

Identificación de genes de resistencia antibiótica *tetQ*, *tetM*, *qnrS*, *qnrB* en bacilos entéricos aislados de cavidad oral.

Paula Andrea Pájaro Herazo

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC.- MAYO 2019**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Identificación de genes de resistencia antibiótica <i>tetQ</i> , <i>tetM</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrB</i> en bacilos entéricos aislados de cavidad oral.
Grupo de investigación	Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO
Línea de investigación:	Microbiología Oral
Institución participante:	Facultad de Odontología - Universidad El Bosque Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO
Tipo de investigación:	Pregrado
Estudiantes:	Paula Andrea Pájaro Herazo
Director:	Dra. Yineth Neuta Poveda
Codirector:	Dra. Gloria Inés Lafaurie
Otro asesor	Dra. Diana Marcela Castillo Perdomo
Asesor estadístico	Dra. Gloria Ines Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

“Quisiera agradecer a la Dra. Lafaurie y la Dra. Diana Castillo por haberme dirigido y ayudado en la realización de este trabajo. A la Dra. Yineth Neuta por haberme apoyado, guiado e impulsado a sacar esta tesis adelante, su ayuda fue crucial en la investigación y a la Dra. Nathaly Delgadillo, la cual me apoyo y apporto de su ayuda cuando lo necesité. Por último, pero no menos importante también quisiera agradecer a mi familia que ha sido un pilar en mi vida y uno de los motivos por los cuales he alcanzado mis logros.”

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
1.Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Cavidad Oral	3
2.2 Bacilos Entéricos	4
2.3 Importancia de los bacilos entéricos en cavidad oral	5
2.4 Resistencia antibiótica en Enterobacterias	6
3. Planteamiento del problema	10
4. Justificación	12
5. Situación Actual	13
6. Objetivos	15
6.1 Objetivo general	15
6.2 Objetivos específicos	15
7. Metodología del Proyecto	16
7.1. Tipo de estudio	16
7.2. Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)	16
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información (Materiales y métodos)	16
7.3.1 Procesamiento microbiológico	16
7.3.2 Extracción de ADN	16
7.3.3 Detección de genes de resistencia antibiótica por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	17
7.5 Plan de tabulación y análisis.	19
8. Consideraciones éticas.	20
8.1 Sustento Legal	20
9. Resultados	21
10. Discusión	25
11. Conclusiones	29
12. Recomendaciones	30
13. Referencias bibliográficas	31

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA *tetQ*, *tetM*, *qnrS*, *qnrB* EN BACILOS ENTÉRICOS AISLADOS DE CAVIDAD ORAL.

Antecedentes: Las bacterias entéricas son consideradas microbiota transeúnte en cavidad oral y su distribución en la población varía, dependiendo de diversos factores. Se han asociado con la reducción de la efectividad en los tratamientos orales, lo cual se ha relacionado con las altas tasas de resistencia que presentan y su papel como reservorio importante de muchos genes de resistencia a antibióticos. Aunque se han realizado varios acercamientos evaluando diversos genes, a nivel oral aún se encuentra muy poca literatura que aporte información acerca del tema, principalmente a nivel de la población colombiana. **Objetivo:** Establecer la frecuencia de los genes de resistencia antibiótica *tetQ*, *tetM*, *qnrS*, *qnrB* en bacilos entéricos aislados a partir de muestras de saliva. **Materiales y Métodos:** Se seleccionan 100 aislamientos de bacilos entéricos provenientes de muestras de saliva, se realizó identificación de género y especie bacteriana utilizando galerías bioquímicas, y PCR para detección de los genes *tetM* y *tetQ*, asociados con resistencia a doxiciclina, y *qnrB* y *qnrS* asociados con resistencia a ciprofloxacina. **Resultados:** Se observó que el gen encontrado en mayor frecuencia fue *tetM* en un 52%, principalmente en los géneros *Enterobacter* (56%) y *Klebsiella* (85%), seguido de *qnrB*, el cual se detectó en un 17%, encontrándose en *Klebsiella* en un 35%, y en *Cronobacter* en un 23%. Los genes *tetQ* y *qnrS* fueron detectados en baja frecuencia (3% y 1% respectivamente). **Conclusiones:** Aunque los bacilos entéricos no hacen parte de la microbiota normal de la cavidad oral pueden ser considerados reservorios importantes de genes de resistencia a antibióticos que son empleados en odontología no solo en los de primera elección, sino también en los que se utilizan como tratamiento alternativo. **Palabras claves:** Resistencia antibiótica, bacilos entéricos, cavidad oral, genes de resistencia.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES *tetQ*, *tetM*, *qnrS* AND *qnrB* IN ISOLATED ENTERIC BACILLI IN THE ORAL CAVITY.

Background: Enteric bacteria are considered transient micro-biota in the oral cavity and its distribution vary depending on diverse factors. They have been associated with an efficiency reduction of oral treatments, which relates to higher resistance rates and an important reservoir of antibiotic resistant genes. Even though there have been several approaches evaluating different genes, there is still very scarce literature on the oral topic, mainly among Colombian population. **Objective:** to establish the frequency of the antibiotic resistance genes *tetQ*, *tetM*, *qnrS*, *qnrB* in enteric bacilli isolated from saliva samples. **Materials and methods:** A sample of 100 isolations from saliva samples were selected with gender and bacterial species identified using biochemical galleries, PCR for detection of *tetM* and *tetQ* associated with a resistance to doxycycline and *qnrB* and *qnrS* associated with resistance to ciprofloxacin. **Results:** The most frequent gene was *tetM* with a 52% mainly in the *Enterobacter* (56%) and *Klebsiella* (85%) genders, followed by *qnrB* detected 17% in *Klebsiella* (53%) and *Cronobacter* (23%). The detection of *tetQ* and *qnrS* genes was low (3% and 1% respectively). **Conclusions:** Enteric bacilli do not make part of normal oral microbiota, they may be considered important reservoirs of resistant genes to antibiotics of primary use in dentistry, as well as alternative treatments. **Key words:** antibiotic resistance, enteric bacilli, oral cavity, resistance genes.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Secuencia de Primers utilizados para la detección de los genes <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrB</i> .	p. 9
Tabla 2	Frecuencia de géneros de Enterobacterias aisladas en muestras de saliva	p. 21
Tabla 3	Frecuencia de géneros y especies de Enterobacterias aisladas en muestras de saliva	p. 22
Tabla 4	Frecuencia de genes de resistencia <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> , <i>qnrS</i> y <i>qnrB</i> en Enterobacterias aisladas en muestras de saliva.	p. 23
Tabla 5	Frecuencia de genes de resistencia <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> , <i>qnrS</i> y <i>qnrB</i> en Enterobacterias aisladas en muestras de saliva.	p. 24

1. Introducción

La resistencia antibiótica es un problema que existe desde la aparición de los antibióticos y en la actualidad se ha incrementado gradualmente debido a su uso de manera indiscriminada, lo cual ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos haciéndolos desarrollar, con más eficacia, formas para interrumpir los mecanismos de acción de estos fármacos, activando genes que expresan mecanismos que inhiban la acción de los antibióticos, convirtiéndose así en un problema de salud pública (OMS, 2018). Se han realizado numerosos estudios acerca de resistencia antibiótica en bacilos entéricos principalmente en el campo de la medicina, a nivel odontológico los bacilos entéricos se encuentran como microbiota transeúnte, y se ha reconocido su importancia en este hábitat debido a las altas tasas de resistencia que presentan de acuerdo con lo reportado en diversos estudios, y su papel como reservorio importante de muchos genes, y aunque se han realizado varios acercamientos evaluando su resistencia a diversos antibióticos, a nivel oral aún se encuentra muy poca literatura que aporte información acerca del tema, principalmente a nivel de la población colombiana.

Los antibióticos son fármacos indispensables para tratar infecciones, y en odontología se usan con frecuencia, en muchos casos en compañía de las terapias mecánicas para mejorar los tratamientos, ya que microorganismos potencialmente patógenos persisten después de terapias mecánicas y quirúrgicas (Bascones *et al.*, 2004). Algunas patologías tales como periodontitis o abscesos como el periapical y el periodontal, pueden verse afectadas por la colonización de bacilos entéricos los cuales son microorganismos que normalmente habitan en flora gastrointestinal, suelo y agua en donde generalmente se consideran microbiota normal, pero en cavidad oral siendo transeúntes pueden llegar a convertirse en oportunistas. El tratamiento de enfermedades como la periodontitis considerada la enfermedad infecciosa inflamatoria crónica oral más prevalente en los adultos (Ardila *et al.*, 2014), conlleva un grave problema cuando se encuentran presentes enterobacterias, ya que la resistencia natural de los bacilos entéricos está asociada a los antibióticos de primera elección y los más comúnmente utilizados en periodoncia como son las penicilinas

(amoxicilina), macrólidos (clindamicina), metronidazol, las terapias combinadas, macrólidos (eritromicina) , entre otros (Falcao *et al.*, 2001)

Algunas alternativas en el tratamiento de pacientes en donde se asocia la presencia de bacilos entéricos son las tetraciclinas, como la doxiciclina, y las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina, debido a su amplio espectro contra bacilos entéricos Gram-negativos (Tinoco E. *et al.*, 1998). Se ha observado que a nivel general los bacilos entéricos han comenzado a desarrollar resistencia contra estos antibióticos, y debido a que también se ven involucrados con la transferencia de genes de resistencia a otros microorganismos, esto puede favorecer una disminución en las alternativas para el tratamiento de infecciones. Según lo reportado por la literatura, los principales genes bacterianos que codifican factores de resistencia contra las tetraciclinas son *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(Q)*, *tet(M)* y *tet(W)* (Collins *et al.*, 2015), y los que se han reportado en relación con resistencia a las fluoroquinolonas son *qnrS*, *qnrB*, *qnrA* y *qnrD* (Dorji *et al.*, 2008), estos empiezan a cobrar importancia ya que estarían provocando un problema en el manejo de las infecciones con los antibióticos antes mencionados.

Debido a la alta propagación de estos genes y ya que en el mundo y en Colombia aún hay pocos estudios relacionados con esta área, es importante conocer e identificar si también son frecuentes estos genes en bacilos entéricos a nivel de la cavidad oral, los cuales pueden favorecer el fracaso en las terapias mecánicas y quirúrgicas, y prolongar los procesos infecciosos, limitando los recursos para tratar estas patologías.

Los resultados de esta investigación permitirán fortalecer los estudios previos acerca de resistencia antibiótica a nivel oral realizados en Colombia y la importancia de dar a conocer el grave problema de salud pública que está en incremento por la diseminación de bacterias multirresistentes y el uso inapropiado de antibióticos, así como también crear conciencia de la aplicación de medidas de prevención y control.

2. Marco teórico

2.1 Cavidad oral

La cavidad es uno de los hábitats humanos más relevantes desde el punto de vista clínico ya que se considera la principal puerta de entrada para todo tipo de microorganismos. Es un complejo sistema que tiene varias funciones como lo son la degradación, deglución, gusto y trituración de los alimentos. Durante hace muchos años ha sido uno de los ecosistemas más estudiado, encontrando que comprende unos de los más diversos biofilms y que es altamente dinámico (Serrano *et al.*, 2015).

La microbiota oral se consideran un componente importante en la salud bucal ya que permite el balance entre el huésped y hospedador, se han encontrado alrededor de 700 especies de microorganismos, los cuales colonizan diferentes sitios (dientes, encías, carrillos, lengua paladar, saliva etc.) debido a receptores específicos que tienen afinidad a el tipo de superficie. Los principales microorganismos que han sido encontrados son: *Streptococcus*, *Gemella*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Veillonella*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria* (Quintana *et al.*, 2017). Estos organismos interactúan selectivamente con una variedad de proteínas salivales permitiendo la adhesión bacteriana a las superficies, la nutrición, el metabolismo bacteriano y la expresión génica; pero también son influenciados por muchos aspectos de los estilos de vida como la dieta, estrés, tabaco, pH, ingesta de alimentos, etc. Algunas de estas bacterias han sido implicadas en enfermedades bucales como la caries y la periodontitis, que están entre las infecciones bacterianas más comunes en los seres humanos. Por otro lado, no todos los microorganismos que con colonizadores habituales en cavidad oral son los causantes de infecciones y complicaciones, estas pueden ser causadas por microorganismos extrínsecos que llegan a cavidad oral por contaminación como los bacilos entéricos (Jorn *et al.*, 2005).

2.2 Bacilos Entéricos

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, que tienen muchos roles en la salud, la mayoría de los cuales son beneficiosos o neutros para el anfitrión, constituyendo un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (García & Rodríguez, 2010).

Las enterobacterias son las causantes de aproximadamente el 30% de los aislamientos bacterianos en sangre, el 65% de los gastrointestinales, el 75% de los del tracto urinario, y son responsables de más del 30% de las infecciones respiratorias de vías bajas en pacientes con riesgo de colonización de orofaringe (López *et al.*, 2016). Estas bacterias son categorizadas como patógenos con alta importancia debido a las complicaciones clínicas que causan, ya que en el momento del manejo terapéutico las opciones para tratar las patologías causadas por estos microorganismos son muy reducidas y limitadas. Todos ellos tienen gran cantidad de genes que expresan resistencia para diferentes clases de antibióticos y lo que es más preocupante es la alta capacidad de transferencia de estos genes a otros microorganismos (López *et al.*, 2016).

A nivel de la cavidad oral se ha reportado que los bacilos entéricos son microbiota transeúnte que pueden estar colonizando individuos sanos (Slots *et al.*, 1990), aunque también se han visto relacionados en infecciones graves, las cuales pueden ser difíciles de manejar debido a la resistencia que presentan estos microorganismos frente a una gran variedad de antibióticos de primera elección a nivel odontológico. La tribu más importante que se ha encontrado en la cavidad oral es la tribu Klebsielleae que se encuentra conformada por los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Haffnia* y *Serratia*, (Apurba y Sandhya, 2019) de los cuales las especies más frecuentemente reportadas son *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter sakazakii* (Ardila *et al.*, 2014).

En estudios realizados a partir de aislamientos de bacilos entéricos de cavidad oral se han encontrado algunas especies en mayor frecuencia. Slots *et al.*, en 1988, identificaron diferentes especies de la familia Enterobacteriaceae en 500 estudiantes que tenían diagnóstico de periodontitis grave, se tomaron muestras de placa subgingival y se encontró una frecuencia de 10,2 % (51/500). Principalmente se identificaron *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. En Colombia en un estudio de Lafaurie *et al.*, en el año 2007 en donde se incluyeron diferentes regiones del país (Bogotá, Este, Pacífico oeste, Atlántico Norte y zona central) se encontró que había gran prevalencia de bacterias entéricas en 29.8% en todos los pacientes incluyendo los pacientes control, y en los pacientes con periodontitis se encontró una prevalencia de 34.5%.

También, en la literatura se encuentra un estudio realizado en Bogotá, Colombia en 2007 por Mayorga *et al.*, (2007), donde describió la presencia de bacilos entéricos, principalmente los pertenecientes a la tribu *Klebsielleae* (géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*), y Ardila (2010) manifestó en su estudio realizado en Colombia que las especies más comunes fueron: *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*.

2.3 Importancia de los bacilos entéricos en cavidad oral

Los Bacilos Entéricos se han relacionado como organismos sobre infectantes que no pueden ser erradicados fácilmente con la terapia mecánica, en relación con procesos infecciosos como la periodontitis, por lo cual existe la necesidad de utilizar terapia combinada con antibióticos que intervengan con la erradicación de estos. (Olivo *et al.*, 2014). Son capaces de sobrevivir en sangre, causando infecciones hematógenas, las cuales pueden ser diseminadas a otras partes del cuerpo causando patologías o agravándose. (Puerta, 2010).

En un estudio realizado en Brasil por Silva *et al.*, (2016) acerca de del uso de prótesis totales, se evidencia presencia de bacilos entéricos en la cavidad oral, ya que el momento de realizar la limpieza de estas prótesis puede llegar a contaminarse. La presencia de bacilos entéricos en estas prótesis esta también relacionada con su capacidad alta de adherirse a

las superficies firmes y por su alta patogenicidad y capacidad de causar infecciones (An *et al.*, 2006).

2.4 Resistencia antibiótica en Enterobacterias

Las bacterias cuentan con una gran variabilidad genética, lo que las hace obtener la habilidad de adquirir mecanismos de resistencia por medio de la transferencia de su material genético o también por medio de la mutación. La resistencia puede ser de origen genético natural o adquirido que se expresa fenotípicamente, principalmente observada en bacterias Gram negativas. Dichos genes de resistencia han surgido por adquisición de plásmidos o transposones que se convierten en genes funcionales (Salyers *et al.*, 2004). “Los genes de resistencia naturales en plásmidos se originan como mutaciones puntuales en los genes blanco (sitios de inserción de los genes de resistencia) de bacterias susceptibles y también de genes que les proveen protección contra otras bacterias” así lo manifiesta López *et al.*, (2016, p.192).

Los antibióticos ejercen su acción sobre estructuras de los microorganismos específicos y su objetivo es controlar, disminuir o eliminar la cantidad de microorganismos (Seija & Vignoli , 2006), sin embargo el uso inadecuado de estos, la prescripción excesiva y la falta de control puede generar la resistencia en las bacterias debido a la exposición prolongada o la falta de adherencia que permite que el microorganismo conozca el mecanismo de acción y desarrolle la resistencia hacia ciertos antibióticos (Dreser *et al.*, 2008). Los antibióticos más utilizados en odontología y en especial en el área de periodoncia son la amoxicilina, (amoxicilina + ácido clavulánico), tetraciclinas, nitroimidazoles, quinolonas y macrólidos. Dentro de estos, las quinolonas y tetraciclinas cobran gran importancia debido a su gran espectro extendido contra bacterias Gram negativas, también son buenas alternativas para pacientes que son alérgicos a las penicilinas que son los antibióticos más utilizados (Albalat *et al.*, 2002).

Las quinolonas son antibióticos sintéticos generalmente usados para manejar un amplio espectro de infecciones bacterianas como infecciones urinarias, respiratorias, gastrointestinales, cutáneas, óseas y articulares (AEMPS, 2018). Actúan interfiriendo en la

síntesis del ADN, conduciendo la muerte celular (bactericidas) para poder ejercer su efecto citotóxico las quinolonas penetran a través de la membrana bacteriana y llegan a su diana celular, la topoisomerasa II e inducen la muerte de la célula (Brugueras *et al.*, 2005). Según Ardila *et al.*, (2010), en un estudio que realizó en población colombiana manifiesta que la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos observada en la ciprofloxacina tiene el potencial de erradicar las bacterias entéricas Gramnegativas de las bolsas periodontales y demostró que el antibiótico se encuentra en mayor concentración en líquido crevicular que en plasma.

Las quinolonas de segunda generación como lo es la ciprofloxacina empezaron a ser utilizadas y puestas a la venta en el año 1980 (Paton & Reeves, 1988). Llegó a ser ampliamente vendida ya que la ciprofloxacina era la fluoroquinolona más potente contra la mayoría de los enteropatógenos bacterianos (Chattaway, 2016) y ya que en ese momento los antibióticos que solían ser efectivos contra los bacilos entéricos empezaron a fallar. Al pasar del tiempo la resistencia a las quinolonas aumento y se presume que quizás es porque los mecanismos que confieren resistencia a una amplia gama de fármacos pueden haber predominado antes de que evolucionaran los mecanismos específicos de la quinolona. (Lamikanra *et al.*, 2011; Namboodiri *et al.*, 2011) haciendo que los recursos para eliminar los enteropatógenos cada vez sean menos. Se piensa que otra de las causas es que la quinolonas eran ampliamente utilizadas en el mundo por lo tanto esto permitió que los genes de resistencia evolucionaran y migrarán a otras partes del mundo, extendiendo así la resistencia. (Davidson *et al.*, 2008; Lamikanra *et al.*, 2011).

Por otra parte, las tetraciclinas, son antibióticos antimicrobianos de amplio espectro con acción potente frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, pueden ser utilizados para tratar infecciones otorrinolaringológicas, dentales, respiratorias, urinarias, piel y gastrointestinales. (Vicente, 2010). Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica de bacterias Gram positivas y Gram negativas, son de amplio espectro y actúan contra muchas especies Gram negativas principalmente, inhiben la síntesis de proteínas y se ligan a la subunidad 30S de los ribosomas (Rodríguez *et al.*, 1998), son muy eficaces contra bacterias periodontopatógenas como *A. actinomycetemcomitans* (Falcao *et al.*, 2001),

dentro de este grupo de antibióticos la doxiciclina es uno de los más utilizados en odontología precisamente por su alto nivel de absorción cuando se administra por vía oral, presenta gran unión a las proteínas plasmáticas y tiene alta liposolubilidad destacando también que las concentraciones alcanzadas en el fluido gingival son 2 a 4 veces superiores a las séricas (Falcao *et al.*, 2001).

Por ser estos antibióticos de gran espectro y efectividad, las bacterias entéricas encontradas en cavidad oral como transeúntes debido a contaminación por fuentes exógenas han desarrollado diversas maneras para evadirlos y transferir su resistencia a otras bacterias. En la actualidad se ha observado un aumento de genes de resistencia y su propagación, representando un problema grave para la salud ya que la ingesta indiscriminada de antibióticos está causando que este riesgo crezca a una escala mayor. “Se ha observado que la microbiota intestinal ofrece amplias oportunidades para la transferencia horizontal de material genético, incluidos genes de resistencia a antibióticos” según autores como Schaik (2015 p.1). En los últimos años esto ha conllevado a problemas con la administración de antibióticos para el manejo de infecciones ya que la resistencia a antibióticos se está propagando e inhibiendo la capacidad de estos para tratar las infecciones más comunes, impidiendo que el paciente mejore o que en el peor de los casos muera debido a ella. Estas bacterias intestinales no están destinadas a intercambiar genes de resistencia entre ellas, sino que también pueden relacionarse con las bacterias que están en su ambiente independientemente de la especie, favoreciendo que otras bacterias adquieran y transmiten genes de resistencia a los antibióticos (Puerta & Mateos, 2010). La propagación de genes se puede presentar hacia microorganismos relacionados como microbiota normal y que pueden comportarse como oportunistas causando infecciones (Salyers *et al.*, 2004).

En el caso de las tetraciclinas como la doxiciclina, se puede encontrar en la literatura los genes *tet* (genes resistentes a tetraciclinas), los más mencionados y más relevantes en este grupo son: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(Q)*, *tet(M)* y *tet(W)*. Según Martí *et al.*, (2005) en su estudio manifiesta que las bacterias presentan varios mecanismos de resistencia antibiótica contra las tetraciclinas como los son la expulsión activa y la protección ribosomal. La protección ribosomal consiste en una proteína que se une al ribosoma impidiendo que la tetraciclina se

una al sitio diana y uno de los genes que produce esta resistencia es *tet(M)* y *tet(Q)*, la expulsión activa se basa en una serie de transportadores que son capaces de expulsar, de manera relativamente inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados estructuralmente.

Por otro lado, otra de las alternativas para atacar la sobreinfección por microorganismos entéricos son las fluoroquinolonas como lo es la ciprofloxacina. Los genes *qnr* (genes resistentes a quinolonas y fluoroquinolonas) pueden ser encontradas en bacilos entéricos como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli* según un estudio que realizó Dorji en el año 2008. Los mayormente reportados por la literatura son: *qnrS*, *qnrB*, *qnrA* y *qnrD*; estos se han reportado en antibióticas como la ciprofloxacina y Visconti *et al.*, en el año 2002 manifiesta que algunos de los mecanismos de resistencia incluyen cambios en la permeabilidad de la membrana externa que disminuyen la penetración intracelular del fármaco, portadores endógenos activos responsables del flujo de salida del medicamento y aquellos mediados por mutaciones genéticas que codifican para ADN girasa y topoisomerasa IV. Cabe aclarar que estos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente.

3. Planteamiento del problema

Los bacilos entéricos son microorganismos que pueden llegar a la cavidad oral de manera transeúnte y se han asociado con ser persistentes en terapias mecánicas o quirúrgicas, por lo cual que se opta por las terapias antimicrobianas a las cuales los microorganismos ya antes mencionados están generando altas tasas de resistencia, y lo cual puede generar que patologías como la periodontitis u otras infecciones persisten de manera importante (Ardila *et al.*, 2014). Los bacilos entéricos albergan gran cantidad de genes asociados a resistencia antibiótica los cuales pueden expresarse debido a diferentes presiones selectivas y que se han asociado con la prescripción, uso inadecuado y venta laxa de antibióticos. Otro factor importante en estas bacterias es su capacidad de transmitir resistencia a otros microorganismos por mecanismos de intercambio horizontal, lo que genera un problema mayor. (López *et al.*, 2016)

Los antibióticos que son de gran utilidad como coadyuvantes en la terapia mecánica y que representan una ayuda eficaz en los tratamientos odontológicos son: amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, tetraciclinas, metronidazol y azitromicina (Ardila *et al.*, 2010). Sin embargo, se han presentado casos en donde se han encontrado enterobacterias en placa subgingival y estos pacientes sufrían de periodontitis crónica, haciendo que la respuesta al tratamiento pierda efectividad. Debido a que los bacilos entéricos tienen una gran resistencia a la amoxicilina, amoxicilina/clavulánico y al metronidazol en estudios, una alternativa para tratar estas complicaciones pueden ser las tetraciclinas y fluoroquinolonas (Ardila *et al.*, 2010). También hay que considerar que existe la posibilidad de que se encuentren pacientes que presentan alergia a betalactámicos (García *et al.*, 2008) y la opción de usar antibióticos del grupo de las tetraciclinas y fluoroquinolonas podría resolver esta problemática.

Algunos antibióticos como las tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas se han empezado a implementar con gran frecuencia en el ámbito odontológico, considerándose terapia farmacológica alternativa, pero de igual manera se han empezado a reportar estudios en donde se registran diferentes mecanismos asociados con resistencia a estos antibióticos.

La identificación de genes de resistencia en bacilos entéricos, debido a su importancia a nivel mundial, es fundamental para conocer y obtener información relevante, y debido a la escasez de estudios acerca de resistencia antibiótica en terapia farmacológica alternativa a la convencional, a nivel odontológico, es importante indagar en la problemática y generar aportes que ayuden a definir una terapia más adecuada para la resolución de los procesos infecciosos, así como fortalecer procesos de vigilancia y concientizar aún más acerca de importancia de la presencia de estos microorganismos en la cavidad oral y el uso indiscriminado de los antibióticos.

4. Justificación

La resistencia antibiótica es un problema a nivel mundial que día a día se actualiza principalmente en el campo médico. Diferentes factores pueden favorecer la aparición de nuevas resistencias lo cual genera un problema a nivel de salud pública constante (OMS, 2018). Las bacterias, principalmente los bacilos entéricos, contienen una gran cantidad de genes que codifican para resistencia antibiótica, lo cual puede favorecer fallas terapéuticas (López *et al.*, 2016). En el campo odontológico se han reportado los principales mecanismos de resistencia y los genes asociados a resistencia a los antibióticos de primera elección utilizados en esta área, algunos otros antibióticos como las tetraciclinas y las fluoroquinolonas se han empezado a utilizar más frecuentemente pero aún son pocos los estudios que se han realizado para identificar si bacilos entéricos aislados de cavidad oral portan genes de resistencia asociados a estos antibióticos, los cuales podrían eventualmente expresarse por presiones selectivas de diferente índole. Debido a esta problemática se ha decidido realizar esta investigación con el fin de indagar y aportar datos relevantes, considerando también que los principales estudios reportados se encuentran más a nivel mundial y hay muy pocos estudios puntualmente en Colombia.

Los resultados de esta investigación permitirán fortalecer los estudios previos acerca de resistencia antibiótica a nivel oral realizados, Colombia y la importancia de dar a conocer el grave problema de salud pública que está en incremento por la diseminación de bacterias multirresistentes y el uso inapropiado de antibióticos, así como también crear conciencia de la aplicación de medidas de prevención y control.

5. Situación actual en el área de investigación

En la actualidad las bacterias forman una gran parte de la población existente en el planeta, por lo tanto, existe una gran exposición y probabilidad a contraer enfermedades e infecciones por estas. En cavidad oral ocurre lo mismo, actualmente hay algunas publicaciones que sustentan la presencia de bacilos entéricos en ella, manifestando que mayormente se han encontrado en bolsas periodontales en donde lo que hacen es sobre infectar y complicar tratamientos periodontales ocasionando que el paciente no mejore (Ardila *et al.*, 2014).

En un panorama mundial según Ardila, 2010 habla de que en Suecia se había encontrado la presencia de entéricos en cavidad oral con una frecuencia de 34,9% siendo *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca* las especies más representativas, en Estados Unidos se encontró algo similar; observado que las especies más prevalentes fueron *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* con una frecuencia del 28%. En Colombia, Chile y España hubo prevalencias con una frecuencia del 36% y 17,6%, aclarando que estas cifras hablan de Colombia y Chile ya que en España no hubo presencia de entéricas en los aislamientos estudiados. En una población Rumana también hubo reportes de presencia de entéricos en el 61,1%, en Sudán de 92%, en el Brasil se han observado prevalencias del 31,2% de entéricos encontradas principalmente en bolsas periodontales mientras que en República Dominicana fue de 67% y China 57% . Demostrando que la presencia de enterobacacterias no es un problema confinado a una región o parte del mundo.

Hay también registros demográficos en Colombia que manifiestan la presencia de bacilos entéricos en cavidad oral y su porcentaje en las diferentes zonas del país, así como también la cantidad de microorganismos encontrados en ella, estableciendo que los bacilos entéricos se encuentran con una alta frecuencia y no es sorpresa encontrarlos en bolsas periodontales (Lafaurie *et al.*, 2007).

Estos estudios hacen referencia mayormente a la presencia o dan a conocer las especies encontradas en cavidad, pero son escasos o nulos los que hablan sobre los genes que

generan resistencia antibiótica presentes en bacilos entéricos, lo que genera un gran problema debido a que los registros hablan sobre presencia de estas bacterias y de falla al tratamiento debido a estas, por lo tanto, es de gran importancia conocer estos genes e identificarlos.

6. Objetivos

6.1 *Objetivo general:*

- Establecer la frecuencia de los genes de resistencia antibiótica *tetQ*, *tetM*, *qnrS*, *qnrB* en bacilos entéricos aislados a partir de muestras de saliva

6.2 *Objetivos específicos:*

- Determinar la frecuencia de los principales géneros y especies de bacilos entéricos aislados a partir de muestras de saliva.
- Detectar la presencia de los principales genes de resistencia antibiótica a doxiciclina en bacilos entéricos aislados de muestras de saliva.
- Detectar la presencia de los principales genes de resistencia antibiótica a ciprofloxacina en bacilos entéricos aislados de muestras de saliva.

7. Metodología del Proyecto

7.1 *Tipo de estudio*: Descriptivo observacional in vitro

7.2 *Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)*: 100 Aislamientos clínicos provenientes de muestras de saliva de pacientes que asistieron a las clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque y que se encuentran almacenadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO de la Universidad El Bosque, conservados a -80°C.

7.3 *Métodos y técnicas para la recolección de la información (Materiales y métodos)*:

7.3.1 *Procesamiento microbiológico*

Se seleccionaron y descongelaron 100 aislamientos de Bacilos entéricos provenientes de muestras de saliva de pacientes, que se encuentran almacenados en caldo BHI + 10% de glicerol a -80°C. De cada aislamiento se sembró 30 µl de muestra en agar BHI mediante técnica de agotamiento y se incubó por 24 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente se verificó crecimiento y pureza del cultivo. Se realizaron pruebas para identificación de género y especie utilizando el panel bioquímico BD BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System, el cual se incubó por 24 horas a 37°C, y se realizaron pruebas complementarias de Indol y Oxidasa. Pasado el tiempo requerido se interpretaron los resultados utilizando el software correspondiente. Adicionalmente los aislamientos se guardaron en 500 mL de agua grado molecular, conservados a -20°C, para posterior extracción de ADN.

7.3.2 *Extracción de ADN*

Para la detección de los genes de resistencia en los aislamientos de bacilos entéricos se realizó extracción de ADN por choque térmico, el cual consistió en someter las muestras previamente almacenadas a -20°C a una temperatura de ebullición de 100°C durante 20 minutos, posteriormente se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 10 minutos en

centrífuga refrigerada a 4°C, y el sobrenadante considerado como ADN se transfirió a un nuevo tubo estéril y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

7.3.3 Detección de genes de resistencia antibiótica por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para determinar la presencia de los genes *tetQ*, *tetM* de resistencia a doxiciclina, y *qnrS*, *qnrB* de resistencia a ciprofloxacina se realizó PCR convencional con primers y protocolos reportados en la literatura.

Para la detección del gen *tetM* se tuvo en cuenta el protocolo de Lacroix, J. M. & Walker (1995). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL, del cual 5ul corresponden al ADN bacteriano y 20 ul a la mezcla de reacción, la cual contenía GoTaq® Flexi DNA Polymerase 0.125UI, 0.67 µM de cada primer, 2mM de cada desoxirribonucleótido (dNPTs), Buffer 1X, MgCl₂ a 3 mM, y se completó el volumen con agua grado molecular. La PCR se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) con ciclos de temperatura de: 5 minutos a 95°C, seguido de 37 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minutos a 55°C y 1 minuto a 72°C; y una extensión final de 30 segundos a 72°C. Como control positivo se empleó la cepa *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

Para la detección del gen *tetQ* se tuvo en cuenta el protocolo de Lacroix, J. M. & Walker (1996). La reacción se realizó con un volumen final de 25µL, el cual 5 ul corresponde a ADN bacteriano y 20 ul a la mezcla reacción, la cual contenía GoTaq® Flexi DNA Polymerase 0.125UI, 0.67µM de cada primer, 2mM de cada desoxirribonucleótido (dNPTs), Buffer 1X y MgCl₂ a 3 mM, , se completó el volumen con agua grado molecular. La PCR se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) con ciclos de temperatura de 5 minutos a 95°C, seguido de 37 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 50°C y 2 minutos a 72°C y una extensión final de 40 segundos. Como control positivo se empleó la cepa *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

Para la detección de los genes *qnrS* y *qnrB* se tuvo en cuenta el protocolo de Jlili, N. E. H., *et al* de 2014. La reacción se realizó con un volumen final de 25 μ L, en la cual 5 μ L corresponden a ADN bacteriano y 20 μ L a la mezcla reacción. La mezcla contenía GoTaq® Flexi DNA Polymerase a 0.125U, 0.5 μ M de cada primer, 0.20 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTP's), Buffer 1X y MgCl₂ a 1.5 mM, se completó el volumen con agua grado molecular. El protocolo para realizar la PCR en ambos genes fue el mismo y se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cyclor (Bio-Rad) con ciclos de temperatura de: 5 minutos a 95°C, seguido de 37 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C, y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Para la separación de los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1,5%, en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) con 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio, y se visualizaron las bandas en un transiluminador (Gel Doc-BioRad) con luz ultravioleta a 300 nm.

Tabla 1. *Secuencias de Primers utilizados para la detección de los genes tetM, tetQ, qnrS, qnrB.*

Primers	Secuencia	Tamaño del producto	Referencia
<i>tetM (F)</i>	5'-GACACGCCAGGACATATGG-3'	397pb	Lacroix, J. M. & Walker, C. B. (1995)
<i>tetM(R)</i>	5'-TGCTTTCCTCTTGTTCGAG-3'		Lacroix, J. M. & Walker, C. B. (1995)
<i>tetQ(F)</i>	5'- GGCTTCTACGACATCTATTA-3'	755pb	Lacroix, J. M. & Walker, C. B. (1996)
<i>tetQ(R)</i>	5'-CATCAACATTTATCTCTCTG-3'		Lacroix, J. M. & Walker, C. B. (1996)
<i>qnrS(F)</i>	5'-GGAAACCTACAATCATACATA-3'	657pb	Jlili, N. E. H., Réjiba, S., <i>et al.</i> , 2014.
<i>qnrS(R)</i>	5'-GTCAGGATAAACAACAATACC-3'		Jlili, N. E. H., Réjiba, S., <i>et al.</i> , 2014.
<i>qnrB(F)</i>	5'-GACAGAAACAGGTTACCGGT-3'	594pb	Jlili, N. E. H., Réjiba, S., <i>et al.</i> , 2014.
<i>qnrB(R)</i>	5'-CAAGACGTTCCAGGAGCAACG-3		Jlili, N. E. H., Réjiba, S., <i>et al.</i> , 2014.

7.5 Plan de tabulación y análisis.

Los resultados fueron tabulados en una base de datos utilizando el programa Microsoft Excel 2016 y se realizó una estadística descriptiva determinando la frecuencia, expresada en porcentaje, de los principales bacilos entéricos en muestras de saliva, así como la frecuencia de los genes de interés de resistencia a ciprofloxacina y doxiciclina.

8. Consideraciones éticas.

El presente proyecto no atenta contra el medio ambiente, la salud humana y/o animal. Sin embargo, todos los residuos generados en los procesos experimentales, aun cuando son poco peligrosos, serán eliminados según la política ambiental de la Universidad El Bosque, establecida en el programa SIGA Ley 99 de 1993.

8.1 Sustento legal

La investigación no involucra la manipulación de seres vivos, pero si involucra muestras de saliva que contienen inóculos de bacterias entéricas provenientes de pacientes que asistieron a las Clínicas Odontológicas de la Universidad El Bosque. Dicha manipulación implica un riesgo mínimo de contaminación por contacto directo con las muestras.

Se tomó en cuenta la normativa nacional vigente:

Resolución 008430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas administrativas para la investigación en salud.

Las muestras existentes ya cuentan con un consentimiento informado válido para la investigación, riesgo o daño para la salud del sujeto ya que son muestras que se obtuvieron anteriormente y están guardadas y almacenadas por el Laboratorio de Microbiología Oral (UIBO).

Consentimiento y asentimiento informado

Todas las muestras utilizadas en la investigación cuentan con un consentimiento informado pre existente ya que en ningún momento se tendrá contacto con el paciente debido a que son muestras preservadas desde hace varios años.

9. Resultados

9.1 Frecuencia de bacterias entéricas

A partir de los 100 aislamientos de bacterias entéricas se realizó la identificación de los géneros y especies bacterianas. Se encontró en mayor frecuencia el género *Enterobacter* en un 37%, seguido de *Klebsiella* en el 30%, *Serratia* en el 20% y *Cronobacter* en un 13%. En la tabla 2 se observa la frecuencia de las bacterias entéricas aisladas de muestras de salivas.

Tabla 2. Frecuencia de géneros de Enterobacterias aisladas en muestras de saliva

Género	Frecuencia (%)
<i>Enterobacter</i>	37 (37)
<i>Cronobacter</i>	13 (13)
<i>Klebsiella</i>	30 (30)
<i>Serratia</i>	20 (20)
Total aislamientos	100 (100)

A nivel de especies bacterianas se encontró en mayor frecuencia *Enterobacter cloacae* (30%), seguido de *Klebsiella oxytoca* (22%), *Serratia marcescens* (14%), *Cronobacter sakazakii* (13%), *Klebsiella pneumoniae* (7%), *Serratia liquefaciens* (6%), *Enterobacter aerogenes* (1%) y *Klebsiella aerogenes* (1%). En la tabla 3 se observa la frecuencia de los géneros y especies de bacterias entéricas aisladas de muestras de salivas.

Tabla 3. Frecuencia de géneros y especies de Enterobacterias aisladas en muestras de saliva

Género y especie	Frecuencia (%)
<i>Cronobacter sakazakii</i>	13 (13)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	30 (30)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6 (6)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1 (1)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	22 (22)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7 (7)
<i>Serratia liquefaciens</i>	6 (6)
<i>Serratia marcescens</i>	14 (14)
Total aislamientos	100 (100)

9.2 Frecuencia de genes de resistencia en bacterias entéricas

Se determinó la frecuencia de los genes de codifican para resistencia antibiótica a tetraciclinas *tetM* y *tetQ*, y para resistencia a ciprofloxacina *qnrB* y *qnrS*, en los 100 aislamientos de bacterias entéricas. Se observó que el gen encontrado en mayor frecuencia fue *tetM* en un 52%, principalmente en los géneros *Enterobacter* (56%) y *Klebsiella* (85%), seguido de *qnrB*, el cual se detectó en un 17%, encontrándose en *Klebsiella* en un 35%, y en *Cronobacter* en un 23%. Los genes *tetQ* y *qnrS* fueron detectados en baja frecuencia (3% y 1% respectivamente). En la tabla 4 se observa la frecuencia de los genes de resistencia antibiótica en los géneros de bacterias entéricas aisladas de muestras de salivas.

Tabla 4. Frecuencia genes de resistencia *tetM*, *tetQ*, *qnrS* y *qnrB* en *Enterobacterias* aisladas en muestras de saliva.

Género	n	<i>tetQ</i> F (%)	<i>tetM</i> F (%)	<i>qnrS</i> F (%)	<i>qnrB</i> F (%)
<i>Enterobacter</i>	37	2 (5)	21(56)	0(0)	5 (13)
<i>Cronobacter</i>	13	0 (0)	9 (69)	0(0)	3 (23)
<i>Serratia</i>	30	0 (0)	5 (16,6)	0 (0)	2 (6,6)
<i>Klebsiella</i>	20	0 (0)	17 (85)	1(5)	7 (35)
Total	100	2 (2)	52 (52)	1 (1)	17 (17)

En cuanto a la identificación de los genes de interés en la diferentes especies, se observó que *tetM* estaba presente principalmente en *Enterobacter cloacae* (57%) y *Klebsiella oxytoca* (55%), seguida por *Cronobacter sakazakii* (69%), *Klebsiella pneumoniae* (71%), *Serratia marcescens*(29%), *Enterobacter gergoviae* (67%) y *Serratia liquefaciens*. *tetQ* fue identificado únicamente en *Enterobacter cloacae* (7%), *qnrS* fue encontrado solamente en *Klebsiella pneumoniae* (14%) y *qnrB* se identificó en *Klebsiella oxytoca* (32%), *Enterobacter cloacae* (17%), *Cronobacter sakazakii* (23%) y *Serratia marcescens* (14%). En *Klebsiella aerogenes* y *Enterobacter aerogenes* no se detectó ningún gen (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de genes de resistencia *tetM*, *tetQ*, *qnrS* y *qnrB* en *Enterobacterias* aisladas en muestras de saliva

Género y especie	n	<i>tetQ</i> F (%)	<i>tetM</i> F (%)	<i>qnrS</i> F (%)	<i>qnrB</i> F (%)
<i>Cronobacter sakazakii</i>	13(13)	0(0)	9(69)	0 (0)	3(23)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1(1)	0(0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	30(30)	2 (7)	17(57)	0 (0)	5(17)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6(6)	0 (0)	4(67)	0 (0)	0 (0)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	22(22)	0 (0)	12(55)	0 (0)	7(32)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7(7)	0 (0)	5(71)	1(14)	0 (0)
<i>Serratia liquefaciens</i>	6(6)	0 (0)	1(16)	0 (0)	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i>	14(14)	0 (0)	4(29)	0 (0)	2(14)
Total	100(100)	2 (2)	52 (52)	1 (1)	17 (17)

10. Discusión

Las enterobacterias son organismos que se encuentran ampliamente distribuidos, y aunque no se consideran microbiota normal en la cavidad oral, conllevan gran relevancia debido a la capacidad que tienen para albergar una cantidad importante de genes de resistencia a antibióticos, que pueden ser transmitidos a otras bacterias, complicando los tratamientos odontológicos. Así mismo estas bacterias pueden ser un factor de predisposición o agravar enfermedades sistémicas.

Diversos autores han reportado la presencia de bacterias entéricas en cavidad oral, consideradas microorganismos transeúntes, y se ha observado que los géneros más frecuentes han sido *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., y *Serratia* spp. Estudios realizados en Colombia reportan que en cavidad oral se han encontrado organismos inusuales tipo bacilos Gram negativos conformados en su gran mayoría por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Escherichia coli* (Betancourth *et al.*, 2006). En otro estudio realizado por Ardila *et al.*, (2010) identificó que *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* son las especies más prevalentes en Colombia y por otro lado, Rodríguez *et al.*, (2012), manifiestan que las especies con mayor prevalencia en cavidad oral fueron *Klebsiella* spp y *E.coli* en la ciudad de Bogotá. De acuerdo con los resultados de este estudio se encontró que el género más frecuente fue *Enterobacter* (50%) y la especie más común dentro de este género fue *Enterobacter cloacae* (30%) entre todos los aislamientos, seguida por el género *Klebsiella* (30%) principalmente *Klebsiella oxytoca* (22%) y *Serratia* (20%). Estos resultados concuerdan con los estudios reportados en Colombia, anteriormente mencionados, y con el estudio de Leão-Vasconcelos *et al.*, (2015) en donde se realizó la identificación de especies provenientes de la familia *Enterobacteriaceae* de muestras de saliva en trabajadores de la ciudad de Brasil, encontrando con mayor prevalencia los géneros *Enterobacter* (46.9%), *Klebsiella* (18.8%) y *Citrobacter* (17.2%). También se observa que en el estudio realizado por Slots *et al.*, (1998) en donde el objetivo era detectar la frecuencia de levaduras, bacilos entéricos y pseudomonas, encontraron que *Enterobacter cloacae* (37%) es una de las especies dentro del género *Enterobacter* con mayor frecuencia en cavidad oral, seguido por *Klebsiella*

oxytoca (34%). La presencia de bacterias entéricas en cavidad oral puede ser debido a contaminación por fuentes exógenas, contaminación mano-ano-boca, mala higiene oral, ingestión de agua o alimentos contaminados, contaminación de los cepillos dentales, bajo nivel de desarrollo social, económico y cultura, según lo reportado en la literatura (Ardila et al., 2010; Junior et al., 2011; Silva et al., 2016).

Debido al amplio uso de los antibióticos en la práctica clínica odontológica, y su uso indiscriminado a nivel general, se han realizado varios estudios alrededor del mundo evaluando la presencia de genes de resistencia en las enterobacterias, principalmente en el ámbito médico, pero pocos estudios han evaluado la presencia de estos genes, en bacterias aisladas de la cavidad oral, incluyendo Colombia, ya que su presencia puede variar de acuerdo con la ubicación geográfica. Respecto a los genes encontrados en este estudio, se evidencio que *tetM* (52%) fue el gen detectado más frecuentemente. Según la literatura *tetM* es un gen que codifica para resistencia a las tetraciclinas el cual se une al ribosoma y expulsa el fármaco de su sitio de unión (Arenz et al., 2015). Las tetraciclinas son muy eficaces contra bacterias periodontopatógenas y muy utilizadas en odontología en especial la doxiciclina, por su alto nivel de absorción, gran unión a las proteínas plasmáticas y concentraciones en el fluido gingival 2 a 4 veces superiores a las séricas (Falcao Costa et al., 2001). En los últimos años, se ha visto que la resistencia a la tetraciclina se ha diseminado ampliamente en los bacilos entéricos debido al uso indiscriminado de los antibióticos y falta de educación en higiene oral (Ramos et al., 2010; Silva et al., 2016). La alta frecuencia de este gen genera gran preocupación ya que la presión selectiva puede generar su expresión, lo cual causa fallas en la terapia antibiótica, y resalta la probabilidad de que la cavidad oral sea una fuente importante para el contenido y la propagación de genes de resistencia a este tipo de antibióticos. Se ha reportado que *tetM* se encuentra comúnmente en bacilos entéricos como *E. coli* (Ramos et al., 2010; T. Zhang et al., 2012). En el presente estudio este gen fue detectado principalmente en *Enterobacter cloacae* y *klebsiella oxytoca*.

Aunque *tetQ* también se ha relacionado con resistencia a tetraciclina, ya que codifica para proteínas citoplásmicas que protegen a los ribosomas de la acción del antibiótico (Roberts

& Schwarz, 2017), se detectó solamente en dos aislamientos de *Enterobacter cloacae*, lo cual puede indicar que las bacterias entéricas no son un reservorio importante de este gen.

Respecto a los genes asociados con resistencia a fluoroquinolonas, si bien no es una familia de antibióticos de primera elección en odontología se ha observado su uso principalmente en individuos que presentan alergias a los antibióticos de uso común como las penicilinas (Villarraga & Clavel, 2012), o en infecciones de difícil manejo. Se ha descrito que esta familia de antibióticos es muy eficaz contra las enterobacterias, pero se ha observado una tendencia creciente de resistencia al fármaco. Otros estudios han evidenciado su potencial para erradicar las bacterias entéricas Gramnegativas de las bolsas periodontales ya que tiene mayor concentración en líquido crevicular que en plasma (Falcao *et al.*, 2001). Uno de los mecanismos que más se ha asociado con la resistencia a las fluoroquinolonas ha sido mediado por plásmidos, los reportes han relacionado genes como *qnrB* y *qnrS* a este mecanismo de resistencia. Al analizar los resultados se observa que la frecuencia de *qnrB* fue baja, pero se detectó de manera importante en los aislamientos de *Enterobacter cloacae* (30%). Este bacilo es uno de los microorganismos más comunes encontrados en cavidad oral de manera transeúnte, ha sido reportado como un microorganismo importante, oportunista y uno de los patógenos bacterianos multirresistentes más importantes, interviniendo como uno de los autores principales en infecciones intrahospitalarias desde 1993 (Regli & Pagès, 2015).

Según la literatura *qnrB* es uno de los genes más comúnmente encontrados en bacilos entéricos (Salah *et al.*, 2019) en *Klebsiella* y *Enterobacter* con una gran frecuencia (Nordmann & Poirel, 2005; A. Robicsek *et al.*, 2006; Tamang *et al.*, 2008), prevaleciendo más en la especie *Enterobacter cloacae* (Wu J *et al.*, 2007). Aunque lo anterior concuerda con el resultado de la investigación en cuanto a la especie, no se podría decir que el gen fue encontrado con una alta frecuencia.

La presencia de genes de resistencia a antibióticos que se usan para el tratamiento alternativo al de primera elección, de infecciones causadas o asociadas con bacilos entéricos, en el ámbito odontológico, genera un llamado de atención que se suma a fortalecer de manera significativa la vigilancia y el reporte constante de resistencia

antibiótica, así como la prescripción y campañas de educación en torno al uso adecuado de los antibióticos.

11. Conclusiones

Aunque los bacilos entéricos no hacen parte de la microbiota normal de la cavidad oral pueden ser considerados reservorios importantes de genes de resistencia a antibióticos que son empleados en odontología no solo en los de primera elección, sino también en los que se utilizan como tratamiento alternativo.

Se observa que no hay relación entre los resultados de la investigación en cuanto al gen *tetM* y lo encontrado en la literatura. Por otra parte, los hallazgos involucrando *qnrB* tienen relación con lo encontrado en la literatura, lo cual nos afirma que la resistencia a fluoroquinolonas significativa y que puede hacer una propagación de resistencia importante a través de bacilos entéricos.

12. Recomendaciones

Se considera que es necesario hacer una investigación más detallada con un número de muestra más amplia y así evaluar más genes relacionados con resistencia a tetraciclinas y fluoroquinolonas, relacionando su presencia con el diagnóstico clínico.

12. Referencias

Ardila Medina CM, Alzate Vega J, Guzmán Zuluaga IC. Correlación de bacilos entéricos gram-negativos con parámetros clínicos y demográficos de pacientes con periodontitis crónica. *Av Periodon Implantol.* 2014; 26 (2): 77-82.

Ardila Medina CM. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Av Periodon Implantol.* 2010; 22, 1: 27-35

Apurba S, Sandhya K. Enterobacteriaceae-I. JP Medical Ltd. Essentials of Medical Microbiology. 2 ed. Panama City, Panama. Jaypee Brothers Medical Publishers. 2019. 1-705.

An D, Danhorn T, Fuqua C, Parsek MR. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(10):3828–3833.

Akbari, M., Bakhshi, B., & Peerayeh, S. N. Particular distribution of *Enterobacter cloacae* strains isolated from urinary tract infection within clonal complexes. *Iranian biomedical journal*, 2016(1), 49

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios AEMPS. Quinolonas y fluoroquinolonas de administración sistémica: Nuevas restricciones de uso. España. 2018

Arenz S, Nguyen F, Beckmann F, Daniel N. Wilson. Cryo-EM structure of the tetracycline resistance protein TetM in complex with a translating ribosome at 3.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(17): 5401–5406.

A.Robicsek, J. Strahilevitz, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, D. C. Hooper. qnr Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(8):2872-4.

Brugueras M, Morejón M, Salup R. Actualidad de las quinolonas. Rev Cubana Farm. 2005; 39: 1.

Bascones A., Aguirre J., Bermejo A., Blanco A., Gay C., González M., Gutiérrez J *et al.* Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2004;9: 363-76.

Betancourth M, Arce R, Botero J, Jaramillo A, Cruz C, Contreras A. Microorganismos inusuales en surcos y bolsas periodontales. Colombia Médica. 2006; 37(1): 6-14.

Collins J, Arredondo A, Roa A, Valdez Y, León V R, Blanc. Periodontal pathogens and tetracycline resistance genes in subgingival biofilm of periodontally healthy and diseased Dominican adults. Clin Oral Invest (2016) 20:349–356.

Chattaway M., Aboderin A, Fashae K, Okoro C, Opintan J., and Okeke I. Fluoroquinolone-Resistant Enteric Bacteria in Sub-Saharan Africa: Clones, Implications and Research Needs. Frontiers in Microbiology. 2016. 22(7):558.

Chander, Y., Ramakrishnan, M. A., Jindal, N., Hanson, K., & Goyal, S. M. Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* by multiplex polymerase chain reaction. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, 2011; 9(2), 138.

Chen, W., Yu, S., Ren, J., Shi, C., Hang, F., & Guo, B. (2015). Development of a PCR Assay for Rapid Detection of *Cronobacter sakazakii* from Powdered Infant Formula Using a Target Sequence Identified by Comparative Genomic Analysis. Journal of Food Safety, 35(3), 378-384.

Dresler A, Wirtz VJ, Corbett KK, Echániz G. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. Salud Publica Mex 2008; 50 (4) :S480-S487.

Davidson, R. J., Davis, I., Willey, B. M., Rizg, K., Bolotin, S., Porter, V *et al.* Antimalarial therapy selection for quinolone resistance among *Escherichia coli* in the absence of quinolone exposure, in tropical South America. *Plos One*. 2008. 3(7):e2727.

Dong D., Liu W., Li H., Wang Y., Li X., Zou, D *et al.* Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcsA* gene in Beijing, China. *Frontiers in microbiology*. 2015; 6, 519.

European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae . Stockholm: ECDC; 2016.

F. Albalat Estela, F.J. Gil Loscos, A. Caballero Carbonell. Bases del uso de antibióticos en periodoncia para el higienista dental. *Periodoncia para el higienista dental*. 2002; 12 (3): 223-230.

Guzmán IC, Grisales H, Ardila CM. Administración sistémica adjunta de moxifloxacina versus ciprofloxacina más metronidazol en el tratamiento de periodontitis crónica con presencia de bacilos entéricos Gram negativos: II. Análisis multinivel. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* 2012; 23(2): 207-224.

J. A. García Rodríguez, R. Serrano, E. Moreno. Recomendaciones de tratamiento antimicrobiano en pacientes alérgicos a antibióticos betalactámicos. *Rev Esp Quimioter*. 2008; 21(1):60-82

Jovcic, B., Lepsanovic, Z., Suljagic, V., Rackov, G., Begovic, J., Topisirovic, L. and Kojic, M. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; 55(8), pp.3929-3931.

Jlili, N. E. H., Réjiba, S., Smaoui, H., Guillard, T., Chau, F., Kechrid, A., & Cambau, E. Trend of plasmid-mediated quinolone resistance genes at the Children's Hospital in Tunisia. *Journal of medical microbiology*. 2015; 63(2), 195-202.

Jorn A, Paster B,1, Stokes L , Olsen I , Floyd E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2005, p. 5721–5732 Vol. 43, No. 11 0095-1137.

Júnior E, Ciesielski F, Sousa F, Nwaokorie F , Schweitzer C , Campos M. Occurrence of yeasts, pseudomonads and enteric bacteria in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. Brazilian Journal of Microbiology. 2011 42: 1047-1055.

Kullin, B., Meggersee, R., D'Alton, J., Galvao, B., Rajabally, N., Whitelaw, A *et al.* Prevalence of gastrointestinal pathogenic bacteria in patients with diarrhoea attending Groote Schuur Hospital, Cape Town, South Africa. South African Medical Journal, 2015; 105(2).

López-Velandia DP, Torres-Caycedo MI, Prada- Quiroga CF. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. Rev Univ. Salud. 2016;18(1):190-202.

Lafaurie G, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga I. *et al.* Demographic, Clinical, and Microbial Aspects of Chronic and Aggressive Periodontitis in Colombia: A Multicenter Study. J Periodontol. 2007; 78 (4): 629-639.

Lamikanra, A., Crowe, J. L., Lijek, R. S., Odetoyin, B. W., Wain, J., Aboderin, A. O., *et al.* Rapid evolution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Nigeria is temporally associated with fluoroquinolone use. BMC. Infect. Dis. 2011 7(1):312.

Leão-Vasconcelos L, Lima A, Costa D, Rocha-Vilefort L, Oliveira A, Gonçalves N, *et al.* Enterobacteriaceae isolates from the oral cavity of workers in a brazilian oncology hospital. Rev. Inst. Med. Trop. 2015; 57(2):121-127

M. Rodríguez, J. Gundián, J. Barreto. Tetraciclinas. *Acta medica* 1998; 8(1):75-9

Moura e Sá A, Falcao Costa C, Faria Almeida R, Bascones A. Antibioterapia en Periodoncia - situación actual (II). Antibióticos y Antimicrobianos Locales. *Av Periodon Implantol.* 2001; 13,2: 77-81.

Namboodiri, S. S., Opintan, J. A., Lijek, R. S., Newman, M. J., and Okeke, I. N. Quinolone resistance in *Escherichia coli* from Accra, Ghana. *BMC Microbiol.* 2011. 27(11) 44.

Organización Mundial de la Salud (OMS). La resistencia a los antimicrobianos. Bangkok; 2018.

Puerta García, A. and Mateos-Rodríguez, F. Enterobacterias. Unidad de Enfermedades Infecciosas. 2007 10(51), pp.3426-31.

Paton, J. H., and Reeves, D. S. Fluoroquinolone antibiotics. *Microbiology, pharmacokinetics and clinical use.* (1988) 36(2): 193–228.

P Nordmann, L Poirel. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2005) 56, 463–469

Quintana S, Sjöström P, Socarrás D, Baldeón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Rev Cubana Estomatol.* 2017; 54(1)

Ramos M, Gaetti-Jardim E, Gaetti-Jardim E. Resistance to tetracycline and -lactams and distribution of resistance markers in enteric microorganisms and pseudomonads isolated from the oral cavity. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17: 13–18

Roberts, M. C., & Schwarz, S. Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. *Antimicrobial Drug Resistance.* 2017; 231-243.

Rodríguez I, Calixto O, Cuervo W, Vásquez J, Ojeda J, Barinas D. Microorganismos presentes en fonendoscopios, manos, cavidad oral y nasal de estudiantes de una facultad de medicina. *Rev.Fac.Med.* 2012; 20(1) pp.90-100.

Regli A y Pagès J. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front. Microbiol.* 2015; 6:392.

Sara Martí Martí. Molecular bases of antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. clinical isolates [tesis doctoral]. Universitat de Barcelona. Barcelona.2005

Salyers, A., Gupta, A. and Wang, Y. Human intestinal bacterias reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends iMicrobiology.* 2004; 12(9): pp.412-416.

Silva S, RIBEIRO M, Gomes F, Chaves H, Silva A, Zannin I , *et al.* Occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads isolated from the dental prostheses biofilm. *J Appl Oral Sci.* 2016; 24(5):462-471.

Schaik V, W. The human gut resistome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 201; 370 (1670): pp.20140087-20140087.

Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3: 47-52.

Serrano. A, Sánchez M, Cardona N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Rev. CES Odont* 2015; 28(2): 112-118.

Salah F, Soubeiga S, Ouattara A, Sadjí A , Metuor-Dabire A , Obiri-Yeboah D *et al.* Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019; 8: 104.

T. Zhang, C. G. Wang, J. C. Lv , R. S. Wang , X. H. Zhong. Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian *Escherichia coli* in North China. *Poultry Science*. 2012; 91: 2774–2777.

Tinoco, E., Beldi, M., Campedelli, F., Lana, M., Loureiro, C. and Bellini, H. Clinical and Microbiologic Effects of Adjunctive Antibiotics in Treatment of Localized Juvenile Periodontitis. A Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology*. 1998; 69(12), pp.1355-1363.

Tamang M, Seol S, Oh J, Kang H, Lee J, Y Lee, *et al*. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in a Korean Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(11): 4159–4162.

Vicente D., Pérez E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(2):122–13.

Vignoli, R. and Seija, V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas De Bacteriología Y Virología Médica*. 2007; 35, pp.649-662

Villagrana A y Clavel J. Terapia antibiótica en odontología de práctica general. *REVISTA ADM*. 2012; 69 (4): 168-175.

Walsh, T., Weeks, J., Livermore, D. and Toleman, M. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2011(5), pp.355-362.

Wu J, Ko W, Tsai S, Yan J. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants *QnrA*, *QnrB*, and *QnrS* among Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(4): 1223–1227.