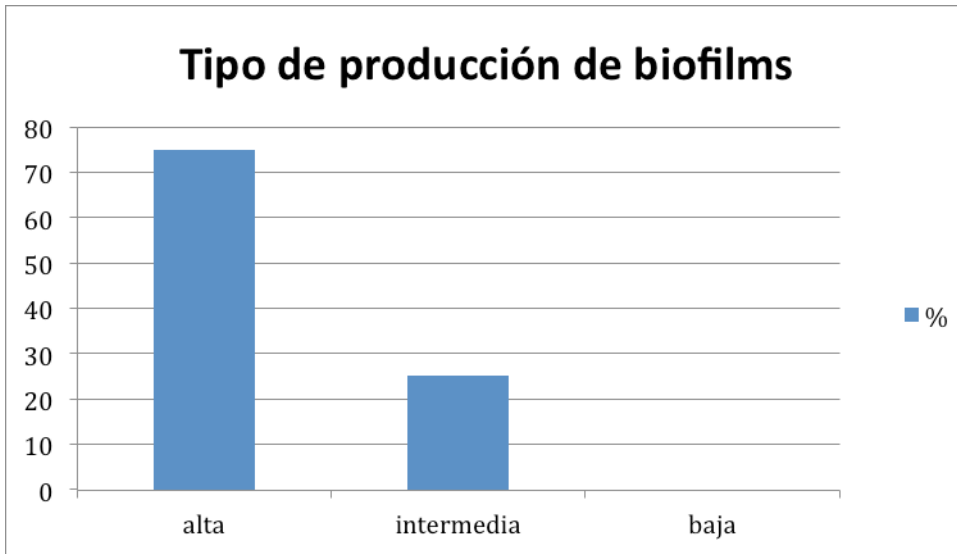


Figura 11. Placa fondo plano para lectura con espectrofotómetro OD₆₃₀. Control negativo, baja productora de biopelícula (-) (*E. coli* DH5), control positivo alta productora de biofilm (+) (*S. aureus* ATCC 29213). 1-8 aislamientos de muestras clínicas.

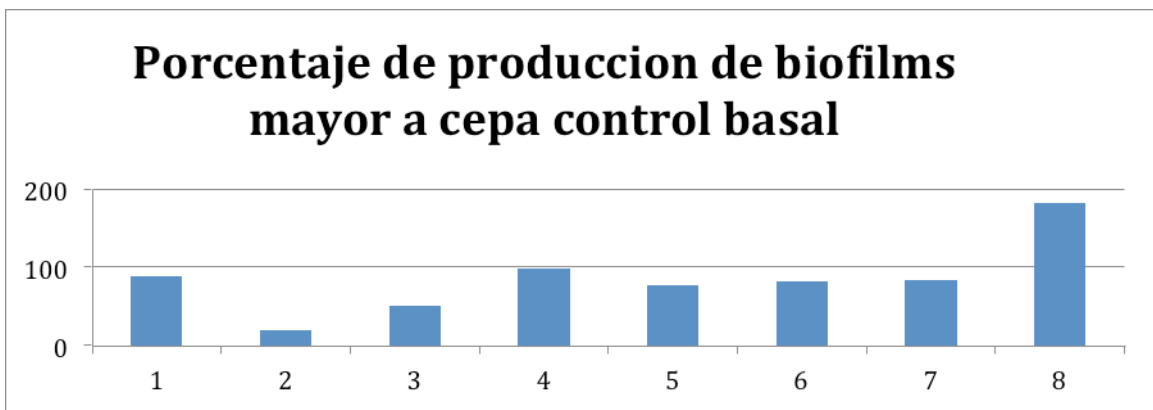
Se determinó que la cepa 8 mostró una producción de biofilm alta al encontrar valores de 0.161, que comparados con los valores de la cepa baja productora o productora basal (*E. coli* DH5) produciendo un 182% más que esta. De igual forma, la cepa 1, 4, 5, 6 y 7 mostraron valores entre 0.101 y 0.107, con un % mayor de producción a la basal entre 77% y 84%. Asimismo las cepas 2 (0.068) y 3 (0.086), únicamente con un 19% y 50% por arriba de la cepa productora basal por lo que se clasificaron como cepas productoras intermedias de biofilm. (Gráfica 2,3,4)



Grafica 3. Producción de Biofilm en placa de poliestireno medida por espectrofotometría (OD₆₃₀). Como control de cepa alta productora se incluyó a *S. aureus* ATCC 29213 y como cepa baja productora a *E. coli* DH5.



Grafica 4. Determinación de producción de biofilm en placa de poliestireno medida por espectrofotometría (OD_{630}).



Grafica 5. Porcentaje de producción de biofilm por muestra, mayor a cepa de control basal.

13. Discusión

Se comprobó por un método cualitativo y uno cuantitativo la presencia y producción de biofilm en cepas aisladas de pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición postoperados de amigdalectomía.

Al utilizar el sistema cualitativo (agar rojo Congo) se observó que todas las cepas presentaron la producción de biofilm, la cual fue comprobada con el método cuantitativo de microplaca y espectrofotometría, donde se observó que 6 de las 8 cepas analizadas fueron altas productoras y solo 2 cepas presentaron producción intermedia (*Serratia mercensens* y *Enterococcus faecalis*).

En el estudio predominaron las cepas productoras de biofilm por *Staphylococcus aureus* (75%), de acuerdo a lo reportado en la literatura por Donlan (5). El 100% de las muestras enviadas a cultivo y detección de bacterias productoras de biofilm fueron positivas. El 75% de los casos se encontraron bacterias productoras fuertes de biofilm y en un 25% de forma intermedia, una característica importante de nuestro trabajo fue que el total de cepas de *S. aureus* (6 cepas) fueron cepas altas productoras.

Al comparar la producción de biofilm con los perfiles de resistencia a los antibióticos se encontró que la mayoría de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos probados, por lo que se sugiere que la presencia de biofilm no es sinónimo de resistencia a antibióticos, en nuestros aislamientos.

La presencia de bacterias productoras de biofilm en tejido amigdalino de pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición se encuentra en el 100% de los casos, de acuerdo a lo reportado en la literatura por Al Mazrou en el 85% de los casos, (3), Chole en el 76% (4), Woo en el 80% (8), Díaz en el 77% (9).

Al realizar la búsqueda de información sobre trabajos que involucren la determinación de biofilm en este tipo de muestra, encontramos que solo se ha

reportado la presencia de biofilm en amígdalas mediante microscopía electrónica (3,4,8,9).

Este trabajo es uno de los primeros que evalúa la producción de biofilm de manera indirecta al analizar las cepas aisladas de pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición postoperados de amigdalectomía.

14. Conclusiones

Mediante este estudio se comprobó la presencia de bacterias productoras de biofilm en pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición postoperados de amigdalectomía.

Es de los primeros trabajos en los que se realiza la comprobación de bacterias productoras de biofilm de forma indirecta mediante métodos cualitativos y cuantitativos en población Mexicana.

Los procesos infecciosos crónicos se asocian a bacterias productoras de biofilm como en la faringoamigdalitis de repetición. 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 cientos de veces más resistentes a los antibióticos que bacterias no productoras de biofilm. Estas bacterias evaden los mecanismos inmunitarios del huésped, convirtiéndose en colonizadores persistentes y fuentes para producir infecciones crónicas.

Al comprobar la presencia de bacterias productoras de biofilm en pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición postoperados de amigdalectomía, sienta las bases para realizar estudios de tratamiento para la erradicación de las mismas sin llegar a la alternativa quirúrgica.

15. Consideraciones éticas

"Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud"

Título segundo, Capítulo VI De la investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos artículos 59 (obtención, conservación, utilización preparación suministro y destino final.) y 60 (además del debido respeto al cadáver humano, la observación del título decimocuarto en cuanto a la materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos.)

16. Referencias Bibliográficas

1. Choby B a. Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. Am. Fam. Physician [Internet]. American Family Physician; 2009 Mar 1;79(5):383–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155123>
2. Shirley W, AL W, BJ W. Pharyngitis and adenotonsillar disease [Internet]. Fifth Edit. ... JM, Harker LA. Otolaryngol. Head Copyright © 2010, 2005, 1998, 1993, 1986 by Mosby, Inc. All Rights Reserved; 2010 [cited 2013 May 18]. p. 2782–802. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-05283-2.00197-X>
3. Al-Mazrou K a, Al-Khattaf AS. Adherent biofilms in adenotonsillar diseases in children. Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg. [Internet]. 2008 Jan;134(1):20–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209130>
4. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg. [Internet]. 2003 Jun [cited 2013 May 18];129(6):634–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810467>

5. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* [Internet]. 2002 Sep;8(9):881–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2732559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Smith A, Buchinsky FJ, Post JC. Eradicating chronic ear, nose, and throat infections: a systematically conducted literature review of advances in biofilm treatment. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* [Internet]. 2011 Mar [cited 2013 May 18];144(3):338–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21493193>
7. Post JC, Hiller NL, Nistico L, Stoodley P, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* [Internet]. 2007 Oct;15(5):347–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823552>
8. Woo JH, Kim ST, Kang IG, Lee JH, Cha HE, Kim DY. Comparison of tonsillar biofilms between patients with recurrent tonsillitis and a control group. *Acta Otolaryngol.* [Internet]. 2012 Oct [cited 2013 May 18];132(10):1115–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690674>
9. Diaz RR, Picciafuoco S, Paraje MG, Villegas N a, Miranda J a, Albesa I, et al. Relevance of biofilms in pediatric tonsillar disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* [Internet]. 2011 Dec [cited 2013 May 18];30(12):1503–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499955>
10. Stoodley P, Debeer D, Longwell M, Nistico L, Hall-Stoodley L, Wenig B, et al. Tonsillolith: not just a stone but a living biofilm. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Sep [cited 2013 May 18];141(3):316–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716006>
11. Oliveira A, Cunha MDLR. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res. Notes* [Internet].

BioMed Central Ltd; 2010 Jan [cited 2014 Mar 2];3(1):260. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2973941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

12. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz. J. Infect. Dis.* [Internet]. 2011;15(4):305–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21860999>
13. Anuario De Morbilidad epidemiológica 2011. [Internet]. Dir. Gen. Epidemiol. Secr. salud. 2011 [cited 2014 Feb 27]. p. 2011. Available from: www.epidemiologia.salud.gob.mx
14. Naing L, Winn T, Rusli B. Practical issues in calculating the sample size for prevalence studies. *Arch. Orofac. Sci.* [Internet]. 2006 [cited 2014 Feb 27];(Ci):9–14. Available from: <http://core.kmi.open.ac.uk/download/pdf/791545.pdf>
15. Knobloch JK-M, Horstkotte M a, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* [Internet]. 2002 Oct [cited 2014 Jul 10];191(2):101–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410349>
16. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A (2006) Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 24: 25-29.

17. ANEXOS

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con las disposiciones contenidas en la Ley General de Salud, Título Quinto "Investigación para la Salud", Capítulo Único, artículo 100, fracción IV; así como del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Segundo "De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos" Capítulo I, Disposiciones Comunes, artículo 13 que señala que en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar, artículos 14 fracción V, 20, 21 y 22 de dicho Reglamento y el Título segundo, Capítulo VI De la investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos artículos 59 y 60, y, de conformidad con los principios éticos contenidos en la Declaración de Helsinki, se me ha explicado e informado que:

- I. Se me ha explicado que mi hijo(a) padece la enfermedad "Faringoamigdalitis de Repetición", y que será intervenido quirúrgicamente, por lo que se le invita a participar en el proyecto llamado Presencia de bacterias productoras de biofilm en tejido amigdalino de pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición
- II. Autorizo la donación de una muestra de las amígdalas, que normalmente son desechadas después de la cirugía, para estudiar la presencia bacterias productoras de biofilm (capa de material que dificulta su eliminación).
- III. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta aclarar cualquier duda en todo lo relacionado con el estudio y la participación en el mismo.
- IV. Autorizo la publicación de los resultados del estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad o la de mi hijo (familiar).
- V. Se me ha asegurado que las piezas quirúrgicas (amígdalas) utilizadas en el estudio serán desechadas de forma segura y de acuerdo a como lo establece la ley y no serán utilizadas en otros proyectos.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, autorizo que mi hijo(a), de nombre _____ con número de expediente _____ participe en el estudio titulado: Presencia de bacterias productoras de biofilm en tejido amigdalino de pacientes pediátricos con faringoamigdalitis de repetición.

Nombre y firma del paciente o responsable legal _____

Nombre, y firma del testigo 1 _____

Dirección _____

Relación que guarda con el paciente _____

Nombre, y firma del testigo 2 _____

Dirección _____

Relación que guarda con el paciente _____

Nombre y firma del Investigador Responsable o Principal _____

Nombre y firma de quien aplica el consentimiento informado _____

Este documento se extiende por triplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador, así mismo es obligatorio integrar al expediente clínico una copia del mismo, anexando una nota donde se especifique que el sujeto de estudio está participando en el protocolo (señalando título y número de registro y nombre del investigador responsable). Para preguntas o comentarios comunicarse con la Dra. María Elisa Vega Memije (01 55) 4000-3217 Presidente del Comité de Investigación o con el Dr. Jorge Andrés Peña Ortega, Presidente del Comité de Ética en Investigación al (01 55) 4000-3279.

