

**PREVALENCIA DE LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA *cfxA*, *cfxA2*,
bla_{TEM}, *tetM*, *tetQ* y *ermF* EN AISLAMIENTOS ORALES DE *Prevotella*
melaninogenica.**

**Bibiana Vanessa Diaztagle Cadena
Leidy Marcela Muñoz Gamboa**

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

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Prevalencia de los genes de resistencia antibiótica <i>cfxA</i> , <i>cfxA2</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> , <i>ermF</i> en aislamientos orales de <i>Prevotella melaninogenica</i> .
Grupo de Investigación:	Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral)
Línea de investigación:	Microbiología Oral-UIBO
Institución(es) participante(s):	Universidad El Bosque Unidad de Investigación Básica Oral (U.I.B.O) Facultad de Odontología
Tipo de investigación:	Pregrado/Grupo
Estudiantes/ residentes:	Bibiana Vanessa Diaztagle Cadena Leidy Marcela Muñoz Gamboa
Director:	Dra. Yormaris Castillo Romero
Codirector	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor estadístico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ 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

A la Universidad el Bosque, a la facultad de odontología y al instituto UIBO-MO (Unidad Básica de Investigación Oral-Microbiología Oral) quienes nos abrieron sus puertas permitiéndonos ampliar nuestros conocimientos y complementar nuestra formación como profesionales.

A la Dra. Gloria Lafaurie, la Dra. Diana Marcela Castillo, la Dra. Yormaris Castillo, la Dra. Nathaly Delgadillo y la Dra. Yineth Neuta gracias por su disposición, por brindarnos la confianza necesaria, sus conocimientos y paciencia, por permitirnos trabajar día a día depositando su mayor esfuerzo para cumplir con este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo de grado primeramente a Dios, quien nos guió y acompañó en este proceso, dándonos fortaleza, sabiduría e inteligencia en cada momento de nuestra carrera; a nuestros padres, quienes con su amor y cariño hicieron que nuestra carga fuera más liviana, y con sus consejos nos brindaron fuerzas para luchar contra todas las adversidades que se nos presentaron, gracias a su apoyo incondicional y comprensión, desfallecer nunca fue una opción.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
Lista de tablas	
Lista de figuras	
	Pág.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Microbiota oral	3
2.2 Características del género <i>Prevotella</i> spp	4
2.3 Antibióticos de uso en odontología.....	7
2.3.1 Antibióticos β - lactámicos	9
2.3.2 Amino glucósidos y macrólidos	11
2.3.3 Nitroimidazoles	12
2.4 Resistencia antibiótica	13
2.5 Mecanismos de resistencia antibiótica en <i>Prevotella melaninogenica</i>	16
2.5.1 Genes de resistencia a β - lactámicos	17
2.5.1.1 Gen <i>bla_{TEM}</i>	18
2.5.2 Gen <i>tetQ</i> y <i>tetM</i>	18
2.5.3 Gen <i>ermF</i>	19
3. Planteamiento del problema	20
4. Justificación	22
5. Situación Actual	24
6. Objetivos.....	27
6.1 Objetivo general	27
6.2 Objetivos específicos	27
7. Metodología del Proyecto	28
7.1.Tipo de estudio	28
7.2. Población y muestra	28
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información	28
7.3.1 PCR convencional para la identificación de <i>Prevotella melaninogenica</i>	28
7.3.2 Detección de los genes <i>cfxA</i> , <i>cfxA2</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> y <i>ermF</i> por PCR convencional.....	29
7.4 Plan de tabulación y análisis.....	32
8. Consideraciones éticas.....	33
9. Resultados	34
10. Discusión	38
11. Conclusiones	42
12. Perspectivas y recomendaciones	43
13. Referencias bibliográficas	44

RESUMEN

PREVALENCIA DE GENES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* EN AISLAMIENTOS ORALES DE *Prevotella melaninogenica*.

Introducción: *P. melaninogenica* es un microorganismo que coloniza la cavidad oral durante la primera infancia, es parte de la microbiota oral normal, sin embargo, esta especie ha cobrado importancia a nivel clínico debido a su amplio perfil de resistencia frente a varias familias de antibióticos utilizados en el campo de la odontología como son β -lactámicos, Tetraciclinas y Macrólidos. **Objetivo:** Determinar la prevalencia de los genes de resistencia antibiótica *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* en aislamientos clínicos orales de *Prevotella melaninogenica*. **Metodología:** Estudio experimental *in vitro*. Se evaluaron 341 aislamientos orales de *Prevotella* spp y se confirmó la especie *P. melaninogenica* por PCR convencional; como control se empleó ADN de *P. melaninogenica* ATCC 25845. La presencia de los genes *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF*, fue determinada por PCR convencional. Como controles positivos se emplearon cepas de referencia productoras de β -lactamasas y cepas de referencia resistentes a amino glucósidos, tetraciclinas y macrólidos. Se determinaron asociaciones entre factores clínicos, sistémicos y fisiológicos con la presencia de la especie y la frecuencia de genes de resistencia.

Resultados: De los 341 aislamientos orales de *Prevotella* spp, se obtuvo una frecuencia de *Prevotella melaninogenica* en un 12.3% se observó mayor frecuencia del gen *tetQ* en un 26,1% seguido de los genes *bla_{TEM}* y *tetM* los con una frecuencia de 21,4%. Los genes *cfxA2*, *cfxA* y *ermF* se encontraron en una menor frecuencia de 19%, 14.3 % y 11,9% respectivamente. Respecto a las asociaciones de los genes estudiados con el tipo de muestra, condición periodontal y sistémica, se observó una diferencia significativa ($p= 0.039$) para el gen *ermF* en las muestras de hisopado analizadas. **Conclusiones:** La prevalencia de genes de resistencia antibiótica en aislamientos clínicos orales de *Prevotella melaninogenica* es alta para antibióticos de la familia de las tetraciclinas, seguido de los β - lactámicos. Estos resultados podrían asociarse en algunos casos con pobre respuesta a la terapia antibiótica de primera y segunda elección en procesos infecciosos en cavidad oral.

Palabras claves: *Prevotella melaninogenica*, cavidad oral, Genes de resistencia antibiótica.

ABSTRACT

PREVALENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANT GENES *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* AND *ermF* IN ORAL ISOLATIONS OF *Prevotella melaninogenica*

Introduction: *P. melaninogenica* is a micro-organism which colonises the oral cavity during first infancy, it is part of the normal micro-biota and it has acquired clinical relevance due to its ample resistance profile to various antibiotic families used in dentistry such as β -lactamines, tetracyclines and macrolides. **Objectives:** to determine the prevalence of *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* and *ermF* genes with antibiotic resistance in clinical oral isolations of *Prevotella melaninogenica*. **Methodology:** This was an experimental in vitro study with 341 oral isolations of *Prevotella* spp, confirming *P. melaninogenica* with conventional PCR. DNA of *P. melaninogenica* ATCC 25845 was used as control and the presence of *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* and *ermF* was confirmed with conventional PCR. Reference cultures producers of β -lactamines and cultures resistant to aminoglycosides, tetracyclines and macrolides were used as positive controls.

Results: The 341 oral isolations of *Prevotella* spp yielded a frequency of *Prevotella melaninogenica* of 12.3%; a higher frequency of 26.1% of *tetQ* was observed, followed by *bla_{TEM}* and *tetM* with a frequency of 21.4%. The *cfxA2*, *cfxA* and *ermF* genes were found with a lower frequency of 19%, 14.3% and 11.9% respectively. There was a significant difference ($p=0.039$) regarding the association of evaluated genes with the type of sample, periodontal and systemic condition for *ermF* in the analysed hyssop samples. **Conclusions:** The prevalence of antibiotic resistant genes in oral clinical isolations of *Prevotella melaninogenica* is high for tetracyclines, followed by β -lactamines antibiotics. These results could be associated in some cases with a poor response to first and second choice antibiotic therapy in oral cavity infectious processes.

Keywords: *Prevotella melaninogenica*, oral cavity, Antibiotic resistant genes.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
Tabla 1	Secuencia de primers y condiciones de amplificación.	28
Tabla 2	Frecuencia de <i>P. melaninogenica</i> en los aislamientos orales de <i>Prevotella spp.</i>	33
Tabla 3	Frecuencia de los genes <i>cfxA</i> , <i>cfxA2</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> y <i>ermF</i> en aislamientos de <i>P.melaninogenica</i> .	34
Tabla 4	Asociación entre genes de resistencia con tipo de muestra (Placa bacteriana, hisopado y saliva).	35
Tabla 5	Asociación entre genes de resistencia y condición periodontal.	35
Tabla 6	Asociación entre genes de resistencia con Condición sistémica.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	Estructura de los antibióticos β -lactámicos.	9
Figura 2	Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.	10
Figura 3	Mecanismo de acción de los antibióticos Tetraciclinas.	11
Figura 4	Mecanismo de acción de los antibióticos Macrólidos.	12
Figura 5	Activación y acción del Metronidazol.	13
Figura 6	Principales mecanismos de resistencia antibiótica en bacterias Gram negativas	15
Figura 7	β -lactamasas cfxA, cfxA2	17

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Término	Página
PBP	Proteínas de unión a la penicilina	9
CIM	Concentración mínima inhibitoria	14
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	27

INTRODUCCIÓN

La cavidad oral es un hábitat ideal para la colonización microbiana, se han descrito más 700 especies bacterianas bien sea microbiota residente o comensal, estos microorganismos evolucionan e interactúan coexistiendo a partir de la agregación y coagregación de diferentes especies, el ambiente de la boca es un entorno en el que las bacterias suelen intercambiar su material genético (Duppín *et al.*, 2015). El acúmulo de biofilm en la superficie de los dientes puede llevar a un desequilibrio en la abundancia relativa y composición microbiana y alterar la respuesta inmunológica de hospedador, permitiendo así que las bacterias comensales o patobiontes puedan llegar a ser responsables de infecciones locales o enfermedades sistémicas (Ruan *et al.*, 2015).

Prevotella, es un género bacteriano que pertenece al complejo naranja de acuerdo con la clasificación de Haffajee *et al.*, 2008. Anteriormente clasificada en el género *Bacteroides*, pertenecen al filo Bacteroidetes, son bacilos Gram negativos, anaerobios obligados. Este género se reporta como el más frecuente en procesos infecciosos polimicrobianos de origen oral como enfermedad periodontal, abscesos de origen dental o periodontal en estados crónico y agudos (Xie *et al.*, 2014, Warnkenke *et al.*, 2008).

El género *Prevotella* spp, presenta una fuerte asociación y/o sinergismos con microorganismos patógenos orales, comportándose como patógeno putativo y a su vez por la detección frecuente de genes de resistencia relacionados con fracaso de la terapia antibiótica de primera elección en odontología (Rocas *et al.*, 2013).

Prevotella melaninogenica, por su parte, es una especie de este género que se aísla en cavidad oral como microbiota normal. Sin embargo, es frecuente detectarla en infecciones de tejidos blandos, tracto respiratorio, entre otras (Odeh *et al.*, 2000).

En los últimos años, se ha informado un aumento constante de la resistencia a penicilinas especialmente por parte de esta especie (Falagas & Siakavellas. 2000).

El establecimiento de una terapia de manejo a través de la instrumentación mecánica, el drenaje y la erradicación de la fuente de infección son procedimientos fundamentales que se llevan a cabo para controlar con éxito las infecciones polimicrobianas. Sin embargo, este

tratamiento se complementa médicamente con la implementación de una terapia antimicrobiana generalmente empírica (Islam *et al.*, 2008).

La terapia antibiótica suele realizarse con las principales familias de antibióticos como son, β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, metronidazol y clindamicina, el uso continuo y/o inadecuado de estos, puede favorecer el desarrollo de resistencia, por presión selectiva en el genoma microbiano que conduce a la expresión de genes que codifican para resistencia a estos antibióticos como *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ*, *ermF* respectivamente (Duppin *et al.*, 2015).

En Colombia existen pocos reportes registrados que permitan conocer la realidad nacional y magnitud del problema que causa la resistencia antibiótica a nivel de salud oral (Jaramillo *et al* 2008).

Las bacterias han desarrollado resistencia a antibióticos por factores intrínsecos como la transferencia de genes entre células bacterianas, que pueden ser portados por los microorganismos sin ser expresados. Sin embargo, por la presión de selectiva que ejercen los antibióticos sobre estos microorganismos, estas bacterias pueden activar la transcripción de estos genes, favoreciendo la resistencia antibiótica y por tanto la supervivencia de estas cepas (Aguilar *et al.*, 2012). Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo determinar la prevalencia de genes de resistencia en aislamientos clínicos orales de *Prevotella melaninogenica* y asociar su presencia con factores clínicos y sistémicos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Microbiota oral

En de la cavidad oral se puede encontrar gran diversidad de especies bacterianas ya sea microbiota residente o comensal, estos microorganismos evolucionan e interactúan coexistiendo a partir de la agregación, coagregación e intercambio de su material genético entre diferentes especies (Dupin *et al.*, 2015). El acúmulo de biofilm en la superficie de los dientes puede llevar a un desequilibrio de esta microbiota y alterar la respuesta inmunológica del hospedador, permitiendo así que las bacterias que actúan como comensales y transitorias pueden llegar a ser responsables de infecciones locales como caries, periodontitis, absceso periapical, absceso periodontal, pericoronitis, pulpitis, sinusitis, osteítis e infección de los espacios aponeuróticos, enfermedades sistémicas cardiovasculares o infecciones respiratorias (Ruan *et al.*, 2015, Medinaina., 2009). Estas infecciones suelen ser de tipo polimicrobiano las cuales pueden ser causadas por las combinaciones de virus, bacterias, hongos, y parásitos, en estas infecciones un microorganismo actúa como anfitrión a la colonización por otros microorganismos y en conjunto pueden causar la enfermedad (Brogden *et al.*, 2005).

Bacterias anaerobias como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella melaninogenica*, *Parvimonas micra* y *Eubacterium nodatum* se encuentran asociadas a infecciones polimicrobianas tales como enfermedades periodontales, abscesos odontogénicos, infecciones orofaciales (Ruan *et al.*, 2015).

Las biopelículas ofrecen una excelente oportunidad para estudiar la transferencia de genes en una población bacteriana que se encuentre asociada a enfermedades. El intercambio genético permite transferir genes de resistencia a antibióticos, lo que puede dar lugar a infecciones que no cedan a la terapia instaurada (Tribble., 2010).

2.2 Características del género *Prevotella* spp

Prevotella spp, anteriormente clasificada en el género *Bacteroides*, son bacilos Gram negativos, anaerobios obligados. Se clasifican como; bacterias negro pigmentadas (BNP); ya que forman colonias brillantes y lisas con color gris, marrón claro o negro; y requieren hemina y menadiona para crecer, *Prevotella* es un género versátil que se ha observado en varios nichos, como la cavidad oral, el tracto respiratorio superior, el tracto urogenital (Ruan *et al.*,2015).

Se ha detectado con frecuencia *Prevotella* spp en placa dental de pacientes con enfermedades periodontales, donde se comportan como patógenos oportunistas formando sinergismos con bacterias periodontopatógenas causantes de enfermedad periodontal (Socransky *et al.*, 1998) asimismo se han descrito altas tasas de resistencia antibiótica en este género y un gran número de fracasos en la terapia antibiótica convencional (Falagas & Siakavellas. 2000, Dupin *et al.*, 2015).

Se ha reportado en literatura que diferentes especies del género *Prevotella* son las más frecuentemente aisladas en los abscesos periodontales; observándose en los resultados de estos estudios una resistencia elevada a clindamicina y roxitromicina; por lo que se ha sugerido que el uso de estos antibióticos es inaceptable para la terapia empírica de los abscesos periodontales (Xie *et al.*,2014). Por esto, los antibióticos deben usarse según los genotipos bacterianos y el estado general de los pacientes (Shanghai *et al.*, 2012).

El primer vínculo entre *Prevotella* spp y la enfermedad periodontal crónica se indicó desde 1928 con la observación de anaerobios Gram negativos pigmentados; (Larsen., 2017). Está bien establecido que las bacterias, cuando su abundancia relativa supera los umbrales de tolerancia, estas se comportan como patobiontes iniciadores importantes y necesarios de enfermedades infecciosas inflamatorias crónicas como la periodontitis, caracterizadas por el reclutamiento de neutrófilos, aumento en citocinas proinflamatorias e inducción de expresión de metaloproteinasas que median la destrucción de los tejidos conectivos y el

hueso alveolar de manera similar al proceso inducido por bacterias patógenas periodontales, favoreciendo un estado disbiótico a nivel de la placa dental (Larsen., 2017).

Un estudio reciente en ratones ha demostrado que *Prevotella nigrescens*, de manera similar a *P. gingivalis*, puede favorecer la enfermedad periodontal; ya que los autores reportan que *Prevotella nigrescens* controla la respuesta T helper tipo 17 (Th17) *in vitro* a través de la inducción en la producción de IL-1 por parte de células dendríticas derivadas de médula ósea en una forma dependiente del receptor Toll-like 2 (TLR2). El papel de *Prevotella* en la respuesta inmune mediada por Th17 en la periodontitis está respaldada por estudios que vinculan los niveles de IL-1a e IL-1b en el fluido crevicular con la colonización de *Prevotella* (Larsen., 2017).

Los estudios sugieren que *Prevotella* puede promover la periodontitis al impulsar el reclutamiento de neutrófilos a través de las respuestas inmunitarias Th17. La activación crónica de la vía Th17 puede mediar en la destrucción de tejidos y huesos porque los neutrófilos reclutados son incapaces de eliminar las bacterias y promover la resolución de la inflamación de los tejidos(Larsen.,2017).

Estudios recientes reportan que, *Prevotella nigrescens* induce periodontitis en ratones después de la inoculación oral, en consecuencia, los ratones infectados mostraron un inicio y gravedad acelerada de la artritis, lo que sugiere que *Prevotella* se puede asociar con estas entidades (Larsen., 2017). Los estudios actuales sugieren que la *Prevotella* actúa como patobionte iniciador de disbiosis a nivel de la biopelícula que favorece el inicio de la periodontitis (Larsen., 2017).

Gürsoy reporta que durante el embarazo la inflamación gingival aumenta especialmente durante el segundo trimestre, lo cual favorece el incremento de niveles de *P. nigrescens* y *P. intermedia* en la placa subgingival, debido a las concentraciones elevadas de estradiol y progesterona durante el embarazo que alteran la calidad de la microbiota subgingival, favoreciendo el crecimiento de ciertos anaerobios gramnegativos; lo que además, puede causar la activación de defensa sobre expresada del huésped que conduce a la degradación del tejido periodontal a costa de la protección; (Gürsoy., 2012).

Por otra parte, se ha reportado que la especie *Prevotella melaninogenica*, es un microorganismo que coloniza la cavidad oral durante la primera infancia (Haraldsson *et al.*, 2005) se ha encontrado una colonización estable para *P. melaninogenica* hasta la edad de 3 años (Alauzet *et al.*, 2010). La prevalencia de *P. melaninogenica* entre niños concuerda con la presencia de estos microorganismos en la saliva de las madres lo que refleja procesos de transmisión horizontal madre-hijo. Esta especie también ha sido aislada como el principal colonizador de lugares que presentan inflamación en cavidad oral de pacientes adolescentes y adultos (Nadkarni *et al.*, 2015).

Esta especie ha cobrado importancia, debido a que, entre sus factores de virulencia, producen fosfolipasas, que contribuyen a la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana celular (Alauzet *et al.*, 2010), lo cual favorece el desarrollo de procesos infecciosos diseminados de tipo polimicrobianos (Odeh *et al.*, 2000) como abscesos periodontales donde ha sido aislado este microorganismo en un 6.4% después de *Parvimonas micra* (Gomes *et al.*, 1996).

En la enfermedad periodontal; los factores de virulencia de *P. melaninogenica* como hemolisina contribuyen a la progresión de la enfermedad periodontal (Allison & Hillman 1997). Esta bacteria secreta potentes factores de virulencia a través del sistema de secreción tipo 9 (T9SS) también encontrado en bacterias del filo Bacteroidetes como *P. gingivalis* y *T. forsythia*, en donde actúa secretando factores de virulencia como proteasas y proteínas de la superficie celular bacteriana lo que aumenta su patogenicidad (Kondo *et al.*, 2018) (Lasica *et al.*, 2017).

P. melaninogenica ha sido aislada de las muestras que se encuentran asociadas significativamente con características clínicas como mal olor, dolor, inflamación y dolor en la percusión dental. En el estudio de Rajaram *et al.*, 2016 aislaron *P. melaninogenica* del 4% de las muestras de apertura cameral y en el conducto radicular posterior a la preparación biomecánica de estos (Rajaram *et al.*, 2016). El establecimiento de una terapia de manejo a través de la instrumentación mecánica, el drenaje y la erradicación de la fuente de infección son procedimientos fundamentales que se llevan a cabo para controlar con éxito las infecciones polimicrobianas (Islam *et al.*, 2008).

La especie *Prevotella* incluidas *P. melaninogenica* y *P. intermedia*, se han considerado tradicionalmente susceptibles a la penicilina y la amoxicilina. La literatura reporta, un aumento constante de la resistencia a este tipo de antibióticos especialmente por parte de *Prevotella melaninogenica* (Falagas & Siakavellas. 2000); por lo que es importante el monitoreo continuo de la resistencia a antimicrobianos para establecer tratamientos eficientes para las infecciones causadas por estos microorganismos en la cavidad oral; (Arredondo *et al.*,2019).

Prevotella y el género *Capnocytophaga* constituyen la principal fuente de β -lactamasas en la microbiota oral, entre las especies principalmente productoras de β -lactamasas están *Prevotella buccae* y *Prevotella intermedia*, seguidas de *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens* y *Prevotella denticola*. La principal enzima tipo betalactamasa producida por estas especies es *cfxA*, una cefuroximasa con actividad significativa contra cefalosporinas y monobactámicos, en lugar de penicilinas (Dupin *et al.*, 2015).

2.3 Antibióticos de uso en odontología

Los antibióticos se prescriben rutinariamente en la práctica dental para uso profiláctico o terapéutico. Se prescriben antibióticos profilácticos para prevenir enfermedades causadas por la introducción de miembros de la microbiota oral a sitios distantes o a un sitio local en un hospedador en riesgo (Sukhvinder *et al.*, 2015).

En la mayoría de los casos, la profilaxis se usa para prevenir la endocarditis, mientras que los antibióticos terapéuticos se prescriben principalmente para tratar enfermedades de los tejidos duros y blandos de la cavidad oral después de que el tratamiento mecánico local ha fallado (Sukhvinder *et al.*, 2015).

Las infecciones orofaciales se originan a partir de infecciones odontogénicas, por lo que la prescripción de antibióticos por parte de los odontólogos se ha convertido en un aspecto importante de la práctica dental. Por esta razón, los antibióticos representan la gran mayoría de los medicamentos recetados por los odontólogos (Sukhvinder *et al.*, 2015).

Las bacterias que causan infecciones odontogénicas generalmente son saprófitas. La microbiología en este sentido es variada y pueden involucrarse múltiples microorganismos con diferentes características. Los microorganismos anaerobios y aeróbicos están generalmente presentes en la cavidad oral, y numerosas especies aeróbicas causan infecciones odontogénicas. A pesar de la alta incidencia de estas infecciones, no existen criterios uniformes con respecto al uso de antibióticos para tratarlas. Un porcentaje considerable de dolor de origen dental proviene de infecciones agudas y crónicas causada a nivel pulpar, que pueden requerir una intervención quirúrgica, en lugar de antibióticos (Salako *et al.*, 2004).

Las situaciones clínicas que requieren terapia antibiótica en base empírica son limitadas e incluyen infección oral acompañada de temperatura corporal elevada y evidencia de diseminación sistémica, como linfadenopatía y trismo. La celulitis facial, es una enfermedad grave que debe tratarse con prontitud mediante antibióticos debido a la posibilidad de propagación de la infección a través de la linfa y la circulación sanguínea, con el desarrollo de septicemia (Addy *et al.*, 2003).

Las afecciones periodontales inflamatorias crónicas no requieren el uso sistemático de antibióticos; los antimicrobianos sistémicos solo deben usarse en condiciones periodontales agudas donde el drenaje o el desbridamiento son imposibles, cuando existe diseminación local de la infección o cuando se ha producido diseminación sistémica (Addy *et al.*, 2003).

Algunos autores consideran que las penicilinas naturales y semisintéticas (amoxicilina) son las opciones de primera elección, otros prefieren la combinación de amoxicilina y ácido clavulánico debido al aumento de la resistencia a las penicilinas y al bajo nivel de resistencia bacteriana a esta combinación, con una acción de amplio espectro, perfil farmacocinético, tolerancia y características de dosificación (Addy *et al.*, 2003).

Sin embargo, la terapia antibiótica en odontología está dada principalmente por el uso clínico de la amoxicilina, seguido por amoxicilina más ácido clavulánico, clindamicina,

azitromicina y metronidazol o el uso de terapias combinadas como metronidazol con amoxicilina (Arredondo *et al.*, 2019). Siendo la amoxicilina el antibiótico de primera elección para el tratamiento de infecciones dentales. En pacientes alérgicos a la amoxicilina el antibiótico de elección es la clindamicina (Saeed *et al.*, 2010). La constante resistencia antibiótica por parte de *P. melaninogenica* a penicilinas y al necesitar un tratamiento rápido con el fin de evitar la diseminación de estos microorganismos ha conllevado a elegir como fármaco de primera elección el metronidazol o este en combinación con amoxicilina, prescribiendo como alternativa a este la clindamicina (Falagas & Siakavellas. 2000). Azitromicina y metronidazol han sido utilizados en el tratamiento de pericoronitis, absceso periodontal y gingivitis ulcerativa necrozante (GUN) (Sukhvinder *et al.*, 2015)

2.3.1 Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos cuyo nombre proviene de la presencia de un anillo β -lactámico en su estructura (figura 1) que es esencial en su actividad antimicrobiana, actúan en la síntesis de pared celular, estas interfieren en las reacciones de transpeptidación que sellan los enlaces cruzados peptídicos entre las cadenas de glicanos, gracias a que interfieren en la acción de la enzima transpeptidasa que forma estos enlaces cruzados (figura 2). Estos blancos de los β -lactámicos se llaman proteínas de unión a la penicilina (PBP) (Champoux *et al.*, 2005).

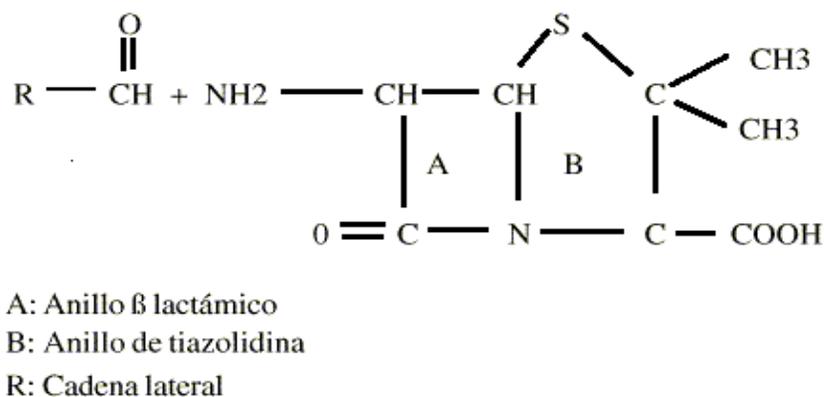
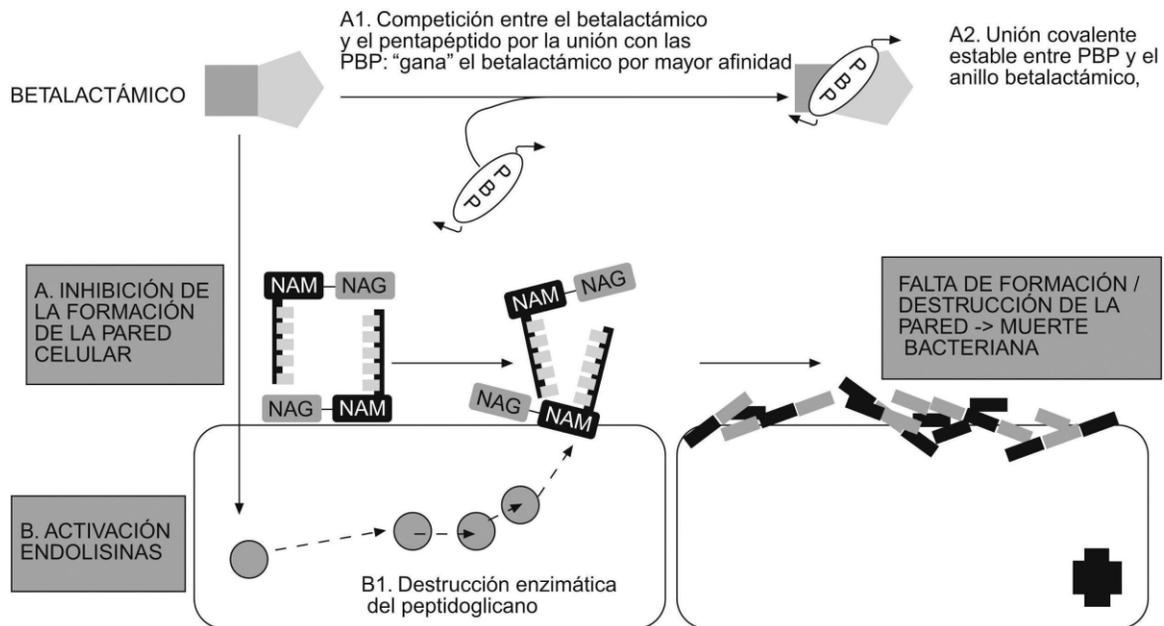


Figura 1. Estructura antibióticos β -lactámicos, se observa el núcleo activo de las penicilinas es el ácido 6-aminopenicilánico, constituido por una estructura β -lactámico-tiazolidínica anillada, la cual se une a una cadena lateral variable (Valdes *et al.*, 1998)

Las β -lactamasas son la principal causa de resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos. La clasificación más utilizada de estas enzimas es la clasificación Ambler que divide las β -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D) en función a la secuencia de aminoácidos (Ambler, 1980, Hall y Barlow, 2005, Öztürk, H., Ozkirimli, E., & Özgür., 2015). Los antibióticos betalactámicos a menudo se prescriben para tratar estas infecciones. Sin embargo, se ha reportado en la literatura que muchas bacterias anaerobias orales han desarrollado resistencia a los antibióticos β -lactámicos debido a la producción de β -lactamasas; esta resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos se ha atribuido a genes de resistencia, presentes en ADN cromosómico o plasmídico que pueden transferirse entre bacterias comensales y patógenas (Ruan *et al*, 2015).



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

Figura 2. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.

El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen a las transpeptidasas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular. Tomado de: Suarez *et al*, 2009.

2.3.2 Tetraciclinas y macrólidos

En cuanto a las tetraciclinas son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, por la unión con la subunidad ribosomal 30S en un punto que bloquea la unión del aminoacil-tRNA con el sitio receptor en el complejo mRNA-ribosoma (Figura 3). Su efecto es reversible; son bacteriostáticos y bactericidas en altas dosis (García, Díaz, & Bruguera, 2003). Las tetraciclinas son agentes con un espectro de actividad que abarca a las especies patógenas más frecuentes, incluidos bacilos y cocos Gram positivos y Gram negativos, aerobios y anaerobios (Champoux *et al.*, 2005).

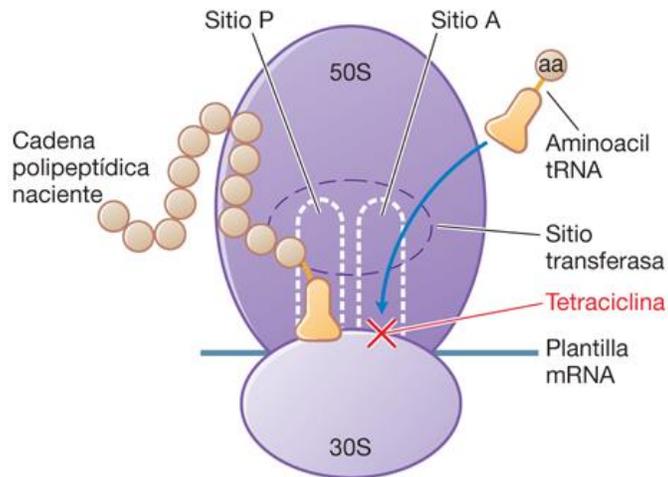


Figura 3. Mecanismo de acción de los antibióticos Tetraciclinas. Las tetraciclinas se unen con la subunidad 30S, bloquean la unión de tRNA con el sitio A y, por tanto, inhiben la síntesis de proteínas (Goodman y Gilman, 2015)

Los macrólidos afectan la síntesis de proteínas en los ribosomas mediante la unión de la subunidad 50S y el bloqueo de la reacción de translocación. Su efecto principal es bacteriostático (Figura 4) (Champoux *et al.*, 2005). Dentro de este tipo de antibióticos se encuentra la eritromicina que tiene un espectro de actividad que incluye a la mayoría de la bacteria de las bacterias patógenas Gram positivas y algunos microorganismos Gram negativos (Champoux *et al.*, 2005).

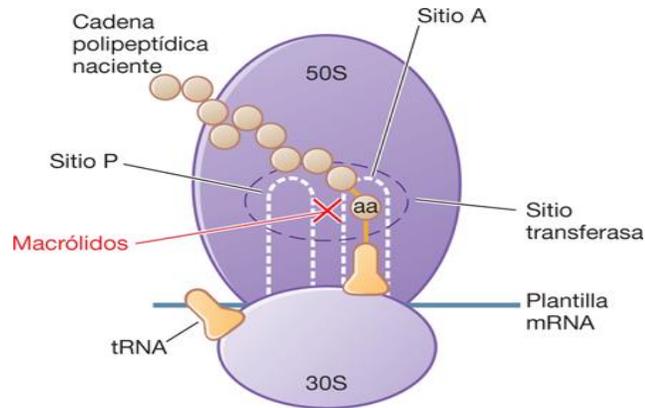


Figura 4. Mecanismo de acción de los antibióticos macrólidos. Los macrólidos se unen a la subunidad 50S y producen el bloqueo de la reacción de translocación (Goodman y Gilman, 2015).

2.3.3 Nitroimidazoles

El metronidazol un antibiótico ampliamente usado forma parte del grupo de los nitroimidazoles, una familia de compuestos con actividad contra bacterias hongos y parásitos. Para lograr su acción antibacteriana requiere reducción del grupo nitro. Los productos de la reducción actúan sobre la célula en múltiples puntos; el más letal de esos efectos es la inducción de rupturas en las cadenas del ADN. El metronidazol tiene actividad contra gran variedad de microorganismos anaerobios. En la clínica es útil para cualquier infección en la que participen agentes anaerobios. Como estas infecciones casi siempre son polimicrobianas, por lo general se agrega un segundo antibiótico (figura 5).

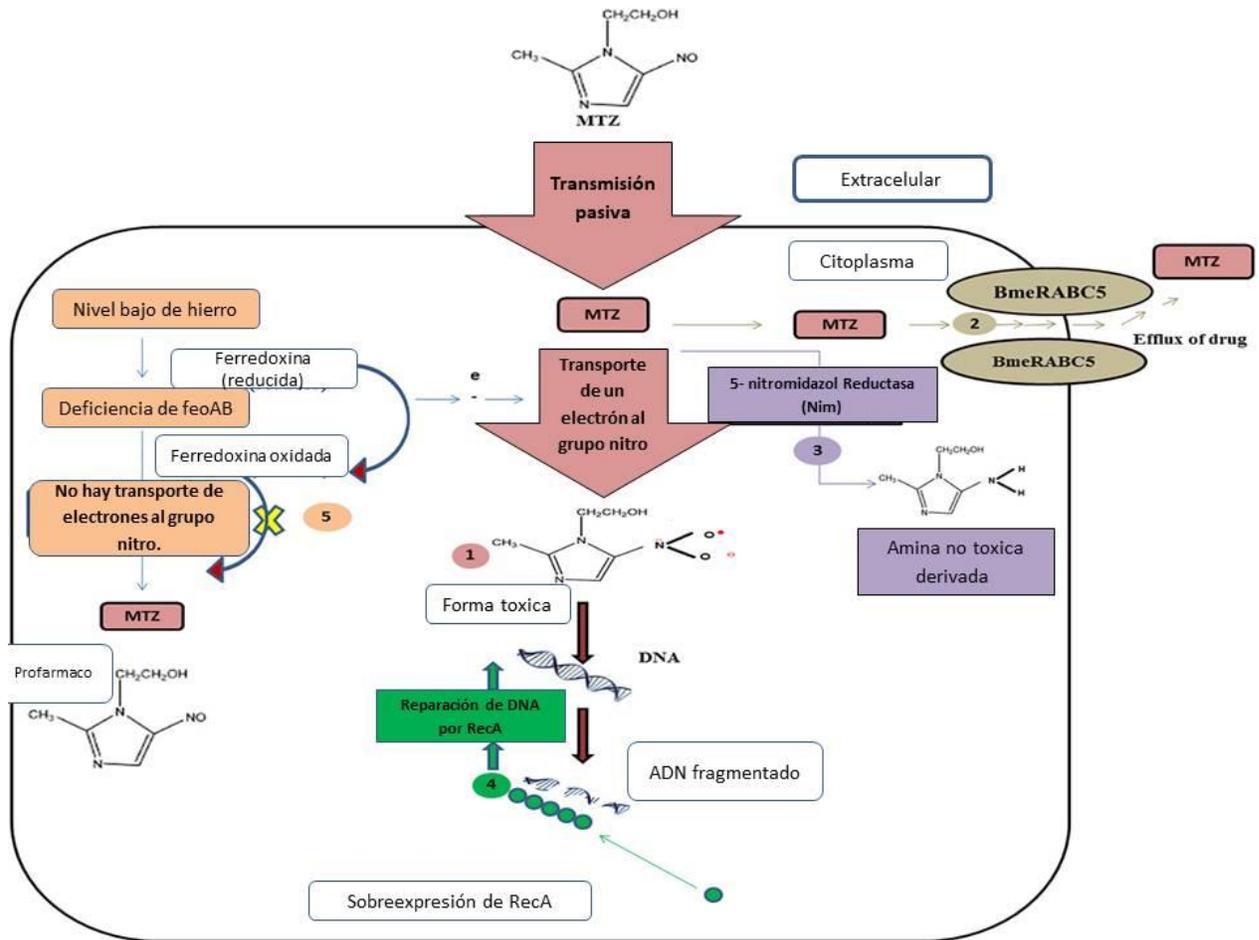


Figura 5. Modificado de Ghotaslou et al, *Infection, Genetics and Evolution* 64 (2018) 156–163. (1) Mecanismo del metronidazol, (2) Eflujo de metronidazol, (3) Resistencia mediada por nim, (4) Sobreexpresión de la proteína RecA, (5) Deficiencia del transportador de hierro ferroso FeoAB.

2.4 Resistencia antibiótica

Para considerar un bacteria susceptible o resistente a cualquier antimicrobiano son necesarias la valoración integral de la actividad antimicrobiana *in vitro* y de sus características farmacológicas, así como la evaluación clínica. Cualquier agente aprobado para uso clínico tuvo que haber demostrado *in vitro* su capacidad para inhibir el crecimiento de algunos grupos blancos de bacterias en concentraciones que puedan alcanzarse con riesgos de toxicidad aceptables, lo que significa que la concentración inhibitoria mínima (CIM) definida como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo, con el cual se puede determinar la

susceptibilidad de este (Andrews, 2001). Se puede rebasar cómodamente con dosis que siguen siendo tolerables para los pacientes (Champoux *et al.*, 2005).

Con respecto a los microorganismos, el uso del término susceptible implica que su CIM está en un nivel alcanzable en la sangre y otros líquidos corporales apropiados con las dosis recomendadas. Por lo contrario, resistente, significa que la CIM no se rebasa con los niveles alcanzables en condiciones normales (Champoux *et al.*, 2005).

Por tanto, la resistencia antibiótica natural o intrínseca es una propiedad específica de las bacterias, su aparición es anterior al uso de los antibióticos y tiene la característica de ser inherente a al microorganismo como la impermeabilidad, bombas de eflujo, inactivación, falta de susceptibilidad de la pared celular o blancos ribosomales (ver Figura.6) (Champoux *et al.*, 2005; Calderón *et al.*, 2016) o aparecer por mutación o adquisición de nuevos genes a través de varios mecanismos como:

- Transducción: transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano, cuando un fago atemperado (genoma del virus que se encuentra inserto en el ADN bacteriano) durante su fase de ensamblaje, encapsula este material. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano se denomina transducción generalizada y si sólo se encapsula parte del genoma bacteriano, pero se conserva el genoma viral se habla de transducción especializada (Cabrera *et al.*, 2007).
- Conjugación: transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra a través de una hebra sexual; estos plásmidos usualmente contienen genes que le confieren resistencia a medicamentos, antisépticos y desinfectantes (Cabrera *et al.*, 2007).
- Transformación: transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma (Cabrera *et al.*, 2007).

- Transposición: movimiento de una sección de ADN (transposón) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular (Cabrera *et al.*, 2007).

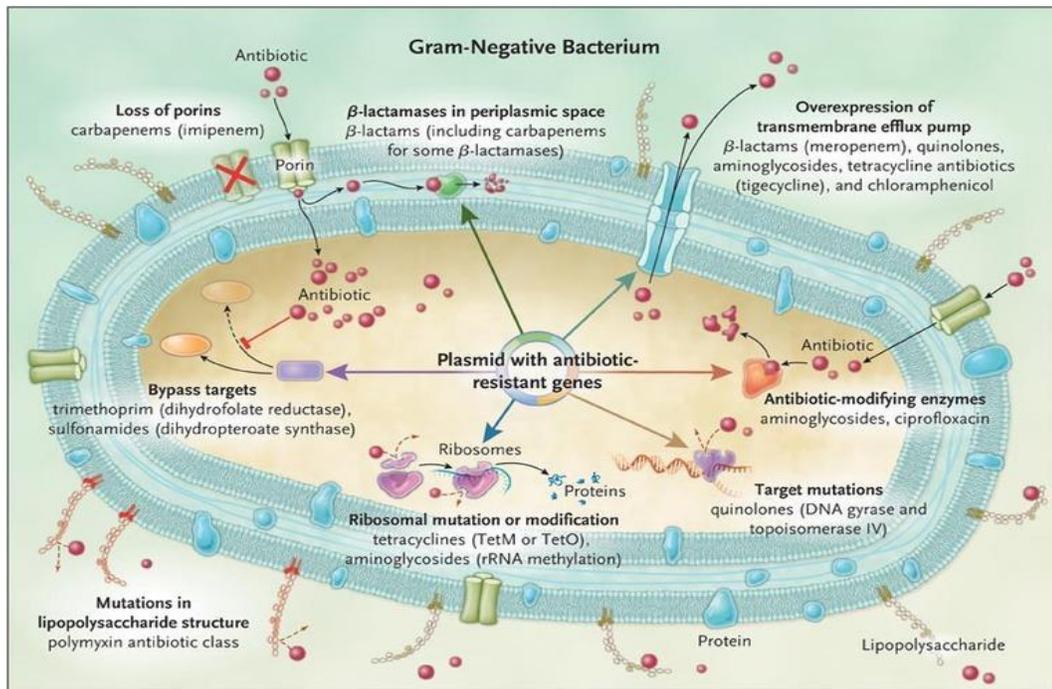


Figura 6: Principales mecanismos de resistencia antibiótica en bacterias Gram negativas (Peleg, A. Y., & Hooper, D. C., 2010)

Algunas especies producen concentraciones bajas de enzimas, en particular las β -lactamasas de las bacterias Gram negativas (Champoux *et al.*, 2005).

Se encuentran también las resistencias adquiridas, las cuales se desarrollan en una especie que al principio era susceptible, esta resistencia puede ser el resultado de una mutación o adquirida por mecanismos de transferencia horizontal de genes mediante algún mecanismo de intercambio genético. La resistencia ocurre cuando se produce la mutación crucial en el blanco del antimicrobiano o en las proteínas relacionados con el acceso al blanco (Champoux *et al.*, 2005).

La transferencia de plásmidos por conjugación fue el primer mecanismo descubierto para adquirir nuevos genes de resistencia; los genes de resistencia en los plásmidos pueden determinar la resistencia a uno o varios antimicrobianos. Después de la conjugación los genes de resistencia pueden permanecer en un plásmido que recupera su forma circular o se integran en el cromosoma por recombinación (Champoux *et al.*, 2005).

Los transposones que contienen genes de resistencia pueden moverse de un plásmido a otro o entre un plásmido y un cromosoma. Muchos de los genes de resistencia transportados en los plásmidos son inserciones de transposón que pueden llevarse junto con el resto del genoma del plásmido a otra cepa a través de conjugación. Una vez ahí el transposón es libre de permanecer en el plásmido original o insertarse en uno nuevo (Champoux *et al.*, 2005).

Otro mecanismos de resistencia, se da a través de transposones por lo que este mecanismo no se puede descartar ya que se transmiten a través de un elemento genético móvil, la aparición y propagación de bacterias productoras de betalactamasas está impulsado por varios mecanismos de transferencia de genes horizontales, mediante la comparación de la secuencia genómica de múltiples bacterias, está claro que la transferencia de genes entre especies, a través de la transferencia génica lateral, se ha producido con más frecuencia (Ruan *et al.*, 2015).

2.5 Mecanismos de resistencia antibiótica en *Prevotella melaninogenica*

Se ha descrito que el género *Prevotella* funciona como un reservorio de una gran cantidad de genes asociados con la generación de resistencia a los antibióticos de elección en la terapia antibiótica odontológica, como son agentes β -lactámicos por la expresión de los genes *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, tetraciclinas por la expresión de *tetM*, *tetQ*, macrólidos por la expresión de *ermF* y el metronidazol por la expresión del gen *nim* (Rocas *et al.*, 2012).

La resistencia a la penicilina en algunas especies orales como *Prevotella melaninogenica*, puede no estar codificada por plásmidos según lo reportado por Könönen *et al.*, 1995 ya que dentro de su estudio obtuvieron plásmidos de algunos aislamientos de

P.melaninogenica, pero no encontraron relación entre estos y la resistencia a la penicilina por lo cual sugieren que como en algunas cepas de *Bacteroides* puede ser codificada esta resistencia dentro del ADN cromosómico. Además, estas cepas pueden ser β -lactamasa-positiva, y otra fracción puede ser β -lactamasa-negativa (Könönen *et al.*, 1997).

2.5.1 Genes de resistencia a antibióticos β - lactámicos

Dentro de los principales genes asociados a codificación de resistencia a los antibióticos β -lactámicos se encuentran *cfxA*, *cfxA2*, *cfxA3*; que codifican para β - lactamasas. Según Madinier *et al.*, 2001, reportan que el gen *cfxA2*, comparte un 98% de identidad con *cfxA*, el gen estructural de una β -lactamasa descrito en *Bacteroides vulgatus* (ver fig.7). El gen *cfxA2* presenta las características de β -lactamasas de grupo A según Ambler. La alineación de secuencia de aminoácidos tiene una sustitución de ácido glutámico reemplazando a una lisina en posición 272 (K272E) (Madinier *et al.*, 2001).

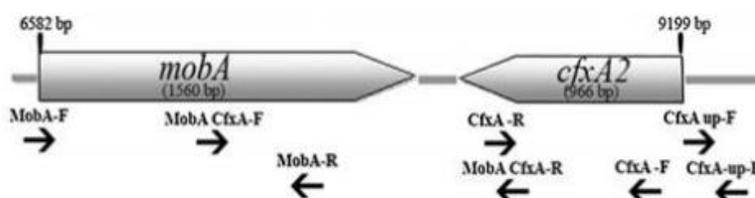


Figura 7. β - lactamasas *cfxA*, *cfxA2* (Fernández *et al.*, 2015).

Así mismo, Binta *et al.*, 2016 reportan que *Prevotella spp* y *Bacteroides spp*, son los géneros bacterianos mayormente productores de β -lactamasas asociadas a la expresión del gen *cfxA* con el 43% y el 75% de prevalencia, respectivamente. La presencia de estos genes en los comensales orales siempre es motivo de preocupación, ya que esta resistencia se puede propagar a patógenos. La transferencia horizontal de genes podría explicar la propagación de secuencias genéticas estrechamente relacionadas entre estas especies periodontales. Aunque el gen *cfxA3* se ha encontrado principalmente

en *Capnocytophaga* spp; también se ha reportado en *Prevotella* y *Bacteroides* spp. Adicionalmente se ha descrito una nueva variante alélica del gen *cfxA* llamada *cfxA6* en *Prevotella* spp nunca antes reportada (Binta, 2016; Fernández *et al.*, 2015).

2.5.1.1 Gen *bla*TEM

Según Livermore, 1995, las β -lactamasas de tipo TEM se encuentran diseminadas en bacterias Gram negativas y pueden atacar varios antibióticos β -lactámicos. La resistencia a antibióticos betalactámicos en bacterias orales, a través de la producción de β -lactamasas, se ha encontrado frecuentemente reportada. El gen de resistencia a antibióticos más prevalente entre los aislamientos endodónticos estudiados fue *bla*TEM, que se encontró con una prevalencia del 17% de las cepas. En este mismo artículo el autor referencia a Jungermann *et al.*, 2011. Quienes reportaron que *bla*TEM en su estudio fue el gen de resistencia a antibióticos más frecuente detectado en el 33% de las muestras de infecciones endodónticas (Rôças y Siqueira, 2012).

2.5.2 Gen *tetQ* y *tetM*

Muchas cepas de *Prevotella* contienen el gen de resistencia a tetraciclina *tetQ*, un gen de protección ribosomal, este es muy similar al gen presente en *Bacteroides* intestinales. Los elementos de transferencia genética principalmente encontrados son transposones, los identificados en *Prevotella* son relativamente pequeños y parecen utilizar una enzima transposasa de la familia IS21. En *Prevotella* para *tetQ* estos elementos pueden ser similares en el mecanismo a los de los *Bacteroides* y utilizar un mecanismo de transferencia de ADN proporcionado por la célula hospedadora. Sin embargo, este mecanismo aún no se ha identificado (Tribble, 2010).

Por otra parte, el gen *TetM* según los reportes actúa desalojando la tetraciclina de su sitio de unión en el ribosoma, al alterar la interacción entre el anillo D aromático de la tetraciclina y la base que la compone (Dönhöfer., *et al* 2012).

2.5.3 Gen *ermF*

El gen *ermF* ha sido detectado en un 13% en *Prevotella spp*, este es el más extendido en anaerobios en transposones conjugativos. Adicionalmente la tasa de resistencia de la clindamicina puede también verse afectada por la prevalencia de expresión de *ermF* (Tran *et al.*, 2013).

Arzese *et al.*, 2000 refiere en su artículo que la resistencia a eritromicina es conferida por elementos ERL, y dentro de su estudio las especies de *Prevotella* que estudió fueron *ermF*-positivos, aunque la expresión de la resistencia a eritromicina no se asoció consistentemente con la detección de este gen (Arzense *et al.*, 2000).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso continuo y/o inadecuado de los antibióticos puede favorecer el desarrollo de resistencia, mediada por la expresión de genes que pueden ser transferidos entre otras especies de bacterias residentes, transitorias y patógenas mediante transferencia horizontal; además estos genes que codifican factores de virulencia facilitan su persistencia y supervivencia en entornos complejos por cooperación bacteriana inter especie (Ruan *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la microbiota de la cavidad oral, sirve como reservorio de una gran cantidad de genes asociados con resistencia a los antibióticos, es así como *Prevotella* spp, ha cobrado gran importancia clínica, pues se ha reportado la presencia de diversos genes como *CfxA*, *CfxA2*, *bla_{TEM} Tet Q*, *TetM* y *ermF*, los cuales codifican para varios mecanismos de la inactivación e interrupción de acción de antibióticos. Entre estos mecanismos más frecuentes, la producción de enzimas capaces de degradar antibióticos de primera elección y relevancia en la terapia antibiótica odontológica, como los agentes β -lactámicos, tetraciclinas y macrólidos (Xie *et al.*, 2014).

Se ha detectado con frecuencia *Prevotella* spp en placa dental de pacientes con enfermedades periodontales, donde se comportan como patobiontes que alteran el microambiente local y cooperan de manera sinérgica con bacterias periodontopatógenas causantes de enfermedad (Socransky *et al.*, 1998) así mismo se han descrito altas tasas de resistencia antibiótica en este género y un gran número de fracasos en la terapia antibiótica convencional (Socransky *et al.*, 1998).

P. melaninogenica es un microorganismo que coloniza la cavidad oral durante la primera infancia (Haraldsson *et al.*, 2005). Es parte de la microbiota oral normal, sin embargo, asociada con otros microorganismos en la placa dental puede llegar a favorecer en inicio y ayudar a la progresión de la enfermedad periodontal e infecciones diseminadas que surgen en la cavidad oral, ha sido reportada como una especie predominante detectada en abscesos periodontales (He *et al.*, 2012). Sin embargo, hay poca evidencia científica y existe un vacío

en el conocimiento sobre el entorno genético y la presencia de genes de resistencia antibiótica en esta especie, que pudiera contribuir a la patogenicidad del microorganismo.

En odontología, los antibióticos más utilizados son los β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, metronidazol, clindamicina. La terapia antibiótica de elección en odontología son los antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, se ha reportado resistencia a esta familia de antibióticos en especies de *Prevotella* que provienen de infecciones orales (Ashimoto *et al.*, 1996); es importante resaltar que existe muy poca investigación relacionada con resistencia antibiótica en microorganismos de la cavidad oral, literatura disponible no es actual y presenta ciertas limitaciones, dejando de lado la posibilidad de detectar la presencia de dichos genes de resistencia en aislamientos orales de individuos incluso oralmente sanos.

La carencia de reportes de literatura científica puede ser un indicio del escaso seguimiento de las tasas de resistencia antibiótica en microorganismos de la cavidad oral, esta ausencia es posible observarla a nivel mundial como también en países de nuestro continente, incluyendo Colombia, situación que es preocupante teniendo en cuenta que no existen normas actuales de vigilancia antibiótica en bacterias de cavidad oral vigentes y la venta laxa de antibióticos es cada vez más frecuente, por otra parte, en el mundo la importancia del manejo farmacológico en el tratamiento de infecciones en el campo odontológico es también preocupante y el creciente aumento en el consumo excesivo e indebido de antibióticos reportado en poblaciones de diferentes países del mundo también ha incrementado (Ioannidis *et al.*, 2009).

Por lo anterior es fundamental conocer la prevalencia de los principales genes de resistencia circulantes en aislamientos de *P. melaninogenica* presentes en nuestra población y que contribuyen al fracaso terapéutico de los antibióticos de elección en la terapia empírica. En Colombia actualmente, no existe un seguimiento ni vigilancia de la resistencia antibiótica en bacterias orales. La evidencia actual, aunque existe es poca. Sin embargo, los reportes registrados permitan abrir un panorama de la realidad nacional y magnitud del problema que causa la resistencia antibiótica a nivel de salud oral.

4. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento acerca de la resistencia de bacterias orales a los antibióticos es limitado. Microorganismos como *Prevotella* spp, cobran importancia por su habilidad para funcionar como reservorio de genes de resistencia antibiótica y capacidad para transferir material genético entre organismos que co-existen en el entorno oral (Tribble *et al.*, 2010).

Se ha reportado la frecuente presencia de genes que confieren a este género la resistencia hacia las principales familias de antibióticos, comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones odontológicas, como lo son los β -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos y metronidazol (Ioannidis *et al.*, 2009). En Colombia, según Veloo *et al.*, 2012 confirman que en *Prevotella melaninogenica*, frecuentemente se detectan altas tasas de resistencia a antibióticos como clindamicina (22%) (Veloo *et al.*, 2012).

El desconocimiento en la apropiada prescripción antibiótica y la falta de soporte en la evidencia científica frecuentemente conduce a la prescripción antibiótica empírica sin considerar factores importantes como la dosis adecuada, espectro específico y especificidad de acuerdo al proceso infeccioso y el agente etiológico para un correcto tratamiento. La constante e improvisada exposición de la bacteria al muy probable equivocado antibiótico lleva a que exista una permanente presión selectiva en el genoma bacteriano favoreciendo la activación transcripcional de genes y/o adquisición de nuevos genes adaptados al entorno infeccioso.

En Colombia, existe poca evidencia y no se realiza seguimiento ni vigilancia del perfil de resistencia de microorganismos orales. En estudios previos realizados en el instituto UIBO, se ha reportado el perfil susceptibilidad antimicrobiana en algunas bacterias orales. (Echeverri *et al.*, 2000; Jaramillo *et al.* 2008). Sin embargo, no existen estudios actuales y poco se conoce sobre la prevalencia de genes asociados a resistencia antibiótica en aislamientos de *P. melaninogenica*.

Los microorganismos de la cavidad oral incluyendo *P. melaninogenica*, cada vez cobran mayor interés clínico debido a su frecuente reporte en el mundo sobre la presencia de genes de resistencia antibiótica, lo cual es preocupante por la importancia de la terapia farmacológica complementaria al tratamiento odontológico (Brook *et al.*, 2013; Iwahara *et al.*, 2006). Por lo anterior conocer la frecuencia de genes asociados a resistencia en aislamientos orales de *P. melaninogenica* ampliamente detectada en procesos infecciosos polimicrobianos diseminados permitirá a futuro desarrollar e implementar guías de manejo antimicrobiano que contribuyan a la apropiada prescripción antibiótica.

5.SITUACIÓN ACTUAL EN EL ÁREA DE INVESTIGACIÓN

En la cavidad oral se pueden encontrar gran diversidad de especies bacterianas, un desequilibrio de esta microbiota y alguna falla en la respuesta inmunológica del hospedador, permite que estos microorganismos sean responsables de infecciones locales o enfermedades sistémicas. El tratamiento de estas infecciones generalmente se hace con las principales familias de antibióticos. por lo que es importante resaltar que el uso continuo o no adecuado de estos fármacos puede favorecer el desarrollo de resistencia, a partir de genes, que generalmente se encuentran en transposones, que se diseminan mediante la transferencia horizontal (Ruan, 2015).

Prevotella melaninogenica en asociación con otros microorganismos puede llegar a causar enfermedad periodontal e infecciones diseminadas que surgen en la cavidad oral, ha sido reportada como una especie predominante detectada en abscesos periodontales de pacientes (He *et al.*, 2012). Sin embargo, no se evidencia literatura suficiente que brinde información sobre este microorganismo.

La resistencia antibiótica reportada en *Prevotella* spp, ha direccionado el enfoque a estudios que evalúan los genes que confieren resistencia a antibióticos de uso cada vez más frecuentes y fundamentales en interacciones orales como el metronidazol, tetraciclina o eritromicina, antibióticos de gran importancia en el tratamiento farmacológico en la terapia periodontal. En estos microorganismos se ha venido reportando presencia de genes de resistencia, capaces de generar la inactivación del antimicrobiano tales como *Tet Q* y *Tet M*, entre otros (Ioannidis *et al.*, 2009). Algunos genes de resistencia antibiótica en *Prevotella* spp, se han evaluado hasta el momento principalmente contra antibióticos β -lactámicos, tal vez por su uso como antibióticos de primera línea en el tratamiento de infecciones orales, aumentando de esta manera la posibilidad de generar mecanismos de resistencia a este antibiótico especialmente por la presencia de genes, *cfxA*, *cfxA2* y *bla_{TEM}* (Iwahara *et al.*, 2006).

En Japón Xie *et al.*, 2014 evaluaron los genes asociados con resistencia antibiótica a macrólidos en microorganismos anaerobios aislados de abscesos periodontales. La

roxitromicina fue el antibiótico macrólido evaluado detectando (31,7%) de la resistencia en las bacterias analizadas. De estas bacterias, en el género *Prevotella* spp. se reportó el gen *ermF* en un (68%) (Xie *et al.*, 2014).

El estudio realizado en Colombia de Ardila *et al.*, 2010 se evaluó la susceptibilidad antibiótica de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* y *P. melaninogenica* a antibióticos como amoxicilina, clindamicina y metronidazol, en donde se observaron altos niveles de susceptibilidad antibiótica de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* a amoxicilina y metronidazol, como también se observó una alta frecuencia en la resistencia a clindamicina en *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* y *F. nucleatum* (Ardila *et al.*, 2010).

Actualmente se han venido realizando reportes sobre del aumento de resistencia antibiótica, dependientes de las políticas de venta de los antibióticos. En América del sur, existe muy poco reportado acerca de los perfiles de susceptibilidad, microorganismos y genes de mayor distribución en la población suramericana (Briceño *et al.*, 2009).

Colombia, no existe un seguimiento ni vigilancia, situación que es preocupante teniendo en cuenta las características de consumo de antibióticos de nuestra población, además de la importancia del manejo farmacológico en el tratamiento de infecciones en el campo odontológico y el creciente aumento en el consumo excesivo de antibióticos ha dado lugar al acrecentamiento de la resistencia antibiótica en bacterias orales. Además, no existen reportes registrados que permitan conocer la realidad nacional y magnitud del problema que causa la resistencia antibiótica a nivel de Salud Oral.

Lo anterior muestra un vacío importante en la investigación relacionada con la resistencia antibiótica de bacterias orales, que pudieran estar funcionando como reservorio y mecanismo de transmisión de genes de resistencia antibiótica y por tanto fracaso de la terapia antibiótica en procesos infecciosos de origen odontogénico.

6. OBJETIVOS

6.1 *Objetivo general*

Determinar la prevalencia de los genes de resistencia antibiótica *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* en aislamientos clínicos orales de *Prevotella melaninogenica*.

6.2 *Objetivos específicos*

- Determinar la frecuencia de *Prevotella melaninogenica* en aislamientos clínicos orales de *Prevotella spp.*
- Asociar factores clínicos (diagnóstico periodontal), sistémicos y fisiológicos (embarazo, artritis reumatoide), edad (infancia, adolescencia y adulto) con la presencia de *Prevotella melaninogenica*.
- Identificar los genes de resistencia antibiótica *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* en aislamientos de *Prevotella melaninogenica*.
- Asociar factores clínicos (diagnóstico periodontal), sistémicos y fisiológicos (embarazo, artritis reumatoide), edad (infancia, adolescencia y adulto) con los genes de resistencia antibiótica *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* en aislamientos de *Prevotella melaninogenica*.

7 METODOLOGÍA DEL PROYECTO

7.1 Tipo de estudio

Estudio observacional descriptivo *in vitro*

7.2 Población y muestra

7.2.1 Aislamientos clínicos orales de *Prevotella* spp identificados de pacientes de las clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque y recolectadas que asistieron entre en el periodo de 2005 a 2016 y de los cuales se cuanta con un banco de ADN previamente extraído y conservado a -20°C en el Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto-UIBO, fueron empleado para la identificación de *Prevotella melaninogenica* y los genes de resistencia *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF*.

7.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información

Basados en la secuencia del gen 16S rRNA de *Prevotella melaninogenica*, se diseñaron en este estudio los primers para la estandarización de la PCR e identificación de la especie *P. melaninogenica*.

7.3.1 PCR convencional para identificación de *P. melaninogenica*

La identificación de *Prevotella melaninogenica* se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contiene buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0a 25°C), 1.5 mM MgCl₂ y 0.1% de Triton® X-100), 0.125U de Taq DNA polimerasa (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 0.1mM de cada desoxirribonucleótido y 0.6µM de cada Primer.

Los ciclos de temperatura se llevaron a cabo en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad) iniciando con un ciclo a 95°C durante 5 minutos, luego 35 ciclos de: 95°C por 1 min, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y un ciclo final de 72°C durante 5

minutos. Como control positivo se empleó ADN de la cepa de referencia de *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845 y como control negativo agua grado molecular estéril.

Los productos se separaron electroforéticamente y el gel de agarosa al 1.5% se tiñó con bromuro de Etidio a una concentración de al 0,5 µg/mL y se visualizó en un documentador GelDoc (BioRad). Las secuencias de primer para la amplificación de *Prevotella melaninogenica* se reportan en la tabla 1.

Los aislamientos identificados como *P. melaninogenica*, se utilizaron para identificar los genes de resistencia *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* por medio de PCR convencional.

7.3.2 Detección del gen de resistencia *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF*

Para la identificación de los genes de resistencia por PCR, se emplearon los primer reportados en tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de primers y condiciones de amplificación utilizados para los genes *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF*.

Gen	Secuencia de Primers	Longitud en pb	Autor
<i>P. mel</i>	F: 5- TACAATGGAGAGTTTGATCC- 3' R: 5'- CGATCCTTGCGGTCACGGAC-3'	1453	Diseñado en este estudio
<i>cfxA</i>	F: 5- GCAAGTGCAGTTTAAGATT- 3' R: 5'- GCTTTAGTTTGCATTTTCATC-3'	934Pb	Fosse <i>et al.</i> 2002
<i>cfxA2</i>	F: 5- CAAAGYGACAAYAATGCCTGCG - 3' R: 5'-TSACGAAGRCGGCWAT -3'	426Pb	Fosse <i>et al.</i> 2002
<i>bla_{TEM}</i>	F: 5-ATGAGTATTCAACATTTCCG - 3' R: 5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGG-3'	858Pb	Ioannidis <i>et al.</i> 2009
<i>tetM</i>	F: 5-GACACGCCAAGGACATATGG - 3' R: 5'-TGCTTTCCTCTTGTTCGAG -3'	397Pb	Lacroix <i>et al.</i> 1995
<i>tetQ</i>	F: 5-GGCTTCTACGACATCTATTA - 3' R: 5'-CATCAACATTTATCTCTCTG -3'	755Pb	Lacroix <i>et al.</i> 1996
<i>ermF</i>	F: 5- TTTCGGGTCAGCACTTTACTA- 3' R: 5'-ACTTTCAGGACCTACCTCATA-3'	476Pb	Reig <i>et al.</i> 2000

Modificado de: Acevedo T, Hernández A. Detección de genes de resistencia antibiótica *CfxA*, *CfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM* y *tetQ* en aislamientos orales de *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* [Tesis pregrado]. Bogotá: Universidad El Bosque; 2017.

La detección del gen *cfxA* fue realizada como lo describe Fosse *et al.*2002 con modificaciones. La reacción se llevó cabo en una mezcla de reacción que contiene buffer de PCR 1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), MgCl₂ 1.5 mM 0.1% de Triton® X-100, 0,125 UI de Taq DNA polimerasa (Promega), dNTPs 2,5 mM y primer 0,5µM. Los ciclos de temperatura se realizaron en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad) incluyendo un paso inicial de 95°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y un paso final de 72°C durante 5 minutos. Se empleó como control positivo de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y un control negativo agua grado molecular estéril. Los productos de la PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1,5% y su visualización se hizo mediante tinción con bromuro de etidio con una concentración de 0,5 µg/mL para ser posteriormente leído en un fotodocumentador GelDoc de Bio-Rad, esperando un producto de amplificación de 934pb para *cfxA*.

Para la detección del gen *cfxA2*, se siguió el protocolo descrito por Fosse *et al.*2002 con modificaciones, la reacción se llevó cabo en una mezcla que contiene buffer de PCR 1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), MgCl₂ 1.8 mM 0.1% de Triton® X-100, 0,125 UI de Taq DNA polimerasa (Promega), dNTPs 2,5 mM y primer 0,5µM. Los ciclos de temperatura se realizaron en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad) incluyendo un paso inicial de 95°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y un paso final de 72°C durante 5 minutos. Se empleó como control positivo *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y control negativo agua grado molecular. Los productos de la PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1,5% y su visualización se hizo mediante tinción con bromuro de etidio a una concentración de al 0,5 µg/mL para ser posteriormente leído en un fotodocumentador GelDoc de Bio-Rad, el producto esperado fue de 426pb.

La detección del gen *bla_{TEM}* fue realizada siguiendo el protocolo descrito por Ioannidis *et al.* 2009 con modificaciones. La reacción se llevó cabo en una mezcla que contiene buffer de PCR 1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), MgCl₂ 1.5 mM 0.1% de Triton® X-100, 0,125 UI de Taq DNA polimerasa (Promega), dNTPs 0,2 mM y Primer 0,5µM. Los ciclos de temperatura fueron llevados a cabo en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-

Rad) incluyendo un paso inicial de 95°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de: 90°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos y un paso final de 72°C durante 10 minutos. Se empleó como control positivo ADN de *E. coli* ATCC 25922 y control negativo agua grado molecular. Los productos de la PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1,5% y visualizó mediante tinción con bromuro de etidio a una concentración de al 0,5 µg/mL para ser leído en un fotodocumentador GELDoc de Bio-Rad. El producto de amplificación esperado fue de 858pb.

La detección del gen *tetQ* se desarrolló como lo describe Lacroix *et al.* 1995 con modificaciones. La reacción se llevó a cabo en una mezcla que contiene buffer de PCR 1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), MgCl₂ 3,0 mM 0.1% de Triton® X-100, 0,125 UI de Taq DNA polimerasa (Promega), dNTPs 1,0 mM y Primer para una concentración final de 1,17µM. Los ciclos de temperatura se llevaron a cabo en un termociclador (MyCycler™ Termal Cyler, Bio-Rad) incluyendo un paso inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos y un paso final de 72°C durante 40 segundos. Se utilizó como control positivo la cepa de referencia de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285y como control negativo agua grado molecular. Los productos de la PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1,5% y visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio a una concentración de al 0,5 µg/mL para ser leído en un fotodocumentador GELDoc de Bio-Rad. El producto esperado fue de 755pb.

La detección del gen *tetM* se desarrolló como lo describe Lacroix *et al.* 1995 con modificaciones., . La reacción se llevó a cabo en una mezcla que contiene buffer de PCR 1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), MgCl₂ 1.5 mM 0.1% de Triton® X-100, 0,2 UI de Taq DNA polimerasa (Promega), dNTPs 0,25 mM y primer 0,5µM. Los ciclos de temperatura se llevaron a cabo en un termociclador (MyCycler™ Termal Cyler, Bio-Rad) incluyendo un paso inicial de 94°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y un paso final de 72°C durante 5 minutos. La cepa de referencia de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285y como control negativo agua grado molecular (Acevedo & Hernandez, 2017). Los productos de la PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1,5% y visualizaron mediante tinción con

bromuro de etidio a una concentración de al 0,5 µg/mL para ser leído en un fotodocumentador GELDoc de Bio-Rad. EL producto esperado fue de 397pb.

La detección del gen *ermF* se realizó como lo describe Reig *et al.* 2000 con modificaciones. La reacción se realizó en una mezcla que contiene buffer de PCR 1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), MgCl₂ 2 mM 0.1% de Triton® X-100, 0,2 UI de Taq DNA polimerasa (Promega), dNTPs 1,25 mM y primer 1,0µM. Los ciclos de temperatura se llevaron a cabo en un termociclador (MyCycler, Termal Cycler, Bio-Rad) realizando un paso inicial de 95°C durante 1 minuto, seguido de 95°C durante 30 segundos, 52°C por 30, 72°C por 30 segundos con 35 repeticiones de este ciclo y un paso final a 72°C por 5 minutos. Como control positivo se empleó DNA de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 para *ermF* y como control negativo agua grado molecular estéril. Los productos de la PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio a una concentración de al 0,5 µg/mL leído en un fotodocumentador GELDoc de Bio-Rad. El producto de amplificación esperado fue de 476pb.

7.4 Plan de tabulación y análisis.

Se realizó una estadística descriptiva donde se establecieron frecuencias absolutas y relativas de la especie *Prevotella melaninogenica* con respecto a la muestra total. Se realiza un análisis por Chi-cuadrado para establecer asociaciones entre *Prevotella melaninogenica* y factores clínicos (diagnóstico periodontal), sistémicos y fisiológicos (embarazo, artritis reumatoide), edad (infancia, adolescencia y adulto). Se establecen las frecuencias absolutas y relativas de los genes de resistencia de *Prevotella melaninogenica* y se establecen asociaciones con factores clínicos, sistémicos y fisiológicos y edad. Para confirmar asociaciones se realizan modelos de regresión logística para *Prevotella melaninogenica* y para genes de resistencia como variables dependientes. Se utiliza el paquete estadístico STATA versión 11 para Windows, todos los análisis se hacen con un nivel de significancia del 5%.

8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto de investigación no realiza experimentación en humanos, animales ni organismos genéticamente modificados. Se acoge a las disposiciones vigentes para investigación básica *in vitro*. Esta investigación es una experimentación en el laboratorio y se utilizarán aislamientos clínicos de *Prevotella* spp almacenadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del instituto UIBO (Unidad de investigación Básica Oral) conservados a - 80°C en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) con 10% de glicerol. Las bacterias utilizadas son consideradas recurso genético que no requiere de comité de ética si no de la licencia ambiental otorgada por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA), la cual está siendo gestionada por la Universidad El Bosque. Las bacterias que se usarán en este estudio representan un riesgo menor al mínimo para la salud humana. Todos los experimentos serán realizados siguiendo las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, resolución No 008430 de 1993 del ministerio de salud.

9. RESULTADOS

Frecuencia de *P. melaninogenica* en aislamientos clínicos orales

A partir de 341 aislamientos orales de *Prevotella* spp almacenados en cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO se realizó la identificación de *P. melaninogenica* por PCR convencional, donde se obtuvieron 42 aislamientos confirmados para esta especie, los 299 aislamientos restantes se consideraron *Prevotella* spp. La tabla 3 presenta la frecuencia de *P. melaninogenica* en los aislamientos orales de *Prevotella* spp.

Tabla 2. Frecuencia de *P. melaninogenica* en los aislamientos orales de *Prevotella* spp.

Bacteria	Frecuencia (%)
<i>P. melaninogenica</i>	42 (12.3)
<i>Prevotella</i> spp.	299 (87.6)
Total de aislamientos	341 (100)

La figura 8 corresponde a una de las electroforesis realizadas para la identificación de *P. melaninogenica* en donde se observan la mayoría de resultados positivos.

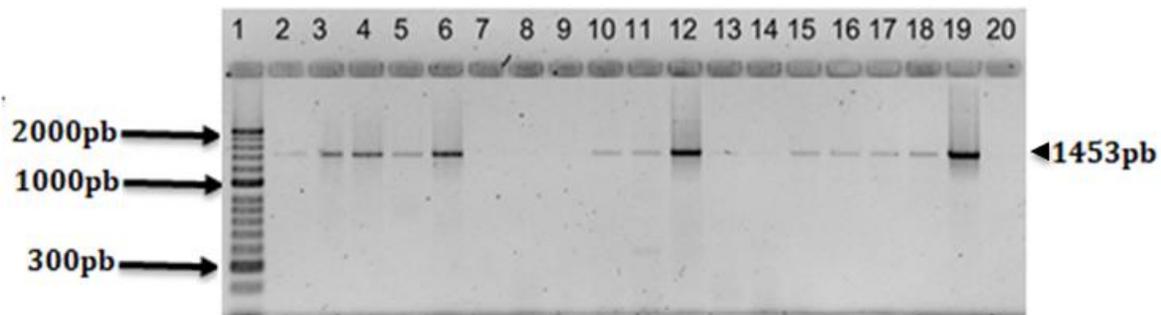


Figura8. Electroforesis de productos de PCR para identificación de *P. melaninogenica*. Carril 1 marcador de peso molecular (Hyperladder 50pb); carril 2,3,4,5,6,10,11,12,14,15,16,17,18: muestras positivas para *P. melaninogenica*; carril 7,8,9,13: muestras negativas para *P. melaninogenica*; carril 19: control positivo (*P. melaninogenica* ATCC 25845); carril 20 : control negativo.

Frecuencia de genes de resistencia detectados en aislamientos de *P. melaninogenica*

Posterior a la identificación de *P. melaninogenica*, se realizó la identificación para los 42 aislamientos de los genes de resistencia *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF*. Donde se observó mayor frecuencia del gen *tetQ* en un 26,1% seguido de los genes *bla_{TEM}* y *tetM* los cuales presentaron una frecuencia de 21,4%. Los genes *cfxA* y *ermF* se encontraron en una menor frecuencia de 14.3 % y 11,9% respectivamente.

Tabla 3 Frecuencia de los genes *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* en aislamientos de *P.melaninogenica*.

Bacteria	<i>n</i>	<i>cfxA</i> F(%)	<i>cfxA2</i> F(%)	<i>bla_{TEM}</i> F(%)	<i>tetM</i> F(%)	<i>tetQ</i> F(%)	<i>ErmF</i> F(%)
<i>P. melaninogenica</i>	42	6 (14.3)	P	9 (21.4)	9(21.4)	11(26.1)	5 (11.9)

Con respecto a la asociación entre genes de resistencia con tipo de muestra (Placa, hisopado y saliva), Condición periodontal y condición sistémica. El análisis se realizó mediante la prueba de Chi cuadrado/ exacta de Fisher siendo un resultado significativo < 0.05.

En cuanto a los análisis de asociaciones entre cada uno de los genes estudiados, el tipo de muestra, la condición periodontal y sistémica de los pacientes se observó una diferencia significativa (p= 0.039) para el gen *ermF* en las muestras de hisopado analizadas, como se puede observar en la tabla 4.

Tabla 4 Asociación entre genes de resistencia con tipo de muestra (Placa bacteriana, hisopado y saliva).

Gen	n	Tipo de muestra			p
		Placa bacteriana F (%)	Hisopado F (%)	Saliva F (%)	
<i>cfxA</i>	6	1 (16.6)	1 (16.6)	4 (66.6)	0.987
<i>cfxA2</i>	8	2 (25.0)	3 (37.5)	3 (37.5)	0.149
<i>bla_{TEM}</i>	9	0 (0.0)	1 (11.1)	8 (88.8)	0.186
<i>ermF</i>	5	0 (0.0)	3 (60.0)	2 (40.0)	0.039*
<i>tetQ</i>	11	1 (9.0)	2 (18.1)	8 (72.7)	0.710
<i>tetM</i>	9	1 (11.1)	3 (33.3)	5 (55.5)	0.455

Prueba de Chi cuadrado/ exacta de Fisher

Significativo $p^* < 0.05$

No se encontró diferencia significativa en los genes analizados de acuerdo al diagnóstico periodontal que presentaban los pacientes, como se puede observar en la tabla 5.

Tabla 5. Asociación entre genes de resistencia y condición periodontal.

Gen	n	Diagnóstico periodontal			p
		Sano F (%)	Gingivitis F (%)	Periodontitis F(%)	
<i>cfxA</i>	6	5(83.3)	1 (16.6)	0 (0)	0.700
<i>cfxA2</i>	8	6(75.0)	2 (25.0)	0 (0)	0.214
<i>bla_{TEM}</i>	9	7(77.7)	2 (22.2)	0 (0)	0.277
<i>ermF</i>	5	4(80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	0.623
<i>tetQ</i>	11	10 (90.1)	1(9.0)	0 (0.0)	0.684
<i>tetM</i>	9	8 (88.8)	1 (11.1)	0 (0.0)	0.745

Prueba de Chi cuadrado/ exacta de Fisher

Significativo $p^* < 0.05$

No se observaron diferencias significativas en la asociación realizada para cada uno de los genes estudiados respecto a la condición sistémica que presentaban los pacientes.

Tabla 6. Asociación entre genes de resistencia con Condición sistémica.

Gen	n	Condición sistémica				p
		Sin condición F (%)	LPH F (%)	Artritis F(%)	Gestante F (%)	
<i>cfxA</i>	8	6(75.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (12.5)	0.421
<i>cfxA2</i>	8	6(75.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (12.5)	0.421
<i>bla_{TEM}</i>	9	5(55.5)	0 (0.0)	2 (22.2)	2 (22.2)	0.109
<i>ermF</i>	5	4(80.0)	0 (0.0)	0(0.0)	1(20.0)	0.277
<i>tetQ</i>	11	5 (45.4)	4 (36.3)	1 (9.0)	1 (9.0)	0.348
<i>tetM</i>	9	4 (44.4)	3 (33.3)	2 (22.2)	0 (0.0)	0.461

Prueba de Chi cuadrado/ exacta de Fisher: Significativo $p^* < 0.05$

LPH: Labio y paladar fisurado

10. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la prevalencia de los genes de resistencia antibiótica *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *ermF*, *tet M* y *tet Q*, en aislamientos clínicos orales de *Prevotella melaninogenica* y la asociación de este microorganismo con factores clínicos orales y sistémicos, como la periodontitis a nivel local y artritis reumatoide, el embarazo y la edad nivel sistémico. Lo que es importante, al momento de establecer una terapia antibiótica eficaz, en el tratamiento de infecciones de origen oral

Según estudios realizados sobre la presencia *P. melaninogenica* en cavidad oral, este microorganismo ha sido aislado en un 21,4 % (Boyanova *et al.*, 2010) siendo similar este reporte con los resultados encontrados dentro del estudio, donde se aisló con una frecuencia de 12,3% respecto a los 341 aislamientos evaluados de *Prevotella spp.* Aunque se considera como un microorganismo perteneciente a la microbiota oral normal, ha sido frecuentemente aislada en infecciones de cavidad oral como enfermedades periodontales, abscesos odontogénicos, infecciones orofaciales (Ruan *et al.*, 2015). Llegando a ser capaz de causar infecciones diseminadas (He *et al.*, 2012).

P. melaninogenica es uno de los microorganismos de cavidad oral, que ha sido aislada en un 15-21, 54-69 y 75% de los bebés de 2 meses, 6 meses y 1 año, respectivamente, a partir de los 3 años de edad existe una colonización estable por parte de este microorganismo (Alauzet *et al.*, 2010). Sin embargo, dentro de las muestras estudiadas se contó con un grupo de edad de 4 a 9 años donde se observó una frecuencia de 16,6% de esta especie, lo que permite establecer que si existe una predilección por parte de este microorganismo durante la infancia.

Los adolescentes constituyen una parte importante de la muestra sin embargo sobre el grupo de edad de 10 a 19 años no existe suficiente literatura sobre la presencia de *Prevotella melaninogenica*, en este grupo se encontró una frecuencia de 35,7% siendo similar el resultado obtenido en el grupo de muestras de las edades comprendidas entre los 20 años y 68 años, Según Alauzet *et al.*, 2010 era una de las especies más prevalentes en sujetos sanos de edad avanzada.

Kornman *et al.*, 2011 describe que *p. melaninogenica* fue el único microorganismo cuyas proporciones aumentaron significativamente durante el embarazo; en el pico del sangrado

gingival, las proporciones de este organismo fueron cinco veces mayores que los niveles iniciales. El aumento durante el embarazo en *P. melaninogenica* parece estar asociado con elevaciones en los niveles sistémicos de estradiol y progesterona, debido a que este microorganismo puede sustituir el estradiol y la progesterona como su factor de crecimiento esencial en lugar de vitamina K; lo que puede casar una alteración en la respuesta inmune del huésped;(Kornman., *et al*, 2011). Además, se ha descrito en la literatura que esta especie bacteriana funciona como un reservorio de una gran cantidad de genes asociados con la generación de resistencia a los antibióticos de elección en la terapia antibiótica odontológica; (Rocas *et al*, 2012).

En cuanto a los genes de resistencia en las muestras estudiadas se observó un 64,2% de presencia de al menos uno de los genes estudiados, por lo que se encuentra similitud con la literatura reportada donde se afirma que en *Prevotella* spp, es frecuente la detección de genes de resistencia relacionados con fracaso de la terapia antibiótica de primera elección en odontología (Rocas *et al.*, 2013).

En los últimos años, se ha informado un aumento constante de la resistencia a penicilinas especialmente por parte de *P. melaninogenica* (Falagas & Siakavellas. 2000). Binta *et al.*, 2016 reportan que *Prevotella* spp es uno de los géneros bacterianos mayormente productores de β -lactamasas asociadas a la expresión del gen *cfxA* con el 43% de frecuencia (Binta *et al.*, 2016). *cfxA* fué hallado en un 14,3% siendo el segundo menos frecuente que se detectó dentro del estudio, sin embargo, esto demuestra que *P. melaninogenica* puede presentar dentro de su genética este tipo de mecanismos que les confiere resistencia antibiótica.

El gen *bla_{TEM}* quien codifica para la hidrólisis de β -lactamas por TEM β -lactamasas, considerado como el mecanismo más común para que las bacterias adquieran resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Yu *et al.*, 2018), ha sido mayormente aislado en bacilos entéricos como en *Escherichia coli* y en *Klebsiella pneumoniae* (Stange *et al.*, 2019). Por lo cual es extraño encontrar su presencia en bacterias pertenecientes a la microbiota oral como *Prevotella* spp. se considera un precursor de las β -lactamasas de espectro extendido;

un mecanismo de resistencia importante que impide el tratamiento antimicrobiano por lo cual cobra importancia su presencia al evitar el correcto mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos, de uso habitual en infecciones bacteriana frecuentes en la práctica odontológica.

Este gen se encontró una frecuencia de 21,4% sin embargo, ninguno de los aislamientos estudiados eran muestras endodónticas, contrario a los hallazgos de Rôças y Siqueira en el 2012 donde era el gen de resistencia a antibióticos más prevalente entre los aislamientos endodónticos estudiados, se encontró una prevalencia del 17% de los aislamientos. Dentro del texto el autor referencia a Jungermann *et al*, quienes reportaron a *bla_{TEM}* en su estudio como el más frecuente detectado en el 33% de las muestras de infecciones endodónticas (Rôças y Siqueira, 2012). En odontología su frecuencia ha sido analizada en aislamientos endodónticos, sin embargo, puede encontrarse en otro tipo de muestras como placa bacteriana supra gingival o subgingival y saliva de pacientes con condiciones sistémicas y/o enfermedad gingival.

En un estudio en el que evaluaron los genes asociados con resistencia antibiótica a macrólidos, encontraron una frecuencia del 68% del gen *ermF* en el género *Prevotella* spp; (Xie *et al.*, 2014). Arzese *et al.*, 2000 en su estudio encontró una incidencia global de cepas *ermF* positivas a nivel del género *Prevotella* del 8.3% este último es comparable con el presente trabajo en el cual gen *ermF* presentó una frecuencia del 11.9 % aunque no fue el más prevalente es importante resaltarlo, ya que este gen confiere resistencia a antibióticos macrólidos, estos antibióticos son utilizados como segunda elección cuando ha fracasado la terapia antibiótica convencional o cuando los pacientes son alérgicos a antibióticos como las penicilinas.

La frecuencia de los genes *tetQ* y *tetM*, ha sido reportada para el gen *tetQ* del 70% y 77% y para *tetM* de 75% y 82%, en pacientes con diferentes condiciones periodontales de placa subgingival y lengua respectivamente; esta concuerda con el estudio realizado, donde se observó una frecuencia alta de estos dos genes que aunque no fue de porcentajes tan elevados, fue la mayor dentro del estudio; 26.1% para *tetQ* y del 21.4% para *tetM* (Ioannis

et al., 2009). Lo que indicaría una mayor presencia de estos dos genes en el genoma de *P. melaninogenica* y una elevada resistencia a tetraciclinas comúnmente prescritas en odontología.

En un estudio realizado por Dominguez *et al.*, Observó una alta frecuencia de *tetM* (100%) de las muestras analizadas y un 9,5% de frecuencia de *tetQ*, el autor expone que dentro de su investigación solamente el 12% del total de los pacientes reportaron el uso de tetraciclinas en su vida (Dominguez *et al.*, 2018). Al desconocer la previa exposición de los pacientes a esta familia de antibióticos, se desconoce la causa de la presencia de estos genes que codifican para resistencia antibiótica.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos confirmar que *Prevotella melaninogenica* funciona como reservorio de genes, los cuales son expresados por la presión selectiva causada por los antibióticos sobre este microorganismo dando lugar a futuras complicaciones. Aunque es importante aclarar que la presencia de estos genes en la bacteria, no significa que este se esté expresando, es claro que tener aislamientos portadores implica un factor de riesgo importante en la terapia empírica.

De acuerdo a la asociación entre genes de resistencia con tipo de muestra (Placa, hisopado y saliva), Condición periodontal y condición sistémica. El análisis se realizó mediante la prueba de Chi cuadrado/ exacta de Fisher siendo un resultado significativo < 0.05 . En el que se observó que el gen *ermF* fue el único que tuvo un resultado significativo con respecto a la asociación con tipo de muestra, donde se encontró que en las muestras de hisopado este gen es más frecuente.

11. CONCLUSIONES

La prevalencia de genes de resistencia antibiótica en aislamientos clínicos orales de *Prevotella melaninogenica* es alta para antibióticos de la familia de las tetraciclinas, seguido de los β -lactámicos. El gen *tetQ* puede ser aislado en *P. melaninogenica* en mayor frecuencia respecto a los genes *cfxA*, *cfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM* y *ermF*

12. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Es importante continuar evaluando fenotípicamente la resistencia antibiótica, mediante métodos de cultivo que permitan determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a antibióticos, considerando la prevalencia de los genes ya evaluados.

La determinación de la frecuencia del gen *nim*, es de suma importancia debido a que dentro de los antibióticos que suelen prescribirse para el tratamiento de infecciones bacterianas orales, se encuentran los nitroimidazoles, más frecuentemente el metronidazol; antibiótico comúnmente utilizado para actuar contra microorganismos anaerobios, ampliamente prescrito en tratamientos periodontales, donde se puede asociar a la amoxicilina, del cual se ha reportado una frecuente presencia de genes de resistencia por parte géneros bacterianos como *Prevotella* spp, por lo que conocer la frecuencia con la que se puede hallar este gen de resistencia antibiótica en microorganismos como *Prevotella melaninogenica*, cobra aún más importancia, para evitar tratamientos fracasos de la terapia antibiótica y desencadenar una mayor resistencia antibiótica en los pacientes.

13. REFERENCIAS

- Acevedo TY, Hernández AF. Detección de genes de resistencia antibiótica *CfxA*, *CfxA2*, *bla_{TEM}*, *tetM* y *tetQ* en aislamientos orales de *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*. Tesis de pregrado. Universidad El Bosque, Bogotá. 2017.
- Addy M, Martin MV. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. *Oral Dis* 2003; 38 – 44
- Aguilar K, Gomez L. Resistencia a la Amoxicilina y producción de betalactamasas de cepas de *Streptococcus mutans* aislados de pacientes sanos. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 2012.
- Akhi, M. T., Ghotaslou, R., Alizadeh, N., Yekani, M., Beheshtirouy, S., Asgharzadeh, M., & Memar, M. Y. 2017. *nim* gene-independent metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* in surgical site infections. *GMS hygiene and infection control*, 12, Doc13.
- Alauzet C, Mory F, Teyssier C, Hallage H, Carlier JP, Grollier G, et al. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 January 01; 54:60-64.
- Alauzet, C., Marchandin, H., & Lozniewski, A. 2010. New insights into *Prevotella* diversity and medical microbiology. *Future microbiology*, 5, 1695-1718.
- Allison, H. E., & Hillman, J. D. 1997. Cloning and characterization of a *Prevotella melaninogenica* hemolysin. *Infection and immunity*, 65, 2765-2771.
- Ambler, R.P. 1980 *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 289, 321-331
- Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5-16.
- Ardila, C. M., Granada, M. I., & Guzmán, I. C. 2010. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *Journal of periodontal research*, 45, 557-563.
- Arzese, A. R., Tomasetig, L., & Botta, G. A. 2000. Detection of *tetQ* and *ermF* antibiotic resistance genes in *Prevotella* and *Porphyromonas* isolates from clinical specimens and resident microbiota of humans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 577-582.

- Arredondo, A., Blanc, V., Mor, C., Nart, J., & León, R. 2019. Azithromycin and erythromycin susceptibility and macrolide resistance genes in *Prevotella* from patients with periodontal disease. *Oral diseases*, 253, 860-867.
- Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., & Slots, J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral microbiology and immunology*, 11, 266-273.
- Binta B, Patel M. Detection of *cfxA2*, *cfxA3*, and *cfxA6* genes in beta-lactamase producing oral anaerobes. *J Appl Oral Sci* 2016 April 01;24:142-147.
- Boyanova, L., Kolarov, R., Gergova, G., Dimitrova, L., & Mitov, I. 2010. Trends in antibiotic resistance in *Prevotella* species from patients of the University Hospital of Maxillofacial Surgery, Sofia, Bulgaria, in 2003–2009. *Anaerobe*, 16, 489-492.
- Briceño, E., Pardi, G., & Perrone, M. 2009. Nuevas especies del género *Prevotella* y su importancia en el área odontológica: Revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana*, 47, 167-173.
- Brogden, K. A., Guthmiller, J. M., & Taylor, C. E. 2005. Human polymicrobial infections. *The Lancet*, 365, 253-255.
- Brook, I., Wexler, H. M., & Goldstein, E. J. 2013. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clinical microbiology reviews*, 26, 526-546.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros A A. Un esquema de clasificación funcional para β -lactamasas y su correlación con la estructura molecular. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 : 1211-1233
- Cabrera C, Gómez R, Zuñiga E. Resistance to bacterial antibiotics, antiseptics and disinfectants a manifestation of the survival and adaptation mechanism. *Colomb Med*. 2007: 149-158
- Calderón G, Agullar L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista médica Costa Rica y centro América*. 2016:757-763
- Celig, D. M., & Schreckenberger, P. C. 1991. Clinical evaluation of the RapID-ANA II panel for identification of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 457–462.

- Champoux, J. F. C. 2005. Microbiología médica. Mexico: McGRAW-HILL Intramericana Editores, S.A. de C.V.
- Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., & Wilson, D. N. 2012. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 16900–16905. <http://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>
- Domínguez-Pérez, R. A., De la Torre-Luna, R., Ahumada-Cantillano, M., Vázquez Garcidueñas, M. S., Pérez-Serrano, R. M., Martínez-Martínez, R. E., & Guillén-Nepita, A. L. 2018. Detection of the antimicrobial resistance genes blaTEM-1, cfxA, tetQ, tetM, tetW and ermC in endodontic infections of a Mexican population. *Journal of global antimicrobial resistance*, 15, 20-24.
- Dupin C, Tamanai-Shacoori Z, Ehrmann E, Dupont A, Barloy-Hubler F, Bousarghin L, et al. Oral Gram-negative anaerobic bacilli as a reservoir of beta-lactam resistance genes facilitating infections with multiresistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2015 February 01;45:99-105.
- Echeverri, A. J., Quiroz, M. B., Mayorga-Fayad, I., Perdomo, D. C., Castañeda, M. A., Villamil, G. L., ... & Rengifo, A. C. 2008. Perfiles antimicrobianos de bacterias subgingivales en pacientes con periodontitis en Colombia. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 1, 61-65.
- Falagas, M. E., & Siakavellas, E. 2000. Bacteroides, *Prevotella*, and Porphyromonas species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *International journal of antimicrobial agents*, 15, 1-9.
- Fernandez-Canigia L, Cejas D, Gutkind G, Radice M. Detection and genetic characterization of beta-lactamases in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from oral cavity infections and peritonsillar abscesses. *Anaerobe* 2015 June 01;8-13.
- Fosse, T., Madinier, I., Hannoun, L., Giraud-Morin, C., Hitzig, C., Charbit, Y., & Ourang, S. 2002. High prevalence of cfxA β -lactamase in aminopenicillin-resistant *Prevotella* strains isolated from periodontal pockets. *Molecular Oral Microbiology*, 17, 85-88.

- Ghotaslou, R., Baghi, H. B., Alizadeh, N., Yekani, M., Arbabi, S., & Memar, M. Y. 2018. Mechanisms of *Bacteroides fragilis* resistance to metronidazole. *Infection, Genetics and Evolution*.
- Gomes, B. P. F. A., Lilley, J. D., & Drucker, D. B. 1996. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal*, 29, 69-75.
- Gürsoy, M. 2012. Pregnancy and periodontium, A clinical, microbiological, and enzymological approach via a longitudinal study. *Medica - odontologica*
- Hall, B. G., & Barlow, M. 2005. Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 1050-1051.
- Haraldsson, G., Meurman, J. H., Könönen, E., & Holbrook, W. P. 2005. Properties of hemagglutination by *Prevotella melaninogenica*. *Anaerobe*, 11, 285-289.
- Ioannidis, I., Sakellari, D., Spala, A., Arsenakis, M., & Konstantinidis, A. 2009. Prevalence of tetM, tetQ, nim and blaTEM genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *Journal of clinical periodontology*, 36, 569-574.
- Islam, S., Loewenthal, M. R., & Hoffman, G. R. 2008. Use of peripherally inserted central catheters in the management of recalcitrant maxillofacial infection. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66, 330-335.
- Iwahara, K., Kuriyama, T., Shimura, S., Williams, D. W., Yanagisawa, M., Nakagawa, K., & Karasawa, T. 2006. Detection of cfxA and cfxA2, the β -lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 44, 172-176.
- Jaramillo A, Quiroz, M. B., Mayorga-Fayad, I., Perdomo, D. C., Castañeda, M. A., Villamil, G. L. & Rengifo, A. C. 2008. Perfiles antimicrobianos de bacterias subgingivales en pacientes con periodontitis en Colombia. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 1, 61-65.
- Kondo, Y., Sato, K., Nagano, K., Nishiguchi, M., Hoshino, T., Fujiwara, T., & Nakayama, K. 2018. Involvement of PorK, a component of the type IX secretion system, in *Prevotella melaninogenica* pathogenicity. *Microbiology and immunology*, 62, 554-566.

- Kornman, Kenneth S.; Loesche, Walter J. 2011. "The subgingival microbial flora during pregnancy." *Journal of Periodontal Research* 15: 111-122.
- Koukos, G., Konstantinidis, A., Tsalikis, L., Arsenakis, M., Slini, T., & Sakellari, D. 2016. Prevalence of β -lactam (blaTEM) and Metronidazole (nim) Resistance Genes in the Oral Cavity of Greek Subjects. *The open dentistry journal*, 10, 89.
- Könönen, E., Saarela, M., Kanervo, A., Karjalainen, J., Asikainen, S., & Jousimies-Somer, H. 1995. β -Lactamase production and penicillin susceptibility among different ribotypes of *Prevotella melaninogenica* simultaneously colonizing the oral cavity. *Clinical infectious diseases*, S364-S366.
- Könönen, E., Nyfors, S., Mättö, J., Asikainen, S., & Somer, H. J. 1997. β -Lactamase production by oral pigmented *Prevotella* species isolated from young children. *Clinical infectious diseases*, 25(Supplement_2), S272-S274.
- Lasica, A. M., Ksiazek, M., Madej, M., & Potempa, J. 2017. The type IX secretion system (T9SS): highlights and recent insights into its structure and function. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 215.
- Laurence, L., Bruton, K., & Lazo, L. 2009. Insulina, agentes hipoglucémicos orales y farmacología del páncreas endocrino Goodman & Gilman: manual de farmacología y terapéutica 1221). Mexico DF.
- Leitsch D, Kolarich D, Wilson IBH, Altmann F, Duchêne M 2007 Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: A central role for thioredoxin reductase. *PLoS Biol*.5: e211. doi:10.1371/journal.pbio.0050211
- Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;;557e84
- Madinier I, Fosse T, Giudicelli J, Labia R. Clonación y caracterización bioquímica de una Clase- β -Lactamasa de *Prevotella intermedia*. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia*. 2001; 45 : 2386 - 2389. doi: 10.1128 / AAC.45.8.2386-2389.2001.
- Medina, A. 2009. Eficacia de la moxifloxacina en infecciones odontogénicas. *Avances en Odontoestomatología*, 25, 215-222.
- Morejón García, M., Salup Díaz, R., & Cué Brugueras, M. 2003. Actualización en tetraciclinas. *Revista Cubana de Farmacia*, 37, 1-1.

- Nadkarni, M. A., Chhour, K. L., Browne, G. V., Byun, R., Nguyen, K. A., Chapple, C. C., ... & Hunter, N. 2015. Age-dependent changes in *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella* species/phylotypes in healthy gingiva and inflamed/diseased sub-gingival sites. *Clinical oral investigations*, 19, 911-919.
- Najla Saeed Dar-Odeh., Osama Abdalla Abu Hammad., Mahmoud Khaled Al-Omiri., Ameen Sameh Khraisat.,Asem Ata Shehabi,2010. Antibiotic prescribing practices by dentists: a review.301-306.
- Odeh, M., Oliven, A., Potasman, I., Solomon, H., & Srugo, I. 2000. Pyomyositis of the thigh due to *Prevotella melaninogenica*. *Infection*, 28, 49-50.
- Öztürk, H., Ozkirimli, E., & Özgür, A. 2015. Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. *PloS one*, 10, e0117874.
- Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *New England Journal of Medicine*, 36219, 1804-1813.
- Rajaram, A., Kotrashetti, V. S., Somannavar, P. D., Ingalagi, P., & Bhat, K. 2016. Culture-based identification of pigmented *Porphyromonas* and *Prevotella* species in primary endodontic infections. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 10, 136.
- Rôças, I. N., & Siqueira Jr, J. F. 2012. Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. *Anaerobe*, 18, 576-580.
- Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. 2013. Detection of antibiotic resistance genes in samples from acute and chronic endodontic infections and after treatment.*Archives of Oral Biology*, 58, 1123-1128
- Ruan Y, Shen L, Zou Y, Qi Z, Yin J, Jiang J, et al. Comparative genome analysis of *Prevotella intermedia* strain isolated from infected root canal reveals features related to pathogenicity and adaptation. *BMC Genomics* 2015 February 25;16:3.
- Salako N, Rotimi VO, Adib SM et al. Pattern of antibiotic prescription in the management of oral diseases among dentists in Kuwait. *J Dent* 2004 32: 503 – 509
- Shanghai. 2012. Distribution of anaerobes in periodontal abscess and its resistance to antibiotics. *chinese journal of stomatology*.14-26.

- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. 2005. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000, 38, 135-187. 10.1111/j.1600-0757.2005.00107
- Stange, C., Yin, D., Xu, T., Guo, X., Schäfer, C., & Tiehm, A. 2019. Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. *Science of The Total Environment*, 655, 337-346.
- Suárez, C., & Gudiol, F. 2009. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27, 116-129.
- Sukhvinder S. Oberoi, Chandan Dhingra, Gaurav Sharma and Divesh Sardana. Antibiotics in dental practice: how justified are we. *International Dental Journal* 2015; 65: 4–10
- Tran, C. M., Tanaka, K., & Watanabe, K. 2013. PCR-based detection of resistance genes in anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19, 279-290.
- Tribble, G. D., Garza, J. J., Yeung, V. L., Rigney, T. W., Dao, D. H. V., Rodrigues, P. H., ... & Smith, C. J. 2010. Genetic analysis of mobile tetQ elements in oral *Prevotella* species. *Anaerobe*, 16, 604-609.
- Veloo, A. C. M., Seme, K., Raangs, E., Rurenga, P., Singadji, Z., Wekema-Mulder, G., & van Winkelhoff, A. J. 2012. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *International journal of antimicrobial agents*, 40, 450-454.
- Warnke, P. H., Becker, S. T., Springer, I. N., Haerle, F., Ullmann, U., Russo, P. A., ... & Schubert, S. 2008. Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 36, 462-467.
- Xie, Y., Chen, J., He, J., Miao, X., Xu, M., Wu, X., & Zhang, W. 2014. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes of obligate anaerobes isolated from periodontal abscesses. *Journal of periodontology*, 85, 327.
- Yu, X., Zhang, M., Zuo, J., Shi, X., Tang, X., Chen, L., & Li, Z. 2018. Evaluation of antibiotic resistant lactose fermentative opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae bacteria and blaTEM-2 gene in cephalosporin wastewater and its discharge receiving river. *Journal of environmental management*, 228, 458-465.

- Zanetti, S., Spanu, T., Deriu, A., Romano, L., Sechi, L. A., & Fadda, G. 2001. In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *International journal of antimicrobial agents*, 17, 407-409.