



# Detección de biopelículas en tejido de amígdalas y adenoides en pacientes con procesos infecciosos crónicos y obstructivos

## Detection of biofilms in tonsil and adenoid tissue in patients with chronic and obstructive infectious processes.

Nadia B Villanueva-Ramos,<sup>1</sup> Alma R De la Mora-Fernández,<sup>2</sup> Efrén R Ríos-Burgueño,<sup>3</sup> Felipe de J Peraza-Garay<sup>4</sup>

### Resumen

**ANTECEDENTES:** Una de las afecciones otorrinolaringológicas más frecuentes es la relacionada con amígdalas y adenoides. La resistencia a antibióticos y cronicidad de esta enfermedad pueden deberse a comunidades estructuradas de bacterias adheridas a la superficie epitelial, conocidas como películas.

**OBJETIVO:** Analizar la existencia de biopelículas en tejido adenoamigdalino de pacientes con cuadros infecciosos o con cuadros obstructivos.

**MATERIAL Y MÉTODO:** Estudio descriptivo, observacional, transversal y prospectivo, en el que se analizó tejido obtenido de cirugías de pacientes con hipertrofia adenoamigdalina, amigdalitis crónica o ambas, de agosto de 2014 a noviembre de 2016; se determinó la existencia de biopelículas por histopatología y variables demográficas.

**RESULTADOS:** Se incluyeron 138 muestras de 73 pacientes (52.9%) masculinos y 65 (47.1%) mujeres, con edad media de 13.8 años (intervalo: 2-62 años). Las biopelículas se encontraron en 43.7% de los pacientes. Se relacionó la detección de biopelículas en cada proceso patológico, no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Se demostró la existencia de biopelículas en 96 muestras (69.6%) usando microscopía de luz, de éstos, 65 pacientes (72.2%) fueron de padecimiento infeccioso y 31 pacientes (64.6%) de enfermedad obstructiva ( $p = 0.438$ ). No hubo diferencia significativa entre la existencia de biopelículas asociada con proceso adenoamigdalino infeccioso u obstructivo.

**CONCLUSIONES:** Se demostró la existencia de biopelículas en 69.6% usando microscopía de luz y tres tinciones.

**PALABRAS CLAVE:** Amígdala palatina; amígdala faríngea; biopelículas; amigdalitis.

### Abstract

**BACKGROUND:** One of the most frequent otorhinolaryngological conditions is related to tonsils and adenoids. The resistance to antibiotics and chronicity that this disease presents may be due to the presence of structured communities of bacteria adhered to the epithelial surface, known as biofilms.

**OBJECTIVE:** To analyze the presence of biofilms in adenotonsillar tissue of patients with infectious diseases or with obstructive symptoms.

**MATERIAL AND METHOD:** A descriptive, observational, cross-sectional and prospective study was done in which tissue obtained postoperatively in patients with adenotonsillar hypertrophy and/or chronic tonsillitis was included within the period from August 2014 to November 2016; the presence of biofilms was determined by histopathology; demographic variables were also reported.

**RESULTS:** 138 samples were included, 73 patients (52.9%) were men and 65 women (47.1%) with an average age of 13.8 years (range: 2-62 years). The biofilms were found

<sup>1</sup> Residente de cuarto año de Otorrinolaringología.

<sup>2</sup> Jefe y médico adscrito al Servicio de Otorrinolaringología.

<sup>3</sup> Jefe y médico adscrito al Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Civil de Culiacán, Culiacán, Sinaloa.

<sup>4</sup> Doctor en Estadística. Asesor estadístico y metodológico, Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS), Culiacán, Sinaloa.

**Recibido:** 15 de octubre 2018

**Aceptado:** 2 de enero 2019

### Correspondencia

Nadia Villanueva Ramos  
nadia.villanueva.ramos@gmail.com

### Este artículo debe citarse como

Villanueva-Ramos NB, De la Mora-Fernández AR, Ríos-Burgueño ER, Peraza-Garay FJ. Detección de biopelículas en tejido de amígdalas y adenoides en pacientes con procesos infecciosos crónicos y obstructivos. An Orl Mex. 2019 enero-marzo;64(1):1-7.

in 69.6% of the patients, of these, 65 (72.2%) were of infectious pathology and 31 (64.6%) of obstructive disease ( $p = 0.438$ ). Relating the detection of biofilms in each pathological process, no statistically significant difference was found. The presence of biofilms was demonstrated in 96 (69.6%) using light microscopy. There was no significant difference between the presence of biofilms associated with adenoamigdaline infection or obstructive process.

**CONCLUSIONS:** The presence of biofilms was demonstrated in 69.6% using light microscopy and three stains.

**KEYWORDS:** Palatine tonsil; Pharyngeal tonsil; Biofilms; Tonsillitis.

## ANTECEDENTES

Una de las enfermedades otorrinolaringológicas más frecuentes es la relacionada con amígdalas palatinas y adenoides; se están volviendo crónicas y resistentes a los tratamientos antibióticos de primera elección.<sup>1</sup> La administración indiscriminada de antibióticos puede ser un factor causal de esta resistencia; sin embargo, ésta también puede deberse a la existencia de biopelículas.<sup>2,3</sup> El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDCP) estima que incluso 65% de los procesos infecciosos que afectan a los humanos se asocian con biopelículas bacterianas.<sup>4</sup> La biopelícula se define como una comunidad estructurada de bacterias contenida en una matriz polimérica autoproducida, que está adherida a una superficie y es la forma más común en la que las bacterias existen en la naturaleza.<sup>5</sup> Chole y Faddis fueron los primeros en demostrar evidencia anatómica de biopelículas en enfermedad crónica amigdalina, observándolas sobre todo en las criptas de las amígdalas, aparecían como grandes y densas acumulaciones de diferentes bacterias.<sup>6</sup>

El objetivo de este estudio es detectar la existencia de biopelículas en la superficie epitelial de tejido amigdalino y adenoideo de pacientes

intervenidos quirúrgicamente, con diagnóstico de amigdalitis crónica o de hipertrofia adenoamigdalina, estudiando la prevalencia y relación de biopelículas y estos procesos patológicos, así como determinar si la existencia de biopelículas está directamente relacionada con procesos infecciosos o si también se encuentran en procesos obstructivos de hipertrofia adenoamigdalina.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio descriptivo, observacional, transversal y prospectivo en el que se incluyeron todos los pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente de amigdalectomía con o sin adenoidectomía por parte del servicio de Otorrinolaringología del Hospital Civil de Culiacán, con el diagnóstico de amigdalitis crónica, hipertrofia adenoamigdalina obstructiva o ambas, en el periodo comprendido de agosto de 2014 a noviembre de 2016. El diagnóstico de amigdalitis crónica se definió como siete episodios de amigdalitis aguda en un año, cinco episodios en dos años consecutivos o tres episodios por año durante tres años consecutivos con documentación médica de padecer en cada episodio dolor de faringe y uno o más de los siguientes: temperatura  $> 38.3^{\circ}\text{C}$ , adenopatía cervical o exudado amigdalino. El diagnóstico de hipertrofia amigdalina se estableció utilizando



los grados de hipertrofia de amígdala palatina (0-4) y de hipertrofia adenoidea si el paciente tenía obstrucción nasal, ronquido, respiración oral, voz hiponasal y radiografía lateral de cuello con obstrucción de más de 50% de la vía aérea por vegetación adenoidea (radiografía solicitada en caso de sospecha clínica). Se incluyeron pacientes sin edad específica y de uno y otro sexo. Se excluyeron los pacientes con sospecha de malignidad y se eliminaron muestras no procesadas o en mal estado.

Las muestras quirúrgicas recolectadas se depositaron en botes de muestra tamaño estándar en formaldehído a 10%, marcadas como amígdalas y adenoides y enviadas al servicio de Patología para su análisis histopatológico. El análisis lo realizaron dos patólogos. Mediante microscopia de luz se utilizaron las tinciones hematoxilina y eosina (HyE), ácido peryódico de Schiff (PAS) y tinción de Gram y se buscó la existencia o no de biopelículas de acuerdo con características establecidas por el departamento de Patología; se consideró positivo si se observaba mínimo en una tinción; no fue intención del estudio cuantificar la cantidad de biopelícula, se buscó la existencia generalizada de microorganismos en mucosa localizada sobre superficie epitelial.

### Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS. Se usaron medidas de tendencia central y de dispersión. Se utilizó prueba  $\chi^2$ , ANOVA de una vía. Un valor  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

En el periodo establecido se programaron 187 cirugías relacionadas con amígdalas, adenoides o ambas, de éstas se eliminaron 33 por cancelación de cirugía, 14 muestras no se procesaron y 2 se excluyeron por sospecha de malignidad,

por lo que quedó un total de 138 muestras que se incluyeron en este protocolo. Los datos demográficos y los tipos de cirugía realizada se muestran en el **Cuadro 1**.

Noventa pacientes (65.1%) tuvieron enfermedad infecciosa y 48 pacientes (34.7%) obstructiva (**Cuadro 1**). La media de edad de pacientes con enfermedad infecciosa fue de 17.8 años y con afección obstructiva fue de 6.4 años ( $p = 0.00$ ).

Al comparar el proceso infeccioso u obstructivo con los diferentes grados de hipertrofia de amígdala palatina, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.105$ ). La enfermedad que en su mayor parte se manifestó con hipertrofia amigdalina grado I fue la infecciosa ( $n = 7$ , 7.8%), la hipertrofia amigdalina grado II se manifestó igualmente en su mayor parte en enfermedad infecciosa ( $n = 26$ , 28.9%), el gra-

**Cuadro 1.** Aspectos demográficos, tipo de cirugía y tipo de enfermedad

| Edad                       | 13.8 años (2-62)   |
|----------------------------|--|
| Género                     | Hombres: 73 (52.9%)<br>Mujeres: 65 (47.1%)   |
| Tipo de cirugía            | Amigdalectomía: 51 pacientes (37%)<br>Adenoamigdalectomía: 77 pacientes (55.8%)<br>Adenoamigdalectomía + TV: 7 pacientes (5.1%)<br>Adenoidectomía + TV: 1 paciente (0.7%)<br>Adenoidectomía + septoplastia: 1 paciente (0.7%)<br>Adenoidectomía: 1 paciente (0.7%) |
| Enfermedad                 | Infecciosa: 90 pacientes (65.1%)<br>Obstructiva: 48 pacientes (34.7%)  |
| Tiempo de evolución (años) | Infecciosa: $3.8 \pm 2.4$<br>Obstructiva: $3.0 \pm 1.9$  |

TV: tubos de ventilación.

do de hipertrofia III se manifestó sobre todo en proceso obstructivo (n = 25, 52.1%) y el grado de hipertrofia IV se manifestó con más frecuencia en pacientes con enfermedad obstructiva (n = 15, 31.2%).

La hipertrofia de adenoides se reportó en 79 pacientes (57.2%); en la enfermedad infecciosa se manifestó en 34 pacientes (37.8%) y en la obstructiva en 45 pacientes (93.8%; p = 0.000).

La hipertrofia de adenoides se manifestó con más frecuencia en los grados III y IV de hipertrofia de amigdalina palatina en 46.8 y 36.7%, respectivamente (p = 0.00).

El tiempo de evolución tuvo media de 3.8 años en pacientes con enfermedad infecciosa y 3 años en enfermedad obstructiva (p=0.035). **Cuadro 1**

Las biopelículas se encontraron en 96 muestras de las 138 analizadas (69.6%) independientemente de la tinción utilizada; de éstas, 65 (72.2%) fueron de enfermedad infecciosa y 31 (64.6%) de enfermedad obstructiva (p = 0.438).

#### **Cuadro 2**

Se encontraron biopelículas con frecuencia de 66 de los 138 pacientes (47.8%) utilizando la tinción de hematoxilina-eosina, con la tinción de PAS se detectaron biopelículas en 44 pacientes (31.9%) y en 69 pacientes (50%) utilizando la tinción de Gram. Al relacionar la detección de biopelículas en cada proceso patológico con las diferentes tinciones, no se encontró diferencia estadísticamente significativa (**Cuadro 3**).

De acuerdo con el grado de hipertrofia de amígdala palatina, las biopelículas se detectaron con más frecuencia en el grado III en 44 (45.8%) muestras; sin embargo, no representó significación en comparación con los otros grados (p = 0.152). **Cuadro 4**

En 53 casos de hipertrofia adenoidea se detectaron biopelículas (p = 0.575). **Cuadro 5**

## **DISCUSIÓN**

Las biopelículas existen desde épocas muy remotas en todo el ambiente. En el ser humano pueden condicionar la existencia y supervivencia de microcolonias bacterianas que son resistentes a tratamiento; esta resistencia puede ser dada por su matriz polimérica autoproducida y extracelular que las hace demasiado voluminosas para ser fagocitadas siendo el sistema inmunitario humoral incapaz de eliminarlo.<sup>7</sup> Para su identificación hay muchos métodos. Es difícil que las biopelículas bacterianas crezcan en cultivos, por lo que la visualización directa de éstos ha sido clave para su identificación. El estudio ideal para identificar las biopelículas es la microscopía electrónica y de barrido; sin embargo, con técnicas más simples y accesibles puede buscarse la existencia de biopelículas.<sup>3,4,7,8</sup> Nuestro estudio recomienda hacer las tres tinciones por muestra (hematoxilina-eosina, PAS y de Gram), porque si se realiza por separado el porcentaje de detección es menor. No hubo diferencia significativa entre las tinciones utilizadas para detectar biopelículas. La tinción que más biopelículas detectó fue la de Gram (50%); sin embargo, no tuvo un valor significativo para ser

**Cuadro 2.** Biopelícula según enfermedad

| Enfermedad  | Infecciosa   | Obstructiva  | Total         | p     |
|-------------|--------------|--------------|---------------|-------|
| Biopelícula | 65/90, 72.2% | 31/48, 64.6% | 96/138, 69.6% | 0.438 |

**Cuadro 3.** Relación entre tinciones y detección de biopelículas

| Tinción             | Padecimiento del paciente, número de pacientes |            |            |       |
|---------------------|--|------------|------------|-------|
|                     | Infeccioso                                     | Obstrutivo | Total      | p     |
| Hematoxilina-eosina | 46 (69.7%)                                     | 20 (30.3%) | 66 (47.8%) | 0.371 |
| PAS                 | 30 (33.3%)                                     | 14 (29.2%) | 44 (31.9%) | 0.703 |
| De Gram             | 46 (51.1%)                                     | 23 (47.9%) | 69 (50.0%) | 0.858 |

**Cuadro 4.** Grado de hipertrofia amigdalina y detección de biopelículas

| Hipertrofia amigdalina | Sin biopelícula | Biopelícula | Total      | p     |
|------------------------|-----------------|-------------|------------|-------|
| I                      | 5 (11.9%)       | 4 (4.2%)    | 9 (6.5%)   |       |
| II                     | 12 (28.6%)      | 20 (20.8%)  | 32 (23.2%) |       |
| III                    | 18 (42.9%)      | 44 (45.8%)  | 62 (44.9%) |       |
| IV                     | 7 (16.7%)       | 28 (29.2%)  | 35 (25.4%) |       |
| Total                  | 42              | 96          | 138        | 0.152 |

**Cuadro 5.** Hipertrofia adenoidea y detección de biopelículas

| Hipertrofia adenoidea | Sin biopelícula | Biopelícula | Total      | p     |
|-----------------------|-----------------|-------------|------------|-------|
| Sí                    | 26 (61.9%)      | 53 (55.2%)  | 79 (57.2%) |       |
| No                    | 16 (61.9%)      | 43 (44.8%)  | 59 (42.8)  |       |
| Total                 | 42              | 96          | 138        | 0.575 |

utilizada aisladamente ( $p = 0.858$ ). En las **Figuras 1 a 3** se observan imágenes histológicas de biopelículas de acuerdo con la tinción utilizada.

En comparación con bibliografía internacional, la prevalencia de biopelículas observadas en este estudio fue similar a la reportada en otros estudios (69.6% en este estudio vs 70% aproximadamente reportado).<sup>6,8</sup>

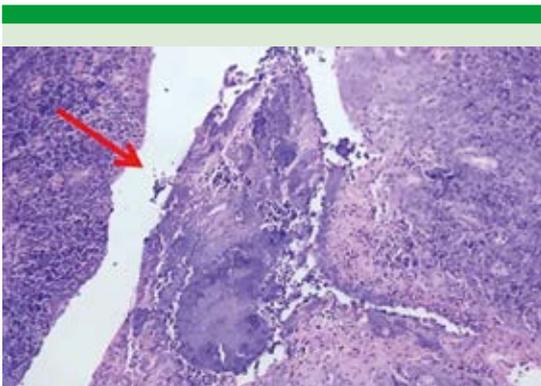
Pese a que las biopelículas se observaron con más frecuencia en los procesos infecciosos, se demostró que en enfermedad adenoamigdalina obstructiva había biopelículas en aproximadamente 64% de los pacientes, no se encontró

diferencia estadísticamente significativa entre la existencia de biopelículas y el proceso patológico asociado ( $p = 0.438$ ); con lo que se descarta que la existencia de biopelículas condicione un proceso infeccioso crónico porque también se encontraron biopelículas en procesos obstructivos.

El grado de hipertrofia de amígdalas palatinas puede estar relacionado con la existencia de biopelículas, lo que coincide con lo reportado por Torretta y colaboradores,<sup>9</sup> quienes encontraron que amígdalas palatinas mayores a grado II de hipertrofia tienen más posibilidad de tener biopelículas; para realizar esta comparación en

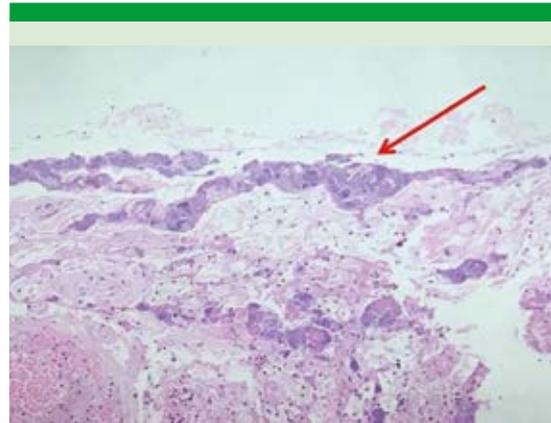


**Figura 1.** Fotografía en objetivo 10x con tinción de Gram, se observa acumulación de bacterias en la superficie epitelial (flecha).



**Figura 2.** Fotografía en objetivo 10x con tinción PAS, con acumulación de bacterias en la superficie epitelial (flecha).

nuestro estudio, se dividieron los grados I y II en un grupo y los grados III y IV en otro y se encontró que las biopelículas se observaron con más frecuencia en el grupo de los grados III y IV (75%, 72 muestras;  $p = 0.073$ ), mismos grados que se aprecian con más frecuencia en enfermedad obstructiva, lo que afirma que las biopelículas también se encuentran en enfermedad obstructiva con frecuencia alta.



**Figura 3.** Fotografía en objetivo 10x en tinción HyE, se observa acumulación de bacterias en la superficie epitelial (flecha).

Un factor determinante en el proceso obstructivo es la hipertrofia de adenoides. Hall-Stoodley y Stoodley describieron que las colonias de biopelículas son capaces de liberar células aisladas o en racimos pequeños y que éstas pueden fijarse a la superficie de biopelículas en formación, lo que permite la diseminación de biopelículas y esto pudiera explicar la colonización de la amígdala adenoide (que se cree que actúa como reservorio potencial bacteriano).<sup>10</sup> En este estudio, se detectaron biopelículas en 55.2% de los 79 pacientes que tuvieron hipertrofia de adenoides. La enfermedad más frecuente concomitante en hipertrofia adenoidea fue la obstructiva en 93.8%.

Algunos autores sugieren que las biopelículas bacterianas son parte de la flora microbiana amigdalina y están presentes en las amígdalas clínicamente afectadas, pero se han encontrado agregados de biopelículas en pacientes sin antecedente clínico adenoamigdalino, lo que puede ser un proceso de vigilancia inmunológica.<sup>11</sup> En este estudio no pudo compararse la existencia de biopelículas en sujetos sanos, porque sólo



fueron intervenidos quirúrgicamente pacientes con enfermedad.

En este estudio no pudo corroborarse que la existencia de biopelículas en tejido adenoamigdalino condiciona la cronicidad de procesos infecciosos adenoamigdalinos, porque también las manifiestan procesos obstructivos.

El uso de tinciones con microscopía de luz puede ser una alternativa en la visualización de biopelículas y tiene ventajas de costo, accesibilidad y de tiempo.

## CONCLUSIONES

Se demostró la existencia de biopelículas en 69.6% de las muestras usando microscopía de luz y tres tinciones. Pese a que las biopelículas se detectaron con más frecuencia en procesos infecciosos (72.2 vs 64.6%), no hubo diferencia significativa entre la existencia de biopelículas vinculadas con proceso adenoamigdalino infeccioso u obstructivo ( $p = 0.438$ ), por lo que se descarta la relación directa de biopelículas con cuadros infecciosos adenoamigdalinos. La microscopía de luz es una técnica barata y accesible. Se recomienda hacer las tres tinciones por muestra; si se realiza por separado, el porcentaje de detección es menor; sin embargo, al no ser estadísticamente significativo, la detección intencionada de biopelícula no se recomienda en enfermedad adenoamigdalina. Se necesitan más estudios para demostrar que la existencia de biopelículas esté implicada en la cronicidad y resistencia de amigdalitis.

## Agradecimientos

Dra. Lesly Jiménez García, Dr. Gaudencio Díaz Pavón, Dr. Ángel Castro Urquiza, Dr. Eri Peña Martínez, Dra. Ana Guadalupe Ruelas Perea,

Dra. Ana Karen Soto Sañudo, Ángel Guadalupe Zazueta Abitia y Adrián Huezca Flores.

## REFERENCIAS

1. Jeong JH, Lee DW, Ryu RA, et al. Bacteriologic comparison of tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Laryngoscope* 2007;117(12):2146-2151. doi.org/10.1097/MLG.0b013e31814543c8
2. Vlastarakos VP, Nikolopoulos PT, Maragoudakis P, Tzagaroulakis A, Ferekidis E. Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they? *Laryngoscope* 2007 Apr;117(4):668-673.
3. Diaz RR, S. Picciafuoco MG, Paraje NA, et al. Relevance of biofilms in pediatric tonsillar disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011 Dec; 30(12): 1503-1509 doi.org/10.1007/s10096-011-1249-3
4. Hochstim CJ, Yujin ChY, Lowe D, et al. Biofilm detection with hematoxylin-eosin staining. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;136(5):453-456.
5. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999 May;284(5418):1318-1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318
6. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129(6):634-636 doi:10.1001/archotol.129.6.634
7. Reyes GA, Gutiérrez OA, Andrade RE, Contreras DD. Coloraciones histológicas vs. Microscopía electrónica de transmisión para detección de biopelículas en pacientes con rinosinusitis crónica en el Hospital Universitario de La Samaritana, en el año 2011. *Acta Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 2012; 40(2):107-113.
8. Romain EK, Lamers G, Vonk JM, et al. Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues. *Laryngoscope* 2008 Jan;118(1):128-134.
9. Torretta S, Drago L, Marchisio P, et al. Recurrences in chronic tonsillitis sustained by tonsillar biofilm-producing bacteria in children. Relationship with the grade of tonsillar hyperplasia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013 Feb;77(2):200-204.
10. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 2005 Jan;13(1):7-10.
11. Musbah AS, Omar R, Ismail S, Yasim YM, Dhabban NG, Ameen AM. Evidence of Bacterial Biofilms among Infected and Hypertrophied Tonsils in Correlation with the Microbiology, Histopathology, and Clinical Symptoms of Tonsillar Diseases. *Int J Otolaryngol* 2013 Dec;1-11 doi: 10.1155/2013/408238