

# INTERFERENCIA ENTRE BACTERIAS COMENSALES DE FARINGE Y PATÓGENAS DE OÍDO MEDIO EN UN MODELO ANIMAL DE OTITIS MEDIA

Villafañe LM<sup>2</sup>, González ML<sup>1</sup>, Valdez JC<sup>2</sup>, Villagra de Trejo A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología - Hospital del Niño Jesús. Tucumán, Argentina.

<sup>2</sup>Catedra de Inmunología - Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia- Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

CIMEL 2012; 17(1):7-11

## RESUMEN

**Objetivo:** determinar in vivo la interacción entre bacterias comensales aisladas de faringe de niños sanos y *S. pneumoniae*, en un modelo animal (*Chinchilla laniger*) de otitis media. **Metodos:** estudio experimental Intervenciones: Suspensiones de los serotipos 18A y 9V de Spn fueron inyectados intra-peritonealmente en dos chinchillas y luego recuperados mediante cultivo de órganos y sangre de las mismas. Empleando suspensiones de las cepas animalizadas se inocularon intranasalmente cuatro chinchillas, y solo a dos de ellas se le inoculo una mezcla de las bacterias comensales (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguinis*). Con un otoscopio se examinó la evolución de la infección a los 7 y 14 días. Se sacrificaron los animales y se tomaron muestras de los oídos para un examen histológico. **Resultados:** Mediante otoscopia, se observó al día 14 que todos presentaron una membrana timpánica hiperémica sin efusión, presentándose con mayor intensidad en aquellos que recibieron el tratamiento. La histología confirmó que la administración del tratamiento no evitó que la infección evolucionara, advirtiéndose que las infectadas con el serotipo 8A y tratadas fueron las que presentaron el tejido epitelial menos comprometido respecto al resto. **Conclusiones:** Spn y las bacterias comensales podrían establecer una relación competitiva, y el efecto moderador en la progresión de la infección de otitis media dependería del serotipo involucrado.

*Palabras Clave:* Otitis media; modelo animal; *S. pneumoniae*; *Chinchilla laniger*; Probiótico.

## INTEREFERENCE BETWEEN PHARYNX'S COMMENSAL BACTERIA AND MIDDLE EAR'S PATHOGENIC IN AN ANIMAL MODEL OF OTITIS MEDIA

### ABSTRACT

**Objective:** to determine in vivo interaction between commensal bacteria isolated from throat of healthy children and *S. pneumoniae* in an animal model (*Chinchilla laniger*) of otitis media. **Methods:** experimental study. Interventions: Suspensions of serotypes 18A and 9V Spn were injected intraperitoneally into two chinchillas and then recovered by culture of organs and blood of the same. Using the strains suspensions animalized four chinchillas were inoculated intranasally, and only two of them was inoculated with a mixture of commensal bacteria (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguinis*). With an otoscope examined the evolution of infection at 7 and 14 days. Animals were sacrificed and the ears were sampled for histological examination. **Results:** By otoscopy, was observed by day 14 all showed a hyperemic tympanic membrane without effusion, being more intense in those receiving treatment. Histology confirmed that the administration of treatment did not prevent infection evolve, noting that those infected with serotype 8A and treated were those that showed the least compromised epithelial tissue from the rest. **Conclusions:** Spn and commensal bacteria could establish a competitive relationship, and the moderating effect on the progression of the infection otitis media depend on the serotype involved.

*Keywords:* Otitis media; animal model; *S. pneumoniae*; *Chinchilla laniger*; Probiotic.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones de la vía respiratoria superior, incluida la otitis media, son las enfermedades más frecuentes en la población pediátrica. La creciente resistencia a los agentes antimicrobianos ha hecho que el tratamiento de la otitis media aguda sea más difícil; por lo que, un tratamiento antibiótico inadecuado o insuficiente, puede ser un factor predisponente a la cronicidad de la infección; además, el uso excesivo e inadecuado de éstos lleva a considerables gastos para el sistema de salud público así como al paciente en particular (Bernztein y col., 2007).

*Streptococcus pneumoniae* es uno de los organismos más frecuentemente aislados de pacientes con meningitis, neumonía y otitis media (OM). Recientes hallazgos apoyan la hipótesis de que los biofilms juegan un importante papel etiológico en otitis media y sus complicaciones frecuentes, como otorrea post-timpanostomía.<sup>1,2</sup> Son comunidades complejas y organizadas de bacterias que crecen en asociación con una amplia gama de superficies bióticas y abióticas. Los biofilms son inherentemente resistentes a

los agentes antimicrobianos y la causa de la persistencia de las infecciones bacterianas asociadas a implantes, y enfermedades como la fibrosis quística, infecciones del tracto urinario, y la periodontitis.<sup>3</sup> Se cree que la eficacia reducida de los antibióticos contra las bacterias que están dentro de un biofilm es debido a una tasa metabólica reducida de las bacterias y la limitada disponibilidad de oxígeno dentro del biofilm.<sup>4</sup> Estudios recientes han demostrado que las especies de estreptococos orales “comensales”, se unen eficientemente a células epiteliales faríngeas humanas, actuando como antagonistas de la adhesión y crecimiento de *Streptococcus pyogenes*.<sup>5</sup> Esto sugiere que especies como *S. salivarius*, *S. oralis*, entre otros estreptococos comensales podrían ser seleccionados como probióticos en infecciones causadas por estreptococos patógenos. La importancia de la flora normal para proteger contra patógenos ha sido demostrada en el tracto respiratorio superior debido a que se encontró una disminución sustancial de las bacterias comensales en los pacientes con reinfecciones en faringe y oído medio.

El objetivo de este trabajo fue determinar in vivo la interacción entre bacterias comensales aisladas de niños sanos y *Streptococcus pneumoniae* (Spn), en un modelo animal (*Chinchilla laniger*) de otitis media.

## MATERIALES Y METODOS

Modelo experimental prospectivo.

**Cepas: Bacterias Patógenas:** Se emplearon dos cepas serotificadas (18A y 9V) de Spn aisladas de niños con otitis del Hospital de Niños Jesús. Se preparó suspensiones de las cepas 9V y 18A de Spn diluyendo en caldo Todd Hewitt cultivos over night de los mismos, y la densidad bacteriana de la dilución se confirmó por recuento en placa ( $1 \times 10^8$  UFC/ml). **Bacterias Comensales:** Se trabajó con suspensiones de  $1 \times 10^8$  UFC/ml de *Streptococcus mitis* y *Streptococcus parasanguinis* identificadas por genotipificación, aisladas de la faringe de niños sanos, que se emplearon para la preparación de un probiótico como tratamiento.

**Modelo animal:** Previamente a la infección, chinchillas adultas sanas (*Chinchilla laniger*) se examinaron mediante otoscopia para descartar un proceso infeccioso previo.<sup>6,7</sup>

**Animalización:** 200µl de las suspensiones de Spn ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) se inyectaron intra-peritonealmente a dos chin-

chillas, una para cada serotipo. A las 24 horas fueron sacrificadas y se extrajeron los órganos: hígado, corazón, bazo y pulmón, disgregaron en caldo TH, realizaron diluciones sucesivas, y éstas se sembraron en medio agar sangre de carnero y agar chocolate enriquecido con polivitex (bioMérieux) e incubadas en microaerobiosis a 37°C.

**Modelo de infección de otitis media:** Suspensiones de  $1 \times 10^8$  UFC/ml de las cepas animalizadas se instilaron intranasalmente a ocho chinchillas (cuatro Spn9V y cuatro Spn18A), y cuatro de ellas los días 14 y 21 post-infección, recibieron una mezcla de las bacterias comensales (*S. mitis*, *S. parasanguinis*) como tratamiento probiótico. **Control negativo:** dos chinchillas instiladas intranasalmente con solución fisiológica.

**Seguimiento de la infección:** Con un otoscopio, se evaluó el estado del conducto auditivo de los animales a los 7, 14 y 21 días post-infección. El día 28 post-infección, se tomaron hemocultivos de control para determinar la ausencia de bacteremia. Luego de ser sacrificadas, se extrajeron de cada una sus órganos, disgregaron en caldo TH, se realizaron diluciones sucesivas, y éstas se cultivaron en medio agar sangre de carnero y agar chocolate enriquecido con polivitex.<sup>9</sup>

**Histología:** Luego del sacrificio, las cabezas extraídas se fijaron en formalina al 10% (fijador universal) por 24 horas para luego realizar la descalcificación. **Descalcificación:** Se lavó con agua corriente e inmediatamente se dejó en 100ml de solución acuosa de ácido nítrico al 5% a temperatura ambiente, durante 36 horas. Luego se continuó con el proceso de deshidratación e impregnación en parafina empleando técnicas tradicionales.<sup>10</sup>

Una vez obtenido el taco de parafina, se realizaron cortes de 5 micrones de espesor. Los cortes histológicos de oído que se obtuvieron se montaron en portaobjetos tratados previamente con una solución adherente (gelatinizados o albuminizados). Se realizó coloración de hematoxilina-eosina.

## RESULTADOS

Al séptimo día el tejido del canal auditivo mostraba un escaso aumento de la vascularización. En el día 14, todas presentaron una membrana timpánica hiperémica sin efusión. En las chinchillas del primer grupo se observó que el canal auditivo de la Chinchilla infectada con Sp-

n18A presentó mayor vascularización que la que fue infectada con el Spn9V. Mientras que en las del segundo grupo, se observó que la Chinchilla infectada con el 18A presentó menos vascularización que la infectada con el 9V, presentándose en esta última una hiperemia que se extendía hasta el tímpano. Cuando se comparó el estado del tejido auditivo de las chinchillas infectadas con el serotipo 18A, aquella que fue inoculada además con la mezcla de comensales, presentó menos vascularización que la que no los recibió; lo contrario ocurrió con las que recibieron el serotipo 9V, siendo el canal auditivo de la que recibió los comensales, el más afectado. En todos los casos se establecieron en el oído medio infecciones localizadas y no se obtuvieron infecciones invasivas como meningitis y bacteremia, como evidenciaron los hemocultivos y los cultivos de órganos realizados, los cuales dieron negativo para *S. pneumoniae*.

Sin embargo al observar los preparados histológicos (Figuras 1 y 2), pudimos interpretar con mayor claridad la situación del tejido. Para el caso de los animales que no recibieron el tratamiento, en la luz del conducto se observó hiperemia activa en la dermis, eritrocitos en la secreción sebácea, edema y epidermis irregular debido a engrosamiento. Mientras que en los animales que recibieron el tratamiento, la infección progresó aun estado crónico encontrándose focos hemorrágicos, edema, hiperemia, un exudado purulento con presencia de eritrocitos y bacterias, además de una ligera acantosis focalizada en la epidermis.

## DISCUSIÓN

*Chinchilla laniger* ha sido empleada para demostrar la capacidad de *S. pneumoniae* de formar biolm en nasofaringe y oído medio (Hoa y col. 2009), utilizando la inyección transbular. No empleamos este método, debido a su elevada tasa de mortalidad post-infección, dificultando la evaluación del tratamiento alternativo con probióticos. Otro inconveniente del método es que solo reproduce parcialmente la forma en que se establece la infección en el oído medio humano, ya que la inyección transbular facilita la translocación de los patógenos inyectados a otras partes del organismo del animal, estableciendo en pocos días bacteriemia y/o meningitis neumocócica.

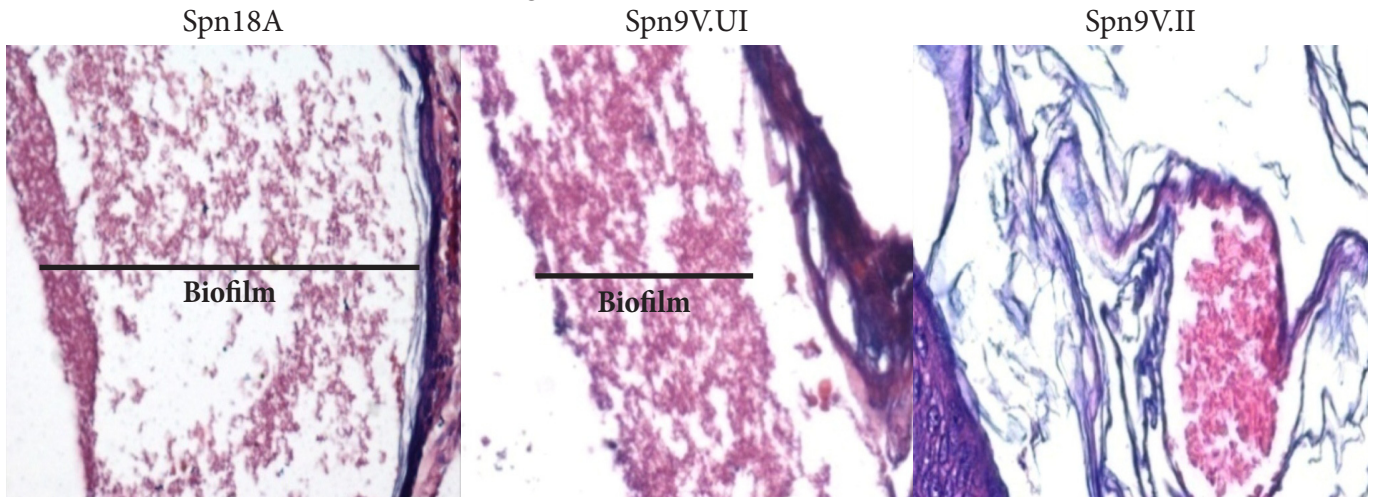
Giebink y col. establecieron el modelo de otitis media basada en la infección intranasal simultánea de

*S. pneumoniae* y virus de la Influenza A, logrando que este modelo reproduzca mejor las condiciones que acompañan a la otitis media en los seres humanos (Giebink y col. 1980). El empleo del virus de la Influenza A incrementa la eficacia de la inducción de la infección. Para realizar este trabajo, nos basamos en este modelo de infección intranasal, sin el uso de virus respiratorios. Nuestros resultados demuestran que es posible inducir OM en *Chinchilla laniger*, si previamente las bacterias son animalizadas. Todas las chinchillas infectadas con las cepas animalizadas desarrollaron OM, contrariamente a lo que comunicaron Giebink y col. en 1980, donde solamente el 20% de las chinchillas presentó OM luego de la inoculación solo con las bacterias. Este es un hallazgo importante que permite el desarrollo de OM sin la complicación de tener que disponer de virus respiratorios, lo que implica trabajar con métodos virológicos complejos y el riesgo biológico asociado.

En este trabajo, se ha probado la capacidad de inhibir la formación de biofilm de las bacterias comensales a los días 14 y 21 post infección. Los resultados obtenidos muestran que dicha inhibición dependería de la cepa de *S. pneumoniae* involucrada. Dado que el biofilm y su arquitectura varía según las condiciones ambientales y la cepa de Spn implicada, la capacidad de inhibición podría depender de la facilidad con que difunden los metabolitos de las bacterias comensales en el biofilm y la fase de crecimiento en las que éstas son sintetizadas, ya que se ha comprobado que algunas cepas de *S. pneumoniae* producen bacteriocinas activas contra otras bacterias gram-positivas y en algunos casos contra otras cepas de *S. pneumoniae*.

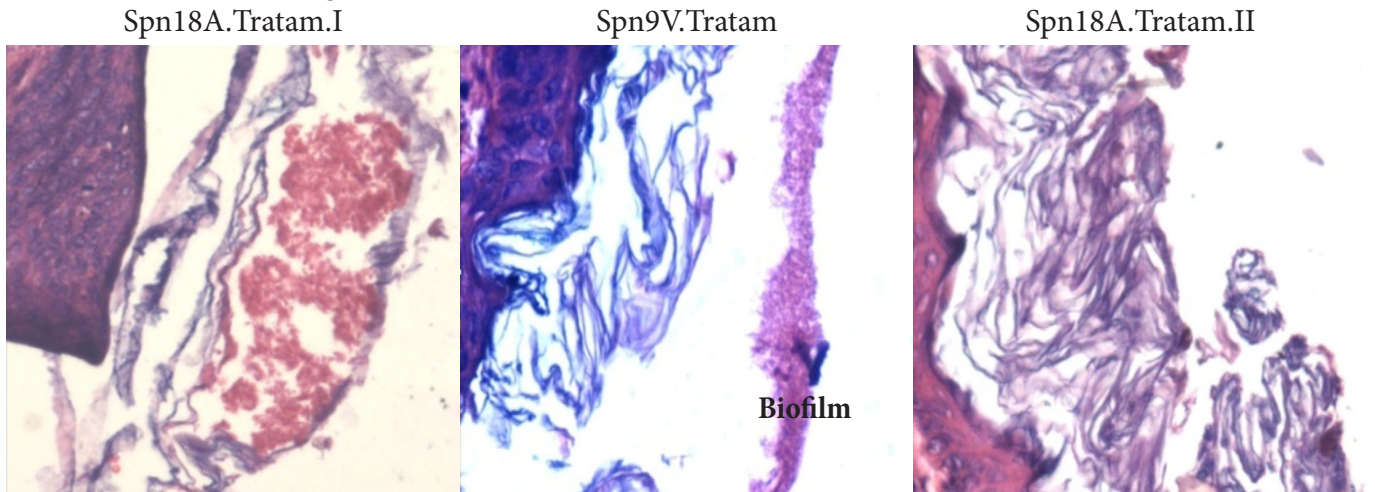
Basados en estos datos, podemos concluir que en las condiciones de este experimento, *S. pneumoniae* y las bacterias comensales orales estudiadas pueden establecer una relación competitiva durante la infección de otitis media, y que la aparente moderación de la progresión de la infección de otitis media dependería del serotipo involucrado, estableciendo una base para la búsqueda de otras bacterias comensales competitivas o sus productos de secreción para su empleo como tratamiento alternativo en niños con otitis media.

**Figura 1: Control de Infección**  
Spn9V.UI



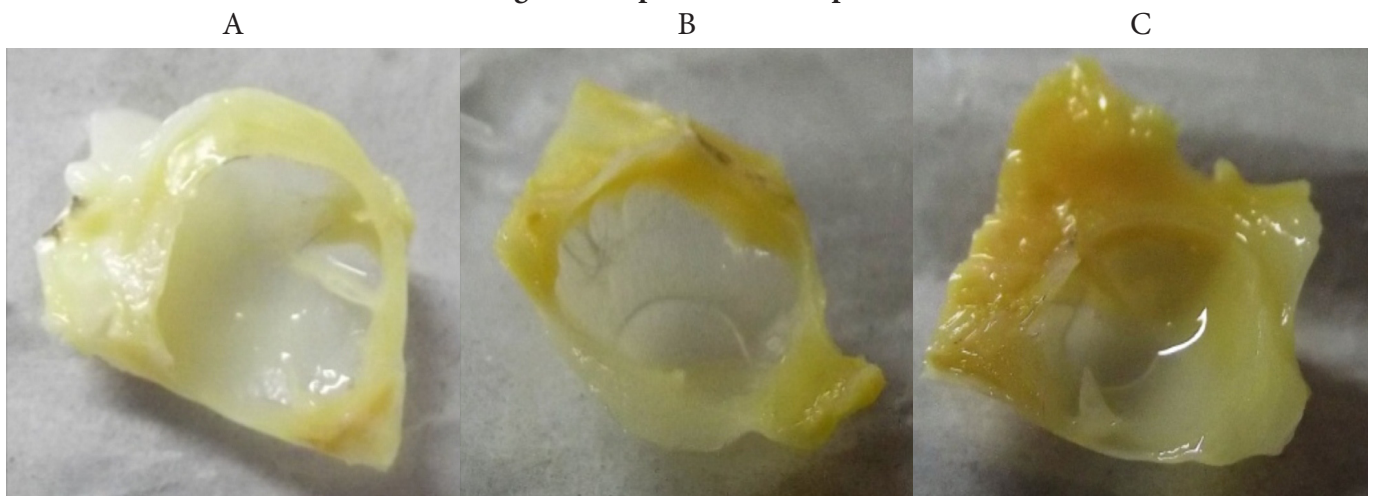
La infección con las cepas Spn18A y Spn9V, muestran un importante desarrollo de biofilm para ambos serotipos. Sin embargo, en los animales infectados con ambos serotipos fue frecuente observar áreas con colonias de Spn inmersas en secreción mucosa (Spn9V.II). (Fotos 40x)

**Figura 2: Tratamiento con el probiótico (bacterias comensales)**



Cortes histológicos de bulas infectadas con los distintos serotipos de Spn y tratadas con el probiótico. Se observa que la inhibición en la formación de biofilm fue mayor para Spn9V (Spn9V.Tratam). La administración del probiótico provocó un incremento en la producción de secreción mucosa (Spn18A.Tratam.II). (Fotos 40x)

**Figura 3: Aspecto macroscópico**



Bulas de chinchillas infectadas. A: Control positivo de infección. Puede verse el aumento de opalescencia debido al biofilm. B y C: Bulas de chinchillas infectadas y tratadas con el probiótico. Observar el cambio de la opalescencia debido a la disminución del biofilm en las zonas afectadas.

**Correspondencia:**

Villafañe Luciana M.

Laboratorio de Microbiología. Hospital del Niño Jesús.  
Pje hungria 750. San Miguel de Tucumán. Tucumán,  
Argentina.

Correo-e: amar\_es\_lucy@hotmail.com

**Recibido:** 02-11-2012

**Aprobado:** 09-12-2012

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Moscoso M, García E, López R. Pneumococcal biofilms. *Internacional Microbiology* 2009;12:77-85
2. Claudia Trappetti, Luciana Gualdi, Lorenzo Di Meola, Prashant Jain, Cindy Korir, Paul Edmonds, Francesco Iannelli, Susanna Ricci, Gianni Pozzi, Marco R Oggioni. The impact of the competence quorum sensing system on *Streptococcus pneumoniae* biofilms varies depending on the experimental model. *BMC Microbiology* 2011, 11:75
3. Sanchez C, Shivshankar P, Stol K, Trakhtenbroit S, Sullam P, Sauer K, Hermans P, Orihuela C. The Pneumococcal Serine-Rich Repeat Protein Is an Intra-Species Bacterial Adhesin That Promotes Bacterial Aggregation In Vivo and in Biofilms. *PLoS Pathogens* 2010; Vol. 6; Issue 8 : e1001044
4. Bakalets L. Chinchilla as a robust, reproducible and polymicrobial model of otitis media and its prevention. *Expert Rev. Vaccines* 2009; 8(8), 1063-1082
5. Kreth J, Zhang Y, Herzberg M. Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 2008; Vol. 190, No 13: 4632-4640.
6. Coenye T, Nelis H. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 2010;83: 89-105
7. Ehrlich G, Veeh R, Xue Wang, Costerton J, Hayes J et al. Mucosal Biofilm Formation on Middle-Ear Mucosa in the Chinchilla Model of Otitis Media. *JAMA*. 2002;287:1710-1715
8. Giebink G, Berzins I, Marker S, Schiffman G. Experimental otitis media after nasal inoculation of *Streptococcus pneumoniae* and influenza A virus in chinchillas. *Infect. Immun.* 1980, 30(2):445.
9. Weimer K, Armbruster C, Juneau R, Hong W, Bing Pang, Swords W. Coinfection with *Haemophilus influenzae* promotes pneumococcal biofilm formation during experimental otitis media and impedes the progression of pneumococcal disease. *J Infect Dis.* 2010 October 1; 202(7): 1068-1075. doi:10.1086/656046
10. Loreto Carrasco M., Maass C, Dentone L, Miranda G, Kukuljan M. Estudio morfológico del oído medio e interno de la Chinchilla laniger. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* (online) 2008; vol.68: n.3 ISSN 0718-4816