



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ**

**“ IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES RELACIONADAS A RESISTENCIA DE  
BETALACTÁMICOS Y QUINOLONAS EN BACTERIAS PRODUCTORAS DE  
BIOFILMS EN PACIENTES CON RINOSINUSITIS CRÓNICA ”**

**TESIS:**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN  
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**

**PRESENTA:**

**DR. JAVIER EDUARDO SPINOLA HERNÁNDEZ**

**ASESORES:**

**DR. GERARDO ARTURO BRAVO ESCOBAR**

**MÉDICO ADSCRITO A LA DIVISIÓN DE  
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO.**

**DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO**

**DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA Y AGENTES PATOGENOS**

**MÉXICO. FEBRERO DE 2017**



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.

## AUTORIZACIONES

Dr. Octavio Sierra Martínez  
Director de Enseñanza  
e Investigación

---

Dra. María Elisa Vega Memije  
Subdirectora de Investigación  
Biomédica

---

Dr. Héctor Manuel Prado Calleros  
Responsable de División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza  
y Cuello

---

Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar  
Médico adscrito a la División de Otorrinolaringología y Cirugía de  
Cabeza y Cuello.  
Investigador Principal

---

Dr. Rigoberto Hernández Castro  
Departamento Ecología de Agentes Patógenos

---

Este trabajo de Tesis con No. PROT-19-11-2016, presentado por el alumno Javier Eduardo Spinola Hernández se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar con fecha del 25 de julio de 2016 para su impresión final.

Dra. María Elisa Vega Memije  
Subdirección de Investigación  
Biomédica

Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar  
Investigador Principal

Este trabajo fue realizado en el Hospital General ``Dr. Manuel Gea González`` en el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello bajo la dirección del Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar con apoyo de los departamentos de Enseñanza e Investigación.

# **Identificación de mutaciones relacionadas a resistencia de betalactámicos y quinolonas en bacterias productoras de biofilms en pacientes con rinosinusitis crónica**

Spinola-Hernández J<sup>1</sup>, Bravo-Escobar G<sup>2</sup>, Prado-Calleros H<sup>3</sup>, Hernández-Castro R<sup>4</sup>.

1 Residente de cuarto año de Especialidad de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

2 Médico Adscrito al Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

3 Jefe de División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

4 Investigador en ciencias médicas D. Departamento Ecología de Agentes Patógenos. Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

**INTRODUCCIÓN:** La rinosinusitis crónica (RSC) es la inflamación sintomática de la nariz y senos paranasales con duración  $\geq 12$  semanas. *Staphylococcus aureus* es el patógeno bacteriano más frecuente en RSC. *Pseudomonas aeruginosa*, es la bacteria gram negativa más encontrada, ambas productoras de biofilms. Quinolonas y penicilinas son antibióticos utilizados para tratamiento de RSC, su resistencia es multifactorial, por producción de betalactamasas o mediante una o varias mutaciones genéticas. Las betalactamasas de amplio espectro más importantes son: TEM y SHV, actualmente CTX-M ha sido la principal.

**OBJETIVO:** Identificar mutaciones relacionadas a resistencia de betalactámicos y quinolonas en bacterias productoras de biofilms (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) en pacientes con rinosinusitis crónica.

**MÉTODOS:** Durante el periodo de mayo a julio de 2016 se identificaron pacientes mayores de 18 años en la consulta externa del Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello con diagnóstico de RSC, que no mejoraron posterior a tratamiento médico. Se tomó muestra vía endoscópica de meato medio, se cultivó y se identificó *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* productora de biofilms, se les realizó extracción de ADN con técnica de tiocinato de guanidina, se amplificaron genes de betalactamasas SHV, TEM y CTX-M.

**RESULTADOS:** 14 muestras, 8 pacientes femeninos y 6 masculinos. Se aislaron 5 muestras (35.72%) con *Staphylococcus aureus* y dos (14.28%) con *Pseudomonas aeruginosa*. Se detectaron dos cultivos positivos a betalactamasas tipo CTX-M, así como 7 cultivos con SHV. No se logró amplificar betalactamasas TEM. No se identificaron bacterias con resistencia a quinolonas. Los porcentajes más altos de resistencia fueron a ampicilina y amoxicilina con ácido clavulánico. Se obtuvieron 7 muestras con alta producción de biofilms y 7 con baja.

**CONCLUSIONES:** Se identificaron mutaciones relacionadas a resistencia de betalactámicos por la producción de betalactamasas en bacterias productoras de biofilms. No se identificaron mutaciones relacionadas a resistencia de quinolonas en bacterias productoras y no productoras de biofilms de pacientes con rinosinusitis crónica.

**PALABRAS CLAVE:** rinosinusitis crónica, biofilms, resistencia antibiótica.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Chronic rhinosinusitis (CRS) is a symptomatic inflammation of the nose and paranasal sinuses for 12 weeks or more. *Staphylococcus aureus* is the most frequent bacteria in CRS; Within gram-negative bacteria, *Pseudomonas* is the most common, both of them, biofilm producers. The antibiotics usually used for treatment are quinolones and penicillin. Beta lactamase production or genetic mutations are factors for antibiotic resistance, which is multifactorial. The most important broad spectrum beta-lactamases are TEM and SHV, currently CTX-M is the principal.

**OBJECTIVE:** To identify mutations related to resistance for beta-lactams and quinolones in biofilms producing bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) in Patients with chronic rhinosinusitis.

**METHODS:** During May to July 2016, patients over 18 years old were identified in the outpatient department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery with CRS who did not improve after conventional medical treatment. A middle meatus sample was taken endoscopically. This sample was grown and *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* producing biofilms were identified, DNA extraction was practiced with thiocyanate guanidine technique, the quinolone's genes (*gyrA*, *parC*) and lactamase (SHV, TEM and CTX-M) were amplified.

**RESULTS:** Fourteen samples were obtained from 8 female patients and 6 male patients. In five samples (35.72%) *Staphylococcus aureus* was identified and in two samples (14.28%) *Pseudomonas aeruginosa* was found. Two beta-lactamasas type CTX-M positive cultures were detected and seven cultures with SHV. No beta-lactamasa TEM was amplified. There were no bacteria resistant to quinolonas. The higher percentage of resistant was to ampicillin and amoxicillin with clavulanate. Seven samples were obtained with high production of biofilms and the rest with low.

**CONCLUSIONS:** Mutations related to betalactamic resistance associated with beta-lactamases production were identified in biofilm producing bacteria. No bacterial mutations related to quinolone resistance were identified in patients with CRS.

**KEY WORDS:** *Chronic rhinosinusitis, biofilms, antibiotic resistance.*

## INTRODUCCION

La rinosinusitis crónica (RSC) se define operativamente como una inflamación sintomática de la nariz y senos paranasales con duración > 12 semanas con síntomas sin resolución completa del cuadro clínico. Los criterios diagnósticos de rinosinusitis crónica son:  $\geq 12$  semanas de dos o más de los siguientes signos y síntomas: drenaje mucopurulento (anterior, posterior o ambos), obstrucción nasal (congestión), plenitud, presión o dolor facial e hiposmia. Se debe acompañar de inflamación que se documente por uno o más de los siguientes hallazgos: moco purulento (no

claro) o edema en el meato medio o región etmoidal, pólipos en cavidad nasal o meato medio, imagen radiográfica que muestre inflamación de senos paranasales. Se enfatiza fuertemente en que el diagnóstico de RSC no puede ser basado sólo en signos y síntomas, también requiere evidencia de inflamación rinosinusal. Con los signos objetivos de inflamación se incrementa la precisión del diagnóstico para RSC y sirve para limitar el diagnóstico injustificado (1-5).

La rinosinusitis es una de las enfermedades más comúnmente diagnosticadas en Estados Unidos y por lo tanto, un problema de salud importante. Más de 30 millones de personas sufren de RSC, presenta una prevalencia anual de 13 a 16% que ha ido aumentando y es una de las enfermedades crónicas más comúnmente reportadas en Estados Unidos, más prevalente que el asma, enfermedades cardíacas, diabetes o cefalea; la prevalencia es mayor en mujeres, con una relación mujeres/hombres de 6:4 (2, 4). En México no existe una cifra exacta, ya que no existen datos poblacionales actualizados, sin embargo, de acuerdo al anuario de morbilidad 1984-2014 de la dirección general de epidemiología, las infecciones respiratorias agudas representan el primer lugar de causa de enfermedad nacional en todos los grupos de edad, así como el primer lugar de enfermedades a nivel nacional reportadas por institución de salud durante el 2014 (6). No existen datos de infecciones nasosinusales crónicas en nuestro país.

En cuanto a las bacterias presentes en RSC, se ha encontrado que *Staphylococcus aureus* es el patógeno bacteriano más frecuentemente presente. Este puede residir dentro de las células epiteliales nasales y puede formar biofilms, lo que ayuda a establecer la cronicidad de la enfermedad (1, 4). Dentro de bacterias Gram negativas, la principal es *Pseudomonas aeruginosa*. Otras bacterias presentes en pacientes con RSC son *Corynebacterium*, *Staphylococcus coagulasa* negativo, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis* (2, 7, 9).

Uno de los mecanismos propuestos para generar cronicidad por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* es la formación de biofilms. Los biofilms son estructuras altamente organizadas con bacterias dentro de una matriz extracelular. Esta matriz protege contra múltiples sistemas de defensa como anticuerpos, fagocitos y sistema de complemento, haciéndolo hasta 1,000 veces más resistente al tratamiento cuando se compara con plancton. Además los biofilms facilitan la comunicación e intercambio interbacteriano de información genética vía plásmido para promover la variabilidad y mutaciones adaptativas, como la resistencia antimicrobiana. Estos factores, además de los gradientes nutricionales intrínsecos que se integran en la matriz de biofilms, minimizan el impacto de factores ambientales estresantes y promueven la viabilidad bacteriana, que puede contribuir a persistencia de infección a pesar tratamientos antibióticos prolongados (1, 2). Las bacterias productoras de biofilms más encontradas en pacientes con RSC son *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram negativas siendo la principal *Pseudomonas aeruginosa*. Muchas otras especies implicadas en la producción de biofilms son *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis* (2, 7-9).



Recientemente, la resistencia se ha incrementado por el extenso e inapropiado uso de los antibióticos (10). Las quinolonas son antibióticos potentes de amplio espectro, comúnmente utilizados para el tratamiento de RSC, la resistencia a estos antibióticos es multifactorial y puede ser mediante una o varias mutaciones de genes blanco, aumentando la producción de bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos, modificando enzimas o proteínas de protección. Los aislamientos clínicos de bacterias resistentes a quinolonas han surgido rápidamente y datos recientes han demostrado que la resistencia a este tipo de antibióticos puede tener diversos impactos, dependiendo de la especie y del estado del hospedero (11). Las fluoroquinolonas son inhibidores potentes de las topoisomerasas tipo II bacterianas, que son enzimas esenciales involucradas en procesos celulares clave, incluyendo la replicación del ADN (12-14). En las bacterias, el ADN cromosómico permanece en un estado condensado muy compacto, esto se debe a una torsión en las hélices del ADN, proceso conocido como súper enrollamiento, lo que le da la capacidad al ADN bacteriano de existir en un estado condensado en el que el ADN puede ser condensado en súper enrollamientos compactos permitiendo que una gran cantidad de ADN sea empaquetado en la célula (15, 16). El súper enrollamiento puede ser positivo o negativo y esto describe la dirección en la que la torsión ha ocurrido, en sentido de las manecillas del reloj o en contra de las manecillas del reloj. Dentro de la célula, el grado de súper enrollamiento es controlado por enzimas que trabajan en contra del súper enrollamiento del ADN, ya sea positiva o negativamente. La topoisomerasa I y la topoisomerasa II trabajan de forma opuesta para controlar el nivel de enrollamiento dentro del ADN. La topoisomerasa I reduce el número de súper enrollamientos negativos. En contraste, la topoisomerasa II introduce súper enrollamientos negativos, lo cual desenrolla un ADN sobre enrollado a un estado relajado (15). El grado de súper enrollamiento es cambiante de acuerdo a estrés ambiental, etapa de crecimiento y proceso celular (15-18). El cambio en el grado de enrollamiento dentro de la célula altera una gran cantidad de procesos celulares y muchos genes se expresan de forma diferente en respuesta a estos cambios. El resultado en la alteración del súper enrollamiento puede tener grandes consecuencias fenotípicas. Las enzimas ADN girasa y ADN topoisomerasa IV son enzimas topoisomerasas II que incluyen dos copias de cada una de cualquier subunidad *GyrA* y *GyrB* o *ParC* y *ParE*, respectivamente. Aunque ambas enzimas relajan positivamente el súper enrollamiento del ADN, sólo la ADN girasa puede introducir súper enrollamientos negativos en el ADN relajado (15).

El mecanismo de acción de las quinolonas tiene como blanco a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV, inhiben el control de súper enrollamiento dentro de la célula lo que daña la replicación del ADN y a mayores concentraciones causan la muerte celular (19-21). La ADN girasa y la topoisomerasa IV como principal blanco de quinolonas varía de acuerdo a la especie bacteriana, sin embargo se puede generalizar de la siguiente manera, el principal blanco de bacterias Gram negativas es ADN girasa y el principal blanco de microorganismos Gram

positivos es topoisomerasa IV. El mecanismo más común de resistencia a quinolonas es por mutación en uno o más de los genes que codifican los blancos primarios y secundarios de estos fármacos, las topoisomerasas tipo II (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*). La región donde surge la mutación en estos genes que codifican resistencia a las quinolonas es una secuencia de ADN corta conocida como *región determinante de resistencia a quinolonas* (QRDR, por sus siglas en inglés) (22, 23). Las mutaciones en QRDR de estos genes, resultan en sustitución de aminoácidos, alteración en la estructura proteica blanco y subsecuentemente en la alteración de la afinidad de unión de la enzima a la quinolona, llevando a resistencia al fármaco (24, 25). Las mutaciones primarias en QRDR a menudo involucran la sustitución en el gen *gyrA* dentro del codón 83 (serina→leucina) para organismos Gram negativos o sitios análogos dentro del gen *parC* para organismos Gram positivos. Estas mutaciones alteran la estructura blanco y reducen la eficiencia de unión de las quinolonas (11).

En cuanto a betalactamasas, en 1940 una enzima producida por *Escherichia coli* mostró que destruía la capacidad de las penicilinas para matar bacterias (26). Este primer reporte de actividad de betalactamasas ocurrió antes del amplio uso de las penicilinas, demostrando la actividad de enzimas para la inactivación de betalactámicos en el medio ambiente. Estas enzimas tienen la habilidad de hidrolizar los enlaces químicos que distingue a los antibióticos betalactámicos de otros agentes antibacterianos, haciendo así incapaces a las moléculas de matar a las bacterias. En la actualidad se han identificado más de 890 tipos de betalactamasas presentes naturalmente en aislados bacterianos (27, 28). Las penicilinasas comunes incluyen a la enzima SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae* y la betalactamasa TEM-1 encontrada en *Neisseria gonorrhoeae* (29) y *Haemophilus influenzae* (30). Estas dos enzimas son muy prevalentes y fácilmente inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (31). Las betalactamasas de amplio espectro fueron identificadas inicialmente como variantes de betalactamasas comunes (SHV-1 y TEM-1), generalmente diferenciadas solo por uno o dos aminoácidos. Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran generalmente en plásmidos que confieren resistencia a múltiples clases de antibióticos y que son fácilmente transferibles entre las especies (32). Estas betalactamasas de amplio espectro aún se asocian a brotes importantes de resistencia a betalactámicos, sin embargo las primeras variantes de SHV y TEM han sido reemplazadas por la familia de CTX-M, las cuales fueron identificadas a principios de 1990 en Europa y Sudamérica (33, 34). En una década las betalactamasas CTX-M predominaron como betalactamasas de amplio espectro en muchos centros médicos (35-37).

La resistencia bacteriana adquirida a betalactámicos está ligada a la producción de betalactamasas y representa el principal mecanismo de resistencia. Las betalactamasas más importantes son penicilinasas, betalactamasas de amplio espectro y carbapenemasas. Las penicilinasas proveen resistencia a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y sensibilidad a ceftazidima, cefepime, imipenem e inhibidores de betalactamasas. Las betalactamasas de

amplio espectro, representan betalactamasas que hidrolizan a cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos y que no se afectan por inhibidores de betalactamasas y carbapenemasas. Las betalactamasas de amplio espectro más importantes son: TEM, SHV, PER y VEB. Hasta el año 2000 las betalactamasas de amplio espectro fueron TEM y SHV, frecuentemente asociadas a infecciones nosocomiales. A partir de este mismo año, CTX-M ha sido la principal y con mayor propagación (38).

El tratamiento de la RSC generalmente involucra terapia farmacológica, con cirugía reservada para aquellos pacientes en quienes sus síntomas persistan después de un tratamiento médico convencional. El tratamiento médico convencional de acuerdo a la guía de práctica clínica de nuestro país y a la guía de práctica clínica de la academia americana de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello es: amoxicilina o amoxicilina y clavulanato (90mg/kg/día, dividido en 2 dosis) como primera línea, durante 4 a 6 semanas (1-3, 39, 40).

En éste trabajo realizamos un estudio descriptivo, prospectivo, observacional y transversal con el objetivo de identificar mutaciones relacionadas a resistencia de betalactámicos y quinolonas en bacterias productoras de biofilms (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) en pacientes con rinosinusitis crónica.

## **MÉTODOS**

Durante el periodo de mayo a julio de 2016 se identificaron pacientes masculinos y femeninos, mayores de 18 años en la consulta externa del Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello provenientes de centros de salud, referidos de otro hospital, servicio de urgencias o que solicitaron consulta de primera vez. Los pacientes cumplieron con los criterios diagnósticos de RSC, no mejoraron clínicamente posterior a tratamiento médico convencional y no recibieron tratamiento antibiótico tópico o sistémico siete días previos a la toma de muestra para cultivo. Se les informó del protocolo de investigación y firmaron consentimiento informado, se tomó una muestra de rinorrea con hisopo estéril, modelo BBLTM CultureSwabTM, marca BD, bajo visión con endoscopio estéril, rígido de 0 grados de 4mm x 17.5mm, proveniente del meato medio de la nariz (cualquiera de las dos fosas nasales) y se envió a laboratorio para su siembra y cultivo. Se identificaron cepas bacterianas a las cuales se les determinó sensibilidad y resistencia con el método de Concentración Mínima Inhibitoria. Posteriormente las cepas se almacenaron a -80°C en una suspensión de caldo infusión cerebro corazón-glicerol 50% hasta que fueron utilizadas.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó con técnica de tiocinato de guanidina descrita por Pitcher, et al., 1989 (47). El ADN cromosómico se utilizó para determinación de genes de resistencia a

penicilina amplificando los genes *gyrA* y *parC*, y se determinó presencia de mutaciones puntuales para el gen *gyrA* en las posiciones: Ser-83-Leu; Asp-87-Asn o Tyr; y para el gen *parC*: Ser-80-Arg o Ile; Glu-84-Lys o Val. Para identificar el gen *gyrA* se llevó a cabo una PCR que amplificó un producto de 344 pb. Se utilizaron iniciadores 5'-CTCCTCCCAGACCAAAGACA-3' y 5'-TCACGACCGATA CCACAGCC-3'. Para identificar el gen *parC*, se realizó PCR utilizando los iniciadores, 5'- AAACCTGTTCAGCGCCGCATT- 3' y 5'-GTGGTGCCGTTAAGCAAA- 3', para amplificar un fragmento de 188 pb.

#### Purificación de productos de amplificación y secuenciación de ADN

Los productos de amplificación se purificaron utilizando el sistema comercial QIAquick. 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 se alinearon y se obtuvo una secuencia consenso. La secuencia de nucleótidos se comparó 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 se determinaron mediante el uso del National Center of Biotechnology Information (NCBI). La alineación se realizó por medio del programa Vector NTI.

Para determinar el tipo de betalactamasa presente en las cepas se amplificaron los genes *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el gen *blaSHV* se utilizaron los iniciadores 5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3' y 5'-TTGTTATTCGGGCAA-3' que amplificaron un producto de 723 pb, para el gen *blaTEM* se emplearon iniciadores 5'-AAACGCTGGTGAAAGTA-3' y 5'-AGCGATCTGTCTAT-3' para amplificar un producto de 717 pb y para el gen el *blaCTX-M* se utilizaron los iniciadores 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3' y 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' para amplificar un producto de 550 pb.

#### 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 100ul, se transfirieron por triplicado a una microplaca de polivinil de 96 pozos de fondo en U. Se incubaron a 37°C durante 48 horas, se removieron las células planctónicas mediante decantación y se realizaron tres lavados sumergiendo la microplaca en agua destilada estéril. Posteriormente se adicionaron 125ul de cristal violeta al 0.1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se removió el excedente de colorante mediante dos lavados. A la microplaca se le agregaron 200 ul de etanol al 95% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se transfirieron 125 ul de etanol y el biofilm teñido 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 biofilms. Se incluyeron como cepas control *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  y *Pseudomonas aeruginosa* 27853, se tomaron como referencia sus valores de producción de biofilms, *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  como productor débil y *Pseudomonas aeruginosa* 27853 y *Staphylococcus aureus* como productor fuerte.

## RESULTADOS

Se obtuvieron 14 muestras procedentes de 8 pacientes femeninos y 6 masculinos, con un promedio de edad de 44 años, con un mínimo de 19 años hasta 65 años como máximo. No se presentaron complicaciones en ningún paciente durante o posterior a la toma del cultivo. Se lograron aislar 5 muestras (35.72%) con *Staphylococcus aureus* y dos muestras (14.28%) con *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo 3 muestras (21.42%) presentaron *Klebsiella pneumoniae*. *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* y *Aeromonas hydrophila* estuvieron presentes en una muestra cada uno (7.14%/cu). En total, en el 50% se aislaron bacterias gram positivas (*Staphylococcus*) y 50% bacterias gram negativas.

Se detectaron dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* (muestra 2 y 11) positivas a betalactamasas de espectro extendido tipo CTX-M (Figura 1), así como 7 cepas con presencia de betalactamasas de espectro extendido tipo SHV, de estas, 3 cepas fueron *Klebsiella pneumoniae*, 2 cepas *Pseudomonas aeruginosa*, una cepa *Enterobacter cloacae* y otra *Aeromonas hydrophila* (Figura 2). Por otro lado, no se logró amplificar la betalactamasa tipo TEM.

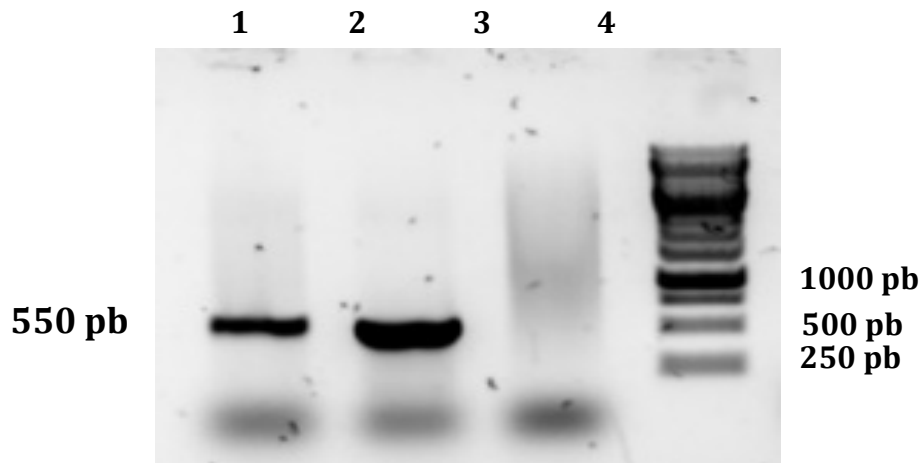


Figura 1. Amplificación de un producto de 550 pb de betalactamasas tipo CTX-M. Carril 1 y 2: muestras positivas; Carril 3: control negativo; Carril 4: Marcador de peso molecular 1 kb plus

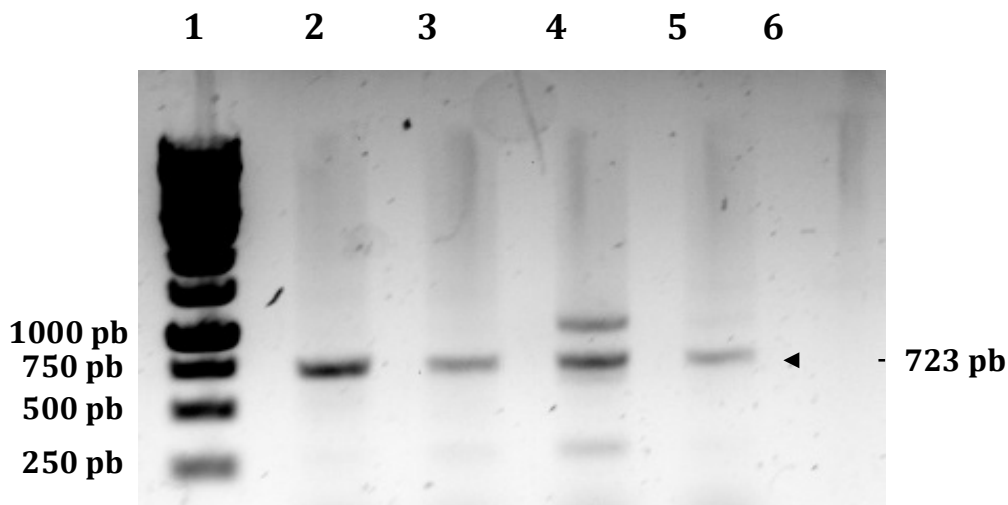


Figura 2. Amplificación de un producto de 723 pb de betalactamasas tipo SHV. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb plus; Carril 2-5: muestras positivas; Carril 6: control negativo.

No se identificaron cepas con resistencia a ciprofloxacino o alguna otra quinolona presente en los ensayos de antibiograma, por lo que no se realizó la identificación de mutaciones puntuales en los genes *gyrA* y *parC*.

Los perfiles de resistencia ajustados a gram positivos y negativos fueron los siguientes Amikacina (6 cepas sensibles y 1 resistente), Ampicilina (2 cepas sensibles y 11 resistentes), Ceftriaxona (6 sensibles y 6 resistentes), Ceftazidima (4 sensibles y 3 resistentes), Cefazolina (1 sensibles y 5 resistentes), Ciprofloxacina (14 sensibles), Gentamicina (10 sensibles y 3 resistentes), Imipenem (7 sensibles), Meropenem (7 sensibles), Piperacilina-Tazobactam (4 sensibles y 3 resistentes), Trimetoprim–Sulfametoxazol (10 sensibles y 4 resistentes), Ertapemen (4 sensibles), Doripemen (4 sensibles), Amoxicilina/Ácido clavulánico (4 sensibles y 7 resistentes), Cefoxitina (3 sensibles y 4 resistentes), y Nitrofurantoina (12 sensibles y 1 resistente). Los porcentajes más altos de resistencia en orden descendiente fueron ampicilina con 78.57%, amoxicilina/ácido clavulánico con un 50%, ceftriaxona con 42%, cefazolina con 35%, cefoxitina y trimetoptim/sulfametoxazol con 28.57%, ceftazidima, gentamicina y piperacilina/tazobactam con 21.42%, amikacina y nitrofurantoina con 7.14%. Ciprofloxacino, imipenem, ertapenem, meropenem, y doripenem fueron sensibles en todas las muestras (Figura 3).

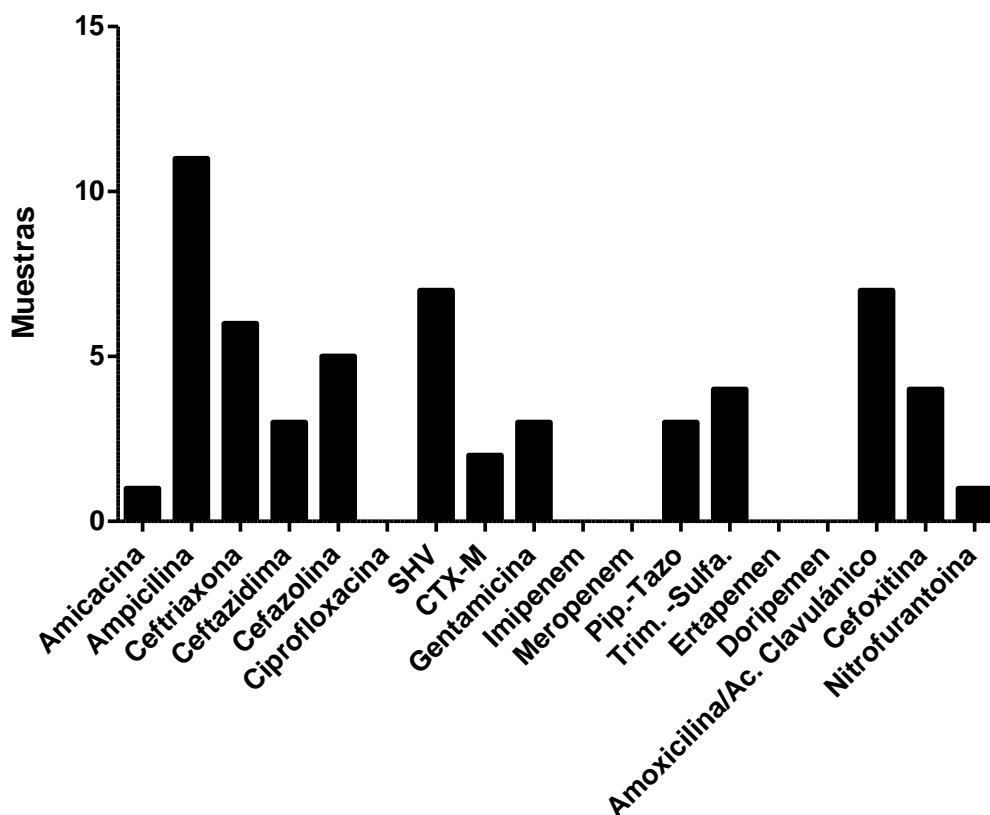


Figura 3. Perfil de resistencia ajustado a bacterias gram positivas y negativas.

Las cepas con mayor perfil de resistencia a betalactamasas fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Aeromonas hydrophila*, seguidas por las del género *Staphylococcus*.

Valores de biopelícula después de ser cuantificados utilizando una densidad óptica (OD630) nanómetros. Se utilizó una cepa control de biopelícula baja (*E. coli* DH5a), una cepa control de *S. aureus* ATCC 29213 alta y una cepa control alta de *P. aeruginosa*. Cada experimento se repitió tres veces en experimentos independientes y se obtuvo un promedio de cada muestra (Figura 4). 1.- 0,239000 (*K. pneumoniae*), 2.- 0,229000 (*K. pneumoniae*), 3.- 0,265000 (*E. cloacae*), 4.- 0,068000 (*S. aureus*), 5.- 0,062000 (*S. aureus*), 6.- 0,063500 (*E. faecalis*), 7.- 0,251000 (*P. aeruginosa*), 8.- 0,082000 (*S. aureus*), 9.- 0,057000 (*S. aureus*), 10.- 0,04000 (*S. aureus*), 11.- 0,263700 (*K. pneumoniae*), 12.- 0,063900 (*S. epidermidis*), 13.- 0,258000 (*P. aeruginosa*), 14.- 0,175000 (*A. hydrophila*), *S. aureus*: 0,131000, *E. coli*: 0,062000 y *P. aeruginosa*: 0,414000 (Figura 5). De acuerdo a los valores de los controles y las muestras clínicas se obtuvieron 7 muestras con alta producción de biopelícula (muestras 1, 2, 3, 7, 11, 13 y 14). Las restantes muestras fueron productoras bajas de biopelícula (4, 5, 6, 8, 9, 10 y 12).

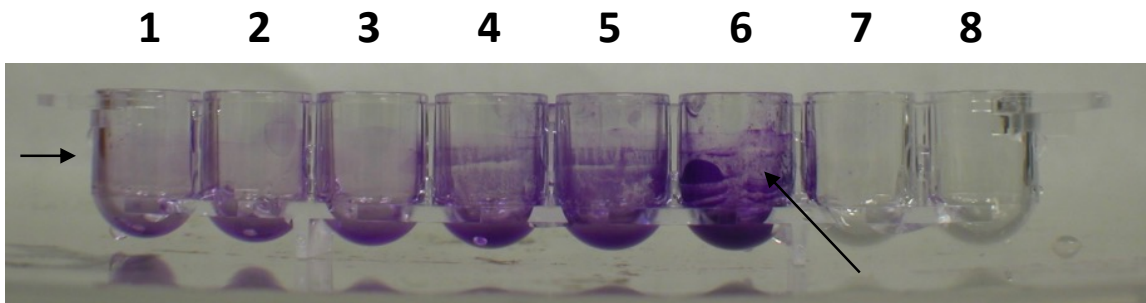


Figura 4.- Producción de biopelícula en placas de poliestireno teñida con cristal violeta al 0.1%. Pocillos de fondo en U, los tres primeros pozos pertenecen a la muestra 5 productora baja de biopelícula, los tres siguientes pozos pertenecen a la muestra 7 productora alta de biopelícula. Los dos últimos pozos son controles de medio de cultivo (control negativo). Las flechas negras indican la baja y alta producción de biopelícula, respectivamente.

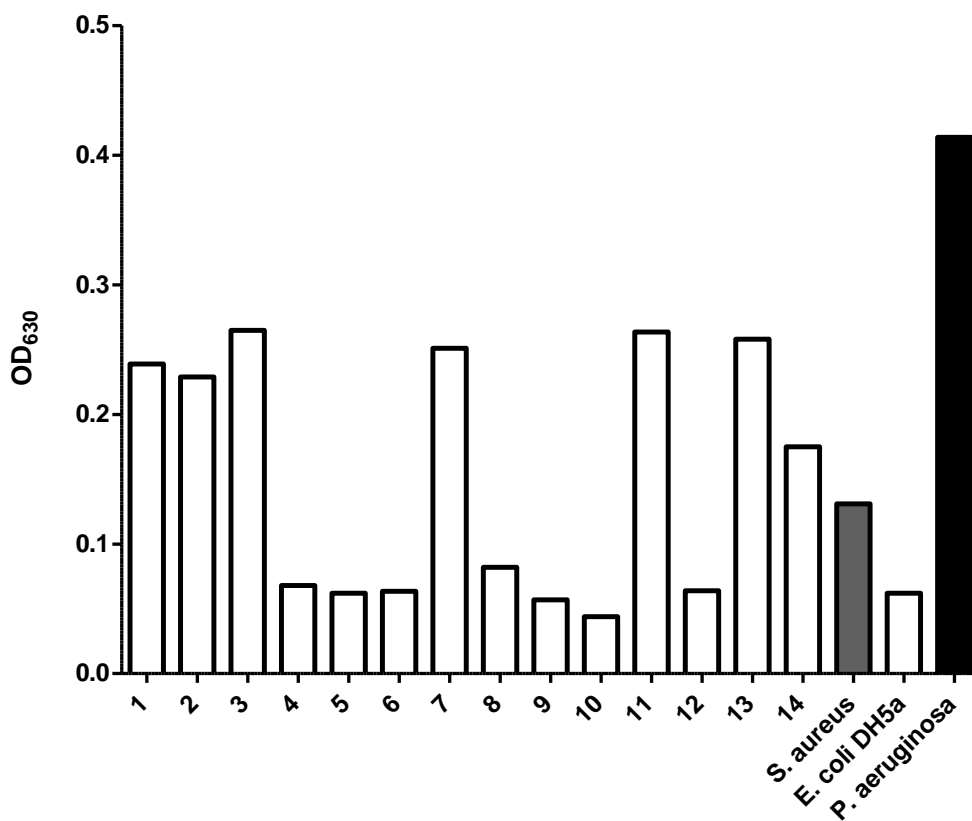


Figura 5. Producción de biopelícula en placa de poliestireno cuantificada por espectrofotometría (OD<sub>630</sub>). Como control de cepa alta productora se incluyó a *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* y como cepa baja productora a *E. coli* DH5.



## DISCUSIÓN

Tratándose de nuestro hospital, la muestra obtenida fue representativa, sin embargo existen otros estudios en los que esta es más grande, haciéndolos por ende de mayor impacto. Nuestra población al igual que la literatura arrojó al sexo femenino como predominante en padecer rinosinusitis crónica, en la misma proporción.

El estudio se diseñó para evidenciar las causas de resistencia a antibióticos de las bacterias gram positivas y negativas en pacientes con rinosinusitis crónica, en nuestro estudio predominaron *Staphylococcus aureus* entre los gram positivos, sin embargo, aislamos otras bacterias resistentes a los antibióticos, que consideramos que también es importante reportarlas. Las bacterias aisladas de nuestros pacientes, a diferencia de lo reportado, fueron diversas, teniendo a *Staphylococcus aureus* como principal bacteria aislada, representado el 35.72%, seguida de *Klebsiella pneumoniae* en un 21.42% y *Pseudomonas aeruginosa*, la cual se encontró presente en 14.28% de las muestras. Esto coloca a *Klebsiella pneumoniae* como principal bacteria gram negativa presente en nuestra población, lo que difiere con lo reportado por Thanasumpun y Batra quienes en 2015 mediante técnicas similares en recolección de muestra reportaron en segundo lugar de frecuencia a *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa* en quinto lugar y no aislaron *Klebsiella pneumoniae*. Foreman en su estudio de 50 pacientes reporta a *Staphylococcus aureus* como principal bacteria aislada, al igual que la mayoría de autores en distintos estudios quienes reportan a esta última bacteria como la más frecuentemente encontrada.

Chen reportó que el 54.2% de sus muestras presentó formación de biofilms, lo cual concuerda con lo obtenido por nosotros, en donde el 50% de nuestras bacterias lo produjeron, sin embargo no hace mención cuantitativa de la biopelícula formada por cada cepa bacteriana aislada, ya que utilizó un método cualitativo para determinar su presencia (microscopía electrónica). Entendiendo que la alta o baja producción de biopelícula es significativa en la respuesta al tratamiento de los pacientes, consideramos que es importante su determinación y reporte.

Las cepas aisladas por nosotros no mostraron resistencia a ciprofloxacino ni a otro tipo de quinolonas, a aminoglucósidos mostraron baja resistencia, pero si mostraron resistencia a antibióticos betalactámicos, principalmente penicilinas y cefalosporinas, arrojando a ampicilina y amoxicilina con ácido clavulánico como los antibióticos con más porcentaje de resistencia (78.57% y 50% respectivamente).

Teniendo en cuenta que el tratamiento para rinosinusitis según la guía de práctica clínica de nuestro país y otras guías de manejo internacionales relevantes nos sugieren a amoxicilina con ácido clavulánico como primera línea de tratamiento, podemos considerar, en base en nuestro estudio y al menos en nuestra población, que en caso de falla, es adecuado el uso de quinolonas, ya que no encontramos resistencias, y seguir las considerando como segunda línea

de tratamiento, tal como esta planteado en las guías. Esto se soporta también con otros estudios antes realizados, en los que se evidencia la resistencia a los antibióticos.

Siete de las cepas presentaron betalactamasas tipo SHV y 2 cepas presentaron tipo CTX-M, no hubo presencia de betalactamasas tipo TEM lo que en parte concuerda con lo encontrado en otros estudios ya que CTX-M no se identificó como la más frecuente.

Como se mencionó antes, de las 14 muestras solo 7 presentaron alta producción de biopelícula mismas que fueron bacterias gram negativas, así mismo estas mismas cepas fueron positivas a betalactamasas (7 cepas a SHV y 2 cepas a CTX-M), lo que potencia y explica la resistencia al tratamiento; mientras que en los gram positivos (*Staphylococcus*) se encontró en nuestro estudio resistencia a amoxicilina con ácido clavulánico en 40% con menor producción de biofilms.

## CONCLUSIONES

- En pacientes con rinosinusitis crónica con falla al tratamiento inicial, se identificaron mutaciones relacionadas a resistencia de betalactámicos por la producción de betalactamasas, siendo principalmente SHV, en bacterias también productoras de biofilms.
- No se identificaron mutaciones relacionadas a resistencia de quinolonas en bacterias productoras y no productoras de biofilms en pacientes con rinosinusitis crónica.
- Es de suma importancia obtener una muestra mayor, y mantener actualizada la bacteriología y el patrón de resistencias prevalentes, para confirmar las recomendaciones plasmadas en las guías de práctica clínica; este estudio apoya la recomendación actual.
- *Staphylococcus aureus* continúa siendo la bacteria más aislada en pacientes con rinosinusitis crónica, sin embargo no se deben descartar otras bacterias, principalmente del grupo de las gram negativas.
- Para tener una mejor respuesta clínica en nuestros pacientes se debe estandarizar la toma de cultivo y antibiograma en pacientes que no respondan al tratamiento médico convencional.

## REFERENCIAS

1. Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Robbins KT, Thomas JR, et al. Cummings Otolaryngology: Head and Neck Surgery. Sixth edition. Elsevier. 2015.
2. Johnson JT, Rosen CA. Bailey's -Head and Neck Surgery-Otolaryngology. Fifth edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2014.
3. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Kumar KA, Kramper M, et al. Clinical Practice Guideline (Update): adult Sinusitis. Otolaryngol Head Neck Surg. 2015;152:S1-S39.
4. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. Rhinol Suppl. 2012;23:1-299.
5. Slavin RG, Spector SL, Bernstein IL. The diagnosis and management of sinusitis: A practice parameter update. J Allergy Clin Immunol. 2005;116:S13-47.
6. Dirección General de Epidemiología. Anuario de morbilidad 2014. México, D.F. 2014. [Consultado en enero 2016]. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2014/principales/nacional/grupo\\_edad.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2014/principales/nacional/grupo_edad.pdf)
7. Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H, et al. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. BMC Infect Dis. 2013;13:210.
8. Biswas K, Hoggard M, Jain R, Taylor MW, Douglas RG. The nasal microbiota in health and disease: variation within and between subjects. Front Microbiol. 2015;6:134.
9. Manes RP, Batra PS. Bacteriology and antibiotic resistance in chronic rhinosinusitis. Facial Plast Surg Clin North Am. 2012;20:87-91.
10. Kim HJ, Lee K, Yoo JB, Song JW, Yoon JH. Bacteriological findings and antimicrobial susceptibility in chronic sinusitis with nasal polyp. Acta Otolaryngol. 2006;126:489-97.
11. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends in Microbiol. 2014;22:438-45.
12. Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 2001;32:S9-15.
13. Pruss GJ, Franco RJ, Chevalier SG, Manes SH, Drlica K. Effects of DNA gyrase inhibitors in Escherichia coli topoisomerase I mutants. J Bacteriol. 1986;168:276-82.
14. Drlica K. Bacterial topoisomerases and the control of DNA supercoiling. Trends Genet. 1990;6:433-7.
15. Baranello L, Levens D, Gupta A, Kouzine F. The importance of being supercoiled: how DNA mechanics regulate dynamic processes. Biochim Biophys Acta. 2012;1819: 632-8.

16. Webber MA, Ricci V, Whitehead R, Patel M, Fookes M, Ivens A, Piddock LJ. Clinically relevant mutant DNA gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance. *MBio* 2013;4:e00273-13.
17. Arnoldi E, Pan XS, Fisher LM. Functional determinants of gate-DNA selection and cleavage by bacterial type II topoisomerases. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:9411-23.
18. Corbett KD, Schoeffler AJ, Thomsen ND, Berger JM. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol.* 2005;351:545–61.
19. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2: 504-8.
20. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52: 385-92.
21. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem.* 2009;9: 981-98.
22. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34;1271-2.
23. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35: 1647-50.
24. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2000;31:S24-8.
25. Piddock LJ. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs.* 1999;58 (Suppl. 2):11-8.
26. Abraham EP, Chain E: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940;146:837.
27. Bush K, Jacoby GA: An updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969-976.
28. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care.* 2010;14:224.
29. Perine PL, Schalla W, Siegel MS, Thornsberry C, Biddle J, Wong K-H, Thompson SE: Evidence for two distinct types of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet.* 1977;2:993-7.
30. Sriver SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, McGeer A, Moore TC, Witwicki E: Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their beta-lactamases. Canadian *Haemophilus* study group. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:1678-80.
31. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211-33.

32. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R: Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1987;20:323-34.
33. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S: A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990;18:294-8.
34. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM: Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:509-13.
35. Hawkey PM: Prevalence and clonality of extended-spectrum betalactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 Suppl 1:159-65.
36. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N: CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-74.
37. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM: Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14; Suppl 1:154-8.
38. Bălășoiu M, Bălășoiu AT, Mănescu R, Avramescu C, Ionete O. *Pseudomonas aeruginosa* resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods. *Curr Health Sci J.* 2014;40:85-92.
39. Meltzer EO, Hamilos DL. Rhinosinusitis diagnosis and management for the clinician: a synopsis of recent consensus guidelines. *Mayo Clinic Proc.* 2011;86:427-43.
40. Cenetec. Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y tratamiento de sinusitis aguda. Disponible en: [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/080\\_GPC\\_Sinusitisaguda/Sinusitis\\_rr\\_cenetec.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/080_GPC_Sinusitisaguda/Sinusitis_rr_cenetec.pdf). Accedido el 19 de enero de 2016.
41. Thanasumpun T, Batra PS. Endoscopically-derived bacterial cultures in chronic rhinosinusitis: A systematic review. *Am J Otolaryngol.* 2015;36:686-91.
42. Chen HH, Liu X, Ni C, Lu YP, Xiong GY, Lu YY, Wang SQ. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis and their relationship with inflammation severity. *Auris Nasus Larynx.* 2012;39:169-74.
43. Foreman A, Psaltis AJ, Tan LW, Wormald PJ. Characterization of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2009;23:556-61.
44. Bhattacharyya N, Kepnes LJ. Assessment of trends in antimicrobial resistance in chronic rhinosinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008;117:448-52.
45. Kingdom TT, Swain RE. The microbiology and anti-microbial resistance patterns in chronic rhinosinusitis. *American J Otolaryngol.* 2004;25:323-8.

46. Guss J, Doghramjia L, Edelsteinb PH, Chiu AG. Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in chronic rhinosinusitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2009;71:263–7.
47. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol.* 1989;8:151-6