

**COMPARACIÓN ENTRE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA Y PRESENCIA
DE GENES DE RESISTENCIA EN *P. intermedia* y *P. nigrescens*.**

**Andrea Juliana Montaña Quintero
Edwin Daniel Cárdenas Castillo**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC.- NOVIEMBRE 2018**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Comparación entre susceptibilidad antibiótica y presencia de genes de resistencia en <i>P. intermedia</i> y <i>P. nigrescens</i> .
Grupo de Investigación:	Unidad de Investigación Básica Oral-UIBO
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:	Andrea Juliana Montaña Quintero Edwin Daniel Cárdenas Castillo
Asesor metodológico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor temático:	Dra. Yormaris Castillo Romero
Asesor estadístico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILIANA GÓMEZ 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 todos aquellos que hicieron parte de nuestra formación como profesionales; familia, amigos y docentes, los cuales estuvieron a nuestro lado apoyándonos en lo bueno y lo malo durante este proceso. A nuestros padres agradecemos su sacrificio y esfuerzo por educarnos y sacar lo mejor de nosotros.

Al instituto UIBO-MO (Unidad Básica de Investigación Oral-Microbiología Oral) por la contribución brindada para el desarrollo de este proyecto de investigación; a la Dra. Gloria Lafaurie, la Dra. Diana Marcela Castillo, la Dra. Yormaris Castillo, la Dra. Nathaly Delgadillo y la Dra. Yineth Nueta por sus conocimientos, su comprensión, apoyo incondicional, dedicación y paciencia; fueron una pieza clave para que se pudiera desarrollar cada etapa de este proyecto.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pág.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Cavidad oral y microbiota	3
2.2 Género <i>Prevotella</i>	3
2.3 Importancia de la resistencia antibiótica en aislamientos orales	5
2.4 Epidemiología de la resistencia antibiótica de aislamientos orales	7
2.5 <i>Prevotella</i> spp y genes de resistencia	9
2.6 Principales antibióticos de uso en odontología	11
2.7 Mecanismos de resistencia a los principales antibióticos de usos en odontología	13
2.8 Métodos para la determinación de resistencia antibiótica	16
2.8.1 Métodos de detección y punto de corte	19
2.8.2 Métodos cuantitativos, prueba del epsilómetro (e-test)	20
2.9 <i>Prevotella</i> spp y susceptibilidad antibiótica	21
3. Planteamiento del problema	23
4. Justificación	25
5. Situación Actual	27
6. Objetivos	30
6.1 Objetivo general	30
6.2 Objetivos específicos	30
7. Metodología del Proyecto	31
7.1. Tipo de estudio	31
7.2. Población y muestra	31
7.3. Procesamiento microbiológico	31
7.3.1 Extracción de DNA de aislamientos de <i>Prevotella</i> spp	32
7.3.2 Identificación de <i>P. intermedia</i> y <i>P. nigrescens</i> por reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	32
7.3.3 Detección de los genes de resistencia <i>cfxA</i> , <i>cfxA2</i> , <i>blaTEM</i> , <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> y <i>ermF</i> por PCR convencional	33
7.4. Determinación de Susceptibilidad antibiótica en <i>Prevotella intermedia</i> y <i>Prevotella nigrescens</i>	36
7.4.1 Preparación de medio de cultivo	36
7.4.2 preparación de inóculos bacterianos	37
7.5 Plan de tabulación y análisis.	39
8. Consideraciones éticas.	40

8.1 Discusión sobre las consideraciones éticas	40
9.. Resultados	41
9.1 Frecuencia de <i>P. intermedia</i> y <i>P. nigrescens</i>	41
9.2 Prevalencia de genes de resistencia en <i>P. intermedia</i> y <i>P. nigrescens</i>	41
9.3 Susceptibilidad antibiótica en aislamientos de <i>P. intermedia</i> y <i>P. nigrescens</i>	42
10. Discusión	45
11. Conclusiones	49
12. Referencias bibliográficas	50
13. Anexos	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Método de dilución en agar.	18
Figura 2. Método de difusión en disco.	19
Figura 3. Método Kirby-Bauer	19
Figura 4. Método Etest®.	20
Figura 5. Esquema diagramático del método de dilución en agar brucella	36
Figura 6. Protocolo de Montaje de la MIC de los aislamientos de <i>P. intermedia</i> y <i>P. nigrescens</i>	37
Figura 7. Lectura e interpretación de la de MIC de los antibióticos en aislamientos de <i>P. intermedia</i> y <i>P. nigrescens</i>	38

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de infecciones odontogénicas	13
Tabla 2. Secuencias de primers para <i>Prevotella intermedia</i> y <i>Prevotella nigrescens</i>	33
Tabla 3. Secuencia de primers utilizados para los genes <i>cfxA</i> <i>cfxA₂</i> <i>bla_{TEM}</i> <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> y <i>ermF</i>	34
Tabla 4. Puntos de corte para interpretación de la MIC para microorganismos anaerobios	39
Tabla 5. Frecuencia de <i>Prevotella nigrescens</i> y <i>Prevotella intermedia</i> en aislamientos orales de <i>Prevotella</i> spp.	41
Tabla 6. Frecuencia de genes <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 intermedia</i> y <i>Prevotella nigrescens</i>	42
Tabla 7. Susceptibilidad antibiótica en aislamientos de <i>Prevotella intermedia</i>	42
Tabla 8. Susceptibilidad antibiótica en aislamientos de <i>Prevotella nigrescens</i>	44

LISTA DE ABREVIACIONES

	Pág.
MIC: Concentración mínima inhibitoria	17
CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute	17
ONPG: orto-nitrofenil-β-galactósido	31
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa	32
MIC₅₀: Concentración mínima Inhibitoria para el 50% de los aislamientos	39
MIC₉₀: Concentración mínima Inhibitoria para el 90% de los aislamientos	39
AMX: amoxicilina	42
AMC: amoxicilina/ácido clavulánico	42
TE: tetraciclina	42
DO: doxiciclina	42
E: eritromicina	42
CC: clindamicina	42
G: gentamicina	42
MTZ: metronidazol	42

RESUMEN

Comparación entre susceptibilidad antibiótica y presencia de genes de resistencia en *P. intermedia* y *P. nigrescens*.

Introducción: El género *Prevotella* pertenece a la microbiota oral normal. Sin embargo, son aislados comúnmente de infecciones polimicrobianas, las cuales se manejan frecuentemente con tratamiento mecánico. En algunos pacientes es necesario un tratamiento antibiótico adicional. Este género, es muy importante 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. Adicionalmente se cree pueden funcionar como reservorio de genes de resistencia antibiótica.

Objetivo Comparar la susceptibilidad antibiótica y la presencia de genes de resistencia en *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*. **Metodología:** Estudio experimental *in vitro*. Se evaluaron 1200 aislamientos orales de *Prevotella* spp previamente y se confirmó la especie de *P. intermedia* y *P. nigrescens* por PCR. Se determinó la frecuencia de genes de resistencia en las especies de *Prevotella* identificadas por PCR convencional. La susceptibilidad antibiótica, se evaluó mediante el método de dilución en agar sobre placas de agar brucella suplementado con hemina, menadiona y sangre de cordero, además de concentraciones de antibióticos desde 0.25 μ g/mL hasta 64 μ g/mL. Como control positivo se usó *Bacteroides fragilis* ATCC 25285. La interpretación de los resultados de la actividad *in vitro* de los antibióticos se realizó según los puntos de corte reportados por el CLSI. Se realizó análisis descriptivo de los datos. **Resultados:** los aislamientos clínicos de *P. intermedia* y *P. nigrescens* portan los genes de resistencia *cfxA* 37%, *cfxA* 2 2%, *bla*_{TEM} 17%, *tetM* 29%, *tetQ* 46% y *ermF* 22%; y presentan resistencia a los antibióticos de primera elección en Odontología como amoxicilina (67,3%) seguido por clíndamicina (35,1%), Amoxicilina-ácido clavulánico (27,7%) y metronizadol (18,2%) **Conclusion:** *P. intermedia* y *P. nigrescens* son un reservorio importante de genes que codifican para resistencia antibiótica frente a la terapia de primera y segunda elección en odontología y están expresando estos genes de resistencia, lo cual podría favorecer eventos de transferencia genética entre la microbiota normal, transeúnte y patógena complicando el manejo procesos infecciosos en la cavidad oral.

Palabras claves: CMI, Cavidad oral, Genes de resistencia, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*.

ABSTRACT

Comparison between antibiotic susceptibility and presence of resistance genes in *P. intermedia* and *P. nigrescens*.

Introduction: The genus *Prevotella* belongs to the normal oral microbiota. However, it is usually isolated from poly-microbial infections which are usually treated with mechanic means but some patients require additional antibiotic treatment. The genus is very important clinically because it has an ample resistance profile to several antibiotic families used in dentistry such as β -lactamines, tetracyclines and macrolides. It is believed they can act as a reservoir of antibiotic resistance genes. Objective: to compare the antibiotic susceptibility and presence of resistance genes in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. **Methodology:** Experimental in vitro study which evaluated 1200 oral isolations of *Prevotella* spp and confirmed presence of *P. intermedia* and *P. nigrescens* by means of PCR. The frequency of resistance genes in *Prevotella* was determined with conventional PCR. Antibiotic susceptibility was evaluated by means of agar dilution on brucella agar plaques supplemented with haemin, menadione, lamb's blood and concentrations of antibiotics from 0.25 μ g/mL to 64 μ g/mL. *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 was used as a positive control, interpretation of results of in vitro activity of the antibiotics was done following the milestones reported by the CLSI and a descriptive analysis of data was carried out. **Results:** Clinical isolations of *P. intermedia* and *P. nigrescens* carry the genes with frequency of *cfxA* 37%, *cfxA 2* 2%, *bla TEM* 17%, *tetM* 29%, *tetQ* 46% and *ermF* 22%; they present resistance to first-choice dental antibiotics such as amoxicillin (67.3%), clindamycin (35.1%), amoxicillin-clavulanic acid (27.7%) and metronidazole (18.2%). **Conclusions:** *P. intermedia* and *P. nigrescens* are an important reservoir of genes that code for antibiotic resistance against the first and second choice therapy in dentistry and are expressing these resistance genes, which could favor genetic transfer events between the normal microbiota, transient and pathogenic complicating the management of infectious processes in the oral cavity. **Key Words:** CMI, oral cavity, resistance genes, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*.

1 Introducción

El género *Prevotella* son bacterias Gram negativas, anaerobias estrictas, pertenecen a la microbiota oral normal, pero se han asociado con enfermedades orales polimicrobianas, donde actúan como patógenos putativos y oportunistas (Krom *et al.*, 2014). En cavidad oral este género microbiano, se ha relacionado con enfermedad periodontal, infecciones endodónticas, abscesos de origen dental o periodontal en estados crónico y agudos (Xie *et al.*, 2014). El manejo de estas infecciones, por su parte se lleva a cabo mediante la erradicación del factor etiológico y por tanto del componente infeccioso, ya sea mediante instrumentación mecánica, utilización de componentes químicos o uso de agentes físicos. Es así como la terapia antibiótica ha venido cobrando un papel importante en el manejo odontológico de infecciones orales, como terapia complementaria a la instrumentación mecánica generar resistencia a los principales antimicrobianos utilizados en la práctica odontológica (Acevedo y Hernández, 2017).

Las bacterias anaerobias de origen oral han sido reportadas ser altamente susceptibles a los antibióticos. Sin embargo, muchos de estos microorganismos cuando son sometidos una presión selectiva en su genoma inducida por terapias antibióticas incompletas, recurrentes e inadecuadas pueden expresar mecanismos de resistencia antibiótica, lo cual ha cobrado gran importancia en el manejo clínico de las infecciones orales (Daza, 1998).

El estudio de la resistencia antibiótica en microorganismos de cavidad oral es muy escaso, y los reportes que existen, se han enfocado principalmente en evaluar resistencia a los antibióticos de primera elección en la práctica odontológica, como son los agentes β -lactámicos. Sin embargo, en la actualidad se han venido implementando de forma más cotidiana el uso terapias combinadas, lo cual podría contribuir a la resistencia a otras familias de antibióticos. Los antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y macrólidos son los antibióticos de primera y segunda elección para el tratamiento de infecciones orales por su buen efecto contra la mayoría de bacterias y por su baja incidencia de efectos adversos. Sin embargo, cada dos de tres aislamientos clínicos de *Prevotella* spp podrían ser productores de cefuroximasa (CfxA) un tipo de β -lactamasa activa frente a cefalosporinas (Fosse *et al.*, 2002; Rupp y Fey, 2003; Iwahara *et al.*, 2006; Rôças y Siqueira, 2012)

Arzese *et al*, en el año 2000 reportaron en los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* la presencia del gen *tetQ*, el cual confiere resistencia a antibióticos como las tetraciclinas. En infecciones por anaerobios o protozoos se usa metronidazol como terapia de elección lo que ha provocado la expresión del gen *nim* y sus variantes alélicas, lo cual conduce a la producción de enzimas que evitan que el medicamento forme radicales nitrosos que son tóxicos para los microorganismos generando resistencia a este (Alauzet *et al*, 2010). En este sentido, Bancescu *et al*, 2015 evaluaron la susceptibilidad de cepas de *Prevotella* a antibióticos β -lactámicos, metronidazol y clindamicina provenientes de infecciones cervicofaciales, reportaron que el 33% son resistentes a los β -lactámicos y un 3% a Clindamicina. Por otro lado, Veloo *et al*, 2015 evaluaron la susceptibilidad a amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, clindamicina y metronidazol y reportaron que la resistencia a amoxicilina incrementó de un 30% del 2011 a un 60% en el 2013.

Por lo anterior cobra gran relevancia clínica evaluar la presencia de genes asociados a resistencia antibiótica y hacer un análisis comparativo del efecto de la presencia de genes y la capacidad de expresarlos mediante la evaluación de la susceptibilidad antibiótica en el género *Prevotella*, considerando su importancia en cavidad oral, además de la poca literatura científica publicada sobre la presencia de estos componentes genéticos y su relación con susceptibilidad antibiótica en estos microorganismos, surge la importancia de poseer datos epidemiológicos de esta problemática, para conocer así el comportamiento en nuestra población, considerando la importancia de la terapia antibiótica en la práctica odontológica, sumado a esto, el presente estudio cuenta con un importante tamaño de muestra y en comparación con otros estudios las *Prevotellas* identificadas provienen de pacientes con diferentes diagnósticos clínicos y no exclusivamente de infecciones permitiendo entender el comportamiento de este microorganismo en general.

2 Marco teórico

2.1 Cavity oral y microbiota

El microbioma oral es uno de los más diversos en el cuerpo humano, más de 700 especies son responsables de colonizar diferentes nichos, incluyendo tejido blando y superficies dentales dando lugar a la placa sub y supra gingival, como una consecuencia de diferentes condiciones ambientales (Langfeldt *et al.*, 2014). Mientras la mayoría de la microbiota oral juega un rol importante en preservar la salud oral y sistémica, la microbiota patógena está también incluida en una baja cantidad. La gran variabilidad de la composición inter-individual microbiana, es debida a factores como edad, género, hormonas, estado de salud, varios factores sistémicos como temperatura, humedad, pH y disponibilidad de nutrientes presentes en la saliva y líquido crevicular y algunos externos como dieta y estrés que tienen un gran impacto en la microbiota oral permitiendo que en ocasiones crezca en esta tanto la nativa o normal como la transeúnte y patógena oportunista (Langfeldt *et al.*, 2014). Con respecto a la microbiota de la placa subgingival, Bik *et al.*, en 2010, identificaron nueve filotipos bacterianos, de estos, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria fueron los que se encontraron con mayor frecuencia y los de menor frecuencia fue el género *Fusobacterium* (Bik *et al.*, 2010).

Existen interacciones físicas, químicas y metabólicas que intervienen en los sinergismos y cooperaciones inter-bacterianas. La interacción física facilita fenómenos de adhesión y coagregación, favoreciendo la formación de la biopelícula en cavidad oral. Por ejemplo, el género *Prevotella* utiliza estos fenómenos de interacción física para colonizar y adicionalmente co-agregarse con periodontopatógenos en la biopelícula dental. Por tal razón este género ha cobrado gran importancia ya que siendo parte de la microbiota oral normal, se comporta como patógeno putativo que en conjunto con bacterias patógenas participa en infecciones polimicrobianas de origen oral (Krom *et al.*, 2014).

2.2 Género *Prevotella*

Prevotella spp, anteriormente clasificada en el género *Bacteroides*, son bacilos Gram negativos anaerobios obligados. Se han clasificado teniendo en cuenta la producción de pigmento en dos grupos: "*Prevotella* no pigmentadas" como *P. buccae*, *P. buccalis*, *P. oris*, *P.*

oulorum, *P. veroralis*, *P. dentalis*, *P. tanneriae*, entre otras y las “*Prevotella* pigmentadas” donde se detectan con frecuencia *P. denticola*, *P. melaninogenica*, *P. intermedia* y *P. nigrescens* (Briceño *et al.*, 2009). Estas últimas caracterizadas por formar colonias lisas y brillantes de color marrón claro o negro en placas de agar sangre suplementado (Ruan *et al.*, 2015).

En cavidad oral el nicho de preferencia para estas bacterias es la región subgingival (Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009). Como factores de virulencia generales, el género *Prevotella* presenta fimbrias y adhesinas que le permiten interactuar con otros microorganismos en procesos de adhesión y coagregación bacteriana, así mismo tienen la capacidad de producir proteasas que degradan inmunoglobulinas como enzimas tipo IgGasa, IgAasa, IgMasa, también tienen acción tóxica sobre los fibroblastos por medio de endotoxinas y síntesis de factores supresores de linfocitos B y fibroblastos, la producción de interpainina A por parte de *P. intermedia*, la cual le permite resistir la acción del sistema de complemento en el fluido crevicular del surco, debido a que tiene la capacidad de inhibir las tres rutas del sistema de complemento al degradar la cadena alfa del C3, (Potempa *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha comprobado que hormonas como el estradiol y la progesterona estimulan su crecimiento (Slots y Taubman, 1992; Grenier y Turgeon, 1994). Tienen la capacidad de hacer sinergismos polimicrobianos con otras especies como las periodontopatógenas del complejo rojo de Socransky descrito en 1998, por lo cual son de gran importancia en el desarrollo de enfermedades periodontales (Socransky *et al.*, 1998).

Prevotella es un género versátil y se ha descrito como uno de los géneros más frecuentes y preponderantes en la cavidad oral junto con *Streptococcus* y *Selenomonas* (Serrano *et al.*, 2015), sin embargo, aunque son nativas, muchas de las especies de *Prevotella* por eventos disbióticos a nivel oral se comportan como patógenos oportunistas (Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009).

Prevotella intermedia es una especie de este género, que a menudo ha sido aislada de muestras subgingivales de pacientes con enfermedad periodontal, por lo cual, con frecuencia se ha asociado a esta patología y otras infecciones en cavidad oral y a nivel

cervicofacial. Otra especie negro pigmentada que ha cobrado gran importancia es *Prevotella nigrescens*, debido a que se ha detectado con mayor frecuencia en lesiones endodónticas tales como lesiones apicales o periodontitis apical (Mättö *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2001).

P. intermedia y *P. nigrescens* son microorganismos pertenecientes a la microbiota normal oral, quienes se comportan como oportunistas en el establecimiento y desarrollo de enfermedades infecciosas polimicrobianas difíciles de erradicar debido a que además sirven como reservorio de genes de resistencia a antibióticos, que puede compartir con periodontopatógenos (Rôças y Siqueira, 2013).

2.3 Importancia de la resistencia antibiótica en aislamientos orales

Dado que la cavidad oral es por su constitución anatómica un espacio con diferentes nichos colonizables, el microbioma oral es uno de los más diversos en el cuerpo humano y por tal razón suele ser un ambiente lleno de sinergismos entre la microbiota nativa y transeúnte o patógena oportunista que se encargan del estado de Eubiosis de los tejidos del hospedador; el cual depende de la abundancia relativa de los microorganismos se encuentren en determinado nicho (Aas *et al.*, 2005; Langfeldt *et al.*, 2014). No obstante, los estados de disbiosis, entendidos como el desequilibrio de la microbiota normal dados por cambios cualitativos y cuantitativos de la composición microbiana, conllevan a presentar alteraciones en la distribución, funcionamiento y metabolismo de las especies que compiten por colonizar las distintas superficies y da lugar a infecciones de la cavidad bucal, las cuales afectan a la población humana en cualquier edad constituyendo un problema de salud pública (Bik *et al.* 2010, Bascones *et al.*, 2005).

De las infecciones orales, las más frecuentes son en tejidos periodontales conocidas como gingivitis y/o periodontitis y en tejido dental como caries, las cuales si no se manejan adecuadamente a tiempo puede provocar cuadros clínicos más complejos desde abscesos hasta celulitis, siendo ya una infección orofacial (Gutiérrez *et al.*, 2004; Bascones *et al.*, 2005).

En el manejo de estas infecciones no siempre está indicada una antibioticoterapia, en la mayoría de los casos, el manejo es mecánico por medio de procedimientos profilácticos, desfocalización por medio de cucharilla o raspaje y alisados radicular. Cuando estos

procedimientos no son suficientes es necesario realizar una pulpectomía y/o exodoncia en casos extremos donde es la mejor forma de controlar el foco infeccioso; cuando el manejo mecánico no es suficiente se requiere hacer uso de terapia antibiótica en combinación con terapia mecánica manual, brindando mejores resultados (Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009).

La infección odontogénica es la tercera causa de consumo de antibiótico debido a patología infecciosa (Matesanz *et al.*, 2005; Granizo *et al.*, 2006). La prescripción de antibióticos se hace de forma empírica, basándose en criterios clínicos, práctica y experiencia, así como de la epidemiología reportada de los microorganismos implicados en la infección a tratar, por lo que al empezar la terapia antibiótica no se tiene conocimiento del patógeno responsable; es bien sabido que las infecciones odontógenas son de origen polimicrobiano, por lo que se requiere terapia antibiótica de amplio espectro como primera elección. (Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009).

El uso indiscriminado de antibióticos para el manejo de infecciones ha tenido grandes repercusiones en cuanto a la eficacia de los antibióticos; antimicrobianos que eran útiles en el pasado han perdido su eficacia en la actualidad por un aumento en la prevalencia de la resistencia. En los últimos años se ha duplicado la resistencia antimicrobiana en cavidad oral (Walker, 1996; Bascones *et al.*, 2005).

El aumento de la resistencia bacteriana afecta el tratamiento de las infecciones, y por ende hace más complicado el manejo de cualquier cuadro clínico debido a que en la actualidad se siguen empleando los antibióticos que fueron descubiertos hace muchos años los cuales no han evolucionado pues mantienen su mismo mecanismo de acción y principio activo, cambiando o modificando la estructura química del antibiótico, por lo que las bacterias al pasar de los años y por factores como la mala prescripción, automedicación, dosis en concentraciones y tiempos no adecuados hacen una presión selectiva del genoma microbiano que favorece la expresión de genes de resistencia a los diferentes antibióticos (Daza, 1998).

2.4 Epidemiología de la resistencia antibiótica de aislamientos orales

Históricamente las bacterias anaerobias Gram negativas de origen oral han mostrado ser altamente susceptibles a los antimicrobianos, sin embargo, la resistencia a los antibióticos en estas bacterias ha aumentado en algunos países y la monoterapia con algunos antibióticos no ha sido recomendada para el tratamiento de infecciones mixtas como es el caso de las infecciones orales (Tafur *et al.*, 2008). Los diferentes grupos de antibióticos, tales como las tetraciclinas, macrólidos y especialmente los β -lactámicos, han sido tradicionalmente recomendados como antibióticos de primera elección para el tratamiento de infecciones orales debido a que ellos presentan un buen efecto contra la mayoría de las bacterias causantes de estas infecciones y también porque tienen una baja incidencia de efectos adversos (Cortés y Laguilavo, 2012).

El aumento exponencial anual de resistencia antibiótica en microorganismos de la microbiota oral normal ha despertado gran interés y a su vez preocupación en el campo de investigación clínico y básico en odontología.

En España y los Países bajos, se ha reportado el perfil de resistencia de *Prevotella intermedia* a amoxicilina (33%), tetraciclina (16.7%) y clindamicina (11,1%). Adicionalmente reportan que existe mayor tasa de resistencia a estos antibióticos en población española que holandesa (Van Winkelhoff *et al.*, 2005).

Por otra parte, el perfil de resistencia antibiótica de *Prevotella* spp, en países asiáticos es similar; Kuriyama *et al.*, 2007 publicaron un estudio de susceptibilidad antimicrobiana de 800 aislamientos de microorganismos anaerobios provenientes de pacientes con infección dentoalveolar en Japón, de los cuales 499 eran *Prevotella*; 168 de las 499 cepas fueron resistentes a la amoxicilina, descritas de la siguiente manera: (*P. buccae*, *P. denticola*, *P. intermedia* / *P. nigrescens*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica*, *P. oralis* / *oris*, y *Prevotella* no identificadas) de las cuales 132 fueron identificadas como *P. intermedia* / *P. nigrescens* y 42 de ellas presentaron resistencia correspondiente a un 31,8% de esta especie de *Prevotella*. Esto fue evidente por la producción de β -lactamasas en las cepas resistentes a amoxicilina, las cuales también mostraron un perfil de resistencia a cefalosporinas, en este mismo estudio muestran que la mayoría de las cepas de *Prevotella* eran susceptibles a amoxicilina/

ácido clavulánico, así mismo, fueron altamente susceptibles a clindamicina y metronidazol, en este estudio muestra que levofloxacin fue muy poco efectivo contra *Prevotella*, de igual forma minociclina tuvo poca efectividad contra cepas que también eran resistentes a amoxicilina, eritromicina y azitromicina fueron antibióticos que tuvieron una efectividad variable sin importar si eran cepas resistentes a amoxicilina o no (Kuriyama *et al.*, 2007).

Lo anterior demuestra que el uso de antibióticos como eritromicina, azitromicina y levofloxacin no son la mejor opción al momento de intervenir en una infección que involucra microorganismos como *Prevotella* spp que en ocasiones son resistentes a amoxicilina, ya que tienen una eficacia muy variable, y su efectividad no es predecible por lo que se corre el riesgo de que se agudice el cuadro clínico de infección; en casos de resistencia a β -lactámicos la mejor opción sería hacer uso de una familia de antibióticos con diferente mecanismo de acción, como es el caso de clindamicina y metronidazol, o una combinación de antibióticos como amoxicilina ácido clavulánico.

En Colombia el perfil de resistencia de *Prevotella* es muy poco conocido, sin embargo, estudios como el de Jaramillo *et al.*, 2005 reportan que en pacientes con periodontitis crónica y agresiva que asistían a consulta odontológica a la Universidad del Valle en Cali Colombia, quienes presentaban abscesos y se tomaron muestras para identificar los microorganismos implicados, se hicieron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana los cuales mostraron que microorganismos como *Prevotella* estaban implicados en este tipo de infecciones y que de 2 de los 14 aislamientos de *P. intermedia/nigrescens* eran resistentes a la tetraciclina, todos fueron susceptibles a metronidazol, 2 aislamientos fueron resistentes a amoxicilina y ninguna de las bacterias identificadas además de las del género *Prevotella* presentó resistencia para azitromicina (Jaramillo *et al.*, 2005).

Ardila *et al* en 2010 evaluaron la susceptibilidad antibiótica de aislamientos provenientes de muestras tomadas de 76 pacientes colombianos con periodontitis que asistían a las clínicas de la Universidad de Antioquia; como resultados obtuvieron un total de 45 aislamientos clínicos de *Prevotella* sppnsiendo 34 de los 45 *P. intermedia/nigrescens* y 11 *P. melaninogenica*. El 32.55% de los aislamientos fueron resistentes a amoxicilina, 22.22% fueron resistentes a clindamicina, y un 26.66% de las cepas de *Prevotella* spp fueron resistentes a metronidazol, por otro lado, los aislamientos en general fueron altamente

susceptibles a amoxicilina/ácido clavulánico y moxifloxacino (Ardila *et al.*, 2010). Lo anterior demuestra que este género *Prevotella* tiene un alto perfil de resistencia a los antibióticos de primera elección y más comúnmente empleados en la terapia antibiótica en el manejo de infecciones polimicrobianas de cabeza y cuello en Colombia (Valenzuela y de Quadros, 2009).

2.5 *Prevotella spp* y genes de resistencia

Entre los antibióticos más utilizados para infecciones polimicrobianas en odontología encontramos: β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, metronidazol, clindamicina y fluoroquinolonas (Liñares y Martín-Herrero, 2003; Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009). No obstante, la literatura ha reportado que desde que se ha implementado el uso de estos antibióticos para contrarrestar las infecciones orales, las especies bacterianas han ido adquiriendo y/o desarrollando diferentes mecanismos de resistencia ante los antimicrobianos, como son la generación de bombas de flujo, protección ribosomal e inactivación enzimática (Moraes *et al.*, 2015). La manera más común para adquirir estos mecanismos se da por medio de genes de resistencia, los cuales pueden ser producidos o transferidos de forma horizontal entre bacterias de la misma especie e incluso a las poblaciones de bacterias residentes y/o transitorias de la cavidad oral; esto demuestra que la microbiota humana funciona como un reservorio para estos genes favoreciendo así su patogenicidad (Ioannidis *et al.*, 2009; Rôças y Siqueira, 2012).

Previamente se han realizado estudios que evalúan la resistencia a los antibióticos en las diferentes especies encontradas a nivel de cavidad oral, en los cuales se ha demostrado que las bacterias más relacionadas con desarrollar cierta resistencia son las anaerobias que se encuentran asociadas con las infecciones orales como *Prevotella spp* (Gomes *et al.*, 2011; Rôças y Siqueira, 2012).

El tratamiento farmacológico de primera línea en odontología para el manejo de infecciones dentales son los antibióticos β -lactámicos, por su espectro antimicrobiano, actividad bactericida, bajos efectos adversos y relación costo-efectividad (Iwahara *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha venido reportando un creciente aumento en la resistencia a estos antibióticos por la producción, transferencia y adquisición de material genético que codifica

para enzimas β -lactamasas, las cuales son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico del antibiótico y acción que está dada por la regulación de la expresión de los genes *cfxA*, *cfxA₂*, *cfxA₃* y *bla_{TEM}* (Rôças y Siqueira, 2013; Fernández *et al.*, 2015).

Cortés y Laguillavo en 2012, reportaron que dos tercios de los aislamientos clínicos de *Prevotella* spp podrían ser productores de cefuroximasa *cfxA* un tipo de β -lactamasa activa frente a cefalosporinas pero que también pueden degradar antibióticos como la amoxicilina (Cortés y Laguillavo, 2012). Diversos estudios han reportado que el 74-88% de pacientes con periodontitis presentan especies productoras de enzimas β -lactamasas (Van Winkelhoff *et al.*, 1997; Herrera *et al.*, 2000). Además, son preocupantes los recientes reportes de la presencia del gen *bla_{TEM}* en aislamientos clínicos de pacientes sanos, comprometidos periodontal y endodónticamente, debido a que estos genes codifican para un tipo de β -lactamasas de espectro extendido; las cuales derivan de β -lactamasas existentes que han sufrido mutaciones, confiriendo resistencia antibiótica a penicilina, ampicilina y cefalosporinas de primera generación, además de degradar antibióticos con inhibidores de β -lactamasas, como el caso del ácido clavulánico (Rupp y Fey, 2003). Todo lo anterior como consecuencia del uso indiscriminado que se le ha dado a este tipo de antimicrobianos, por lo que se ha venido implementando en los últimos años terapia con otros antibióticos e incluso terapias combinadas.

Arzese *et al.*, en el año 2000 reportaron en los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* la presencia del gen *tetQ*, el cual confiere resistencia a antibióticos de amplio espectro, como las tetraciclinas (Arzese *et al.*, 2000). Este gen ha sufrido algunas mutaciones creando variantes alélicas que ya se han detectado en el género *Prevotella* como son *a3h1* y *a2h2* (Okamoto *et al.*, 2001). La expresión de estos genes le confiere a la bacteria protección ribosomal como mecanismo resistencia frente a las diferentes tetraciclinas.

Por otro parte, en la mayoría de ocasiones el manejo de infecciones causadas por bacterias anaerobias o protozoos, se realiza con Metronidazol, lo que induce una presión selectiva en los microorganismos que ha provocado la expresión de genes como el *nim*, el cual le permite a la bacteria, la producción de enzimas que evitan que el medicamento forme radicales nitrosos que son tóxicos para los microorganismos haciendo a estos resistentes al metronidazol (Alauzet *et al.*, 2010).

Dentro de otras alternativas de tratamiento farmacológico encontramos la clindamicina y eritromicina, sin embargo, la resistencia a estos antibióticos ha venido aumentando durante los últimos años en los microorganismos anaerobios orales; la cual generalmente se encuentra codificada por el gen *ermF* (Chung *et al.*, 1999; Kuriyama *et al.*, 2007). Particularmente en *Prevotella* spp se ha identificado la presencia de este gen; Xie *et al.*, en 2014, reportaron la presencia del gen en 13 de los 19 aislamientos (68%) que fueron identificadas en muestras clínicas (Xie *et al.*, 2014). Este gen suele estar asociado con transposones conjugados ubicados en el cromosoma bacteriano, los cuales permiten que el gen sea transferido a otras especies bacterianas que hacen parte de la microbiota oral normal (Chung *et al.*, 1999).

2.6 Principales antibióticos de uso en odontología

Existe una alta tasa de infecciones odontogénicas, sin embargo, no hay criterios exactos de cuál antibiótico se debe emplear en cada una de las situaciones que se pueden presentar en la práctica clínica diaria, algunos autores consideran que las penicilinas son la primera opción, y dentro de las penicilinas la de elección es la amoxicilina. Otros consideran que para evitar que se inactive el antibiótico debe usarse amoxicilina en combinación con ácido clavulánico ya que hay un aumento de la resistencia a las penicilinas (Berini y Gay, 2004; Maestre, 2004; Bascones *et al.*, 2005; Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009; Oberoi *et al.*, 2015). Los β -lactámicos son un grupo de antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglicano componente fundamental de la pared bacteriana afectando su integridad estructural y por ende teniendo un efecto bacteriostático tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas; los más usados son las penicilinas como: amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, entre otros (Liebana, 2002).

En casos de pacientes alérgicos a penicilinas son tratados con clindamicina, azitromicina o metronidazol por ser los antibióticos de segunda opción (Berini y Gay, 2004; Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009; Segura-Egea, 2010). A menudo, se emplea amoxicilina en combinación con metronidazol para el manejo de periodontitis crónica (Lopez *et al.*, 2009). Del grupo de las lincosamidas el antibiótico más utilizado es la clindamicina y del grupo de los macrólidos son utilizados: azitromicina, eritromicina y claritromicina; a pesar de que estos dos grupos estructuralmente son diferentes comparten su mecanismo de acción, el cual

consiste en inhibir la síntesis de proteínas bacterianas actuando a nivel ribosomal en la subunidad 50S y su acción bactericida o bacteriostática dependerá de la concentración del antibiótico en el sitio de acción (Liebana, 2002). En cuanto a los nitroimidazoles el más usado en odontología es el metronidazol, este es de amplio espectro y tiene acción bactericida sobre las bacterias anaerobias estrictas, su mecanismo de acción consiste en provocar lesiones irreversibles a nivel de los ácidos nucleicos (DNA) por medio de la reducción del grupo NO_2^- del antibiótico lo que lleva a la muerte del microorganismo (Liebana, 2002).

Por otra parte, los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos que tienen una acción bactericida sobre bacterias Gram negativas, el mecanismo empleado para ejercer efecto sobre las bacterias está dado por su capacidad de ingresar al interior del microorganismo mediante procesos de transporte dependientes de energía que sólo puede ocurrir en un ambiente con presencia de oxígeno, cuando esto sucede se une de manera irreversible al ribosoma en la subunidad 30S, inhibiendo la síntesis de proteínas mediante la interrupción de esta en la fase de iniciación, además puede generar una inadecuada lectura codón-anticodón dando origen a proteínas anómalas y no funcionales (Liebana, 2002). Un ejemplo de antibiótico de uso odontológico perteneciente a esta familia es la gentamicina, la cual es considerada como otra opción en la terapia antibiótica, ésta es usada en casos de realizar profilaxis antibiótica, en infecciones odontogénicas cuando el paciente se encuentra comprometido inmunológicamente y en el manejo hospitalario de infecciones de origen dental. Pese a esto su uso ha disminuido y ha sido reemplazada por otros tipos de antibióticos debido a que, genera en algunos casos toxicidad y además su administración en su mayoría es por vía parenteral lo cual hace que su uso esté limitado a tratamientos a nivel hospitalario (Berini y Gay, 2004).

Las tetraciclinas constituyen un grupo de antibióticos de amplio espectro que actúan en la subunidad 30S ribosomal inhibiendo la síntesis proteica generando una acción bacteriostática, de esta familia los más utilizados son las tetraciclinas, minociclina y doxiciclina los cuales van a tener mejor acción sobre microorganismos anaerobios, especialmente frente a los *Bacteroides*, *Actinomyces* y *Fusobacterium*. Debido a que estos pueden generar varios efectos adversos y una rápida resistencia se ha observado una

disminución de su uso; no hacen parte de los antibióticos de primera elección, aunque la doxiciclina es considerada un antibiótico de uso alternativo en el manejo de la periodontitis crónica y agresiva pues se ha observado su eficacia contra los microorganismos asociados a esta enfermedad (Liebana, 2002; Berini y Gay, 2004; Maestre, 2004; Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009).

Como se mencionó anteriormente, los antimicrobianos más utilizados en la infección odontogénica son: β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, metronidazol, clindamicina y gentamicina; para su adecuado manejo se debe tener en cuenta su posología y su vía de administración (Tabla 1) (Oberoi *et al.*, 2015).

Tabla 1. Antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de infecciones odontogénicas.

Modificado de: Oberoi et al., 2015

Antibiótico	Vía de administración	Posología
Amoxicilina	Oral	500mg/8h 1000mg/12h
Amoxicilina/ Ácido clavulánico	Oral o intravenosa	500-875mg/8h 2000mg/12h 1000-2000mg/8h
Clindamicina	Oral o intravenosa	300mg/8h 600mg/8h
Azitromicina	Oral	500mg/24h, 3 días consecutivos
Ciprofloxacino	Oral	500mg/12h
Metronidazol	Oral	500-750mg/8
Gentamicina	Intramuscular o intravenosa	240mg/24h
Penicilina	Intramuscular o intravenosa	1.2-1.4 millones UI/24h hasta 24 millones UI/24h

2.7 Mecanismos de resistencia a los principales antibióticos de usos en odontología

La resistencia antibiótica puede darse de dos maneras, la primera es la natural o también llamada intrínseca y la segunda es la resistencia adquirida. Por una parte, la resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano a un antibiótico específico, sin

embargo, la resistencia adquirida es en muchos casos la causante del fracaso del tratamiento y es cuando es necesario hacer pruebas de laboratorio para determinar la susceptibilidad del patógeno. Es bien sabido que las bacterias tienen la capacidad de adquirir resistencia en la variabilidad de su genética ya que se pueden presentar mutaciones o transferencia de material de DNA que codifica resistencia a una determinada familia de antibióticos sin importar si la transferencia de genes es dada entre especies diferentes o relacionadas (Vignoli y Seija, 2008).

Existen diferentes formas que pueden emplear los microorganismos para ser resistentes a los diferentes antibióticos, estas formas de resistencia se pueden agrupar en tres grandes mecanismos de resistencia antibiótica, el primer mecanismo es la inactivación enzimática, otro mecanismo es la modificación en el sitio blanco y por último la alteración de la permeabilidad, los anteriores van a estar ligados al mecanismo de acción del antibiótico (Vignoli y Seija, 2008).

Los β -lactámicos por mucho tiempo han sido el grupo antibiótico de primera elección, sin embargo, son inactivados ya que por medio de enzimas como las β -lactamasas hidrolizan el anillo β -lactámico, destruyendo entonces a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, y evitando así la unión del antibiótico a las proteínas de anclaje de penicilinas o PBPs de manera irreversible, estas enzimas son codificadas y sintetizadas gracias a la expresión de genes de resistencia a β -lactámicos como son los genes *cfxA* y *cfxA₂*, se ha reportado de que este gen se encuentra en el transposón movilizable Tn4555 en especies *Bacteroides* (Ferreira *et al.*, 2007). Se considera que la presencia de *cfxA/A₂* podría estar relacionada con el género bacteriano y con el origen geográfico en el mundo de las cepas productoras de la enzima (Giraud-Morin *et al.*, 2003). Se han detectado genes *cfxA₂* y *cfxA₃* en bacterias anaerobias aisladas de pacientes en países como Francia, Reino Unido, Noruega, Argentina y los Estados Unidos de América (Parker y Smith, 1993; Madinier *et al.*, 2001; Handal *et al.*, 2005), y en pacientes argentinos se ha detectado el *cfxA₆* en bacterias anaeróbicas (Fernández-Canigia *et al.*, 2015). En este mecanismo también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos (Vignoli y Seija, 2008).

Cuando el mecanismo de resistencia es alteración de la permeabilidad se modifica en la entrada de antibióticos dependiente de energía, como ocurre en la primera etapa de ingreso de los aminoglucósidos, o aumento de la salida de antibióticos por eflujo es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. Estos mecanismos presentan tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa para que el antibiótico no pueda ejercer acción y sea expulsado del interior de la célula, o en casos donde la membrana externa contiene bastantes lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias quedan confinadas a la penetración a través de proteínas transmembrana con función de porinas. Existen algunas moléculas de antibiótico, como penicilina y vancomicina, que por su tamaño son incapaces de pasar a través de las porinas (Vignoli y Seija, 2008). Y por último están las modificaciones del sitio blanco en el que el gen que codifica el propio blanco del antibiótico es alterado para que el antimicrobiano no pueda actuar así pueda ingresar a la bacteria, como por ejemplo las alteraciones en las PBP (Vignoli y Seija, 2008).

Los mecanismos de resistencia a tetraciclinas está dado por la presencia de bombas de eflujo, que disminuye la permeabilidad bacteriana al ser alterado el rRNA y también por la expresión del gen *tet*, el cual codifica para una proteína que en presencia de oxígeno y NADPH (Nicotiamida-Adenina Dinucleótido fosfato que modifica la droga, esto se explica debido a que esta resistencia es mediada por plásmidos que explican que es un gen que puede ser transferido por transferencia de plásmidos y que solo es expresado y le brinda resistencia a las bacterias cuando estas han estado expuestas al medicamento (Rodríguez *et al.*, 1998; Ioannidis *et al.*, 2009).

Los microorganismos desarrollan mecanismos defensivos que le generan resistencia a los aminoglucósidos como gentamicina, dentro de estos mecanismos podemos encontrar como es la modificación enzimática de la molécula, alteración de la difusión y mutación ribosómica con el fin de disminuir la afinidad del antibiótico a la subunidad 30s ribosomal, sin embargo, la inactivación enzimática bifuncional mediada por (AAC-6')-2"/APH-2", que le

permite acetilar, fosforilar o adenilar, siendo este el mecanismo más reportada para resistencia contra gentamicina (Palomino y Pachón, 2003).

El principal mecanismo de resistencia contra la familia de antibióticos nitroimidazoles como es el caso de metronidazol es por la alteración de las enzimas que activan el fármaco al inhibir la producción de sus metabolitos activos, ya que las bacterias disminuyen su capacidad de producción el grupo nitro del anillo imidazólico para dejarlo en una forma activa, además, hay una disminución en la permeabilidad por lo cual se disminuye la penetración del fármaco al interior de la bacteria (Bendesky y Menéndez, 2001; Ioannidis *et al.*, 2009).

La resistencia a los macrólidos como claritromicina, azitromicina y eritromicina está determinada por la expresión del gen *erm* en sus diferentes subtipos, que modifican o mutan determinantes cromosómicos o en ocasiones es una resistencia mediada por plásmidos, debido a que en algunos casos el medicamento es incapaz de penetrar en los sitios receptores al metilar la adenina por medio de enzimas ubicado en el componente 23s del ribosoma, aunque existen diversos tipos de resistencia a macrólidos como modificación del sitio blanco ya sea con metilación del ARNr o mutación de las r-proteínas, también puede ser resistente cuando hay síntesis de pequeños péptidos o inactivación enzimática, también bombas de eflujo (Lucas *et al.*, 2007).

La resistencia a clindamicina o familia de lincosamidas, puede ser natural debido a una modificación en la permeabilidad que no permite el paso de lincosamidas a través de la pared bacteriana y la resistencia adquirida hace referencia a plásmidos que codifican metilasas que actúan en la subunidad ribosomal 50s, específicamente dimetilando residuos de adenina en el rRNA23s disminuyendo la afinidad del antibiótico con el ARN del ribosoma (Sánchez *et al.*, 2007).

2.8 Métodos para la determinación de resistencia antibiótica

Las pruebas o test de susceptibilidad están indicados para aislamientos con gran potencial o capacidad de resistencia antibiótica, y para ello hay que tener en cuenta los reportes de resistencia antibiótica en la literatura, estos test cuentan con métodos estandarizados para realizarlos y de igual forma cuentan con un criterio de interpretación de acuerdo al método

empleado para determinar la susceptibilidad del microorganismo. En casos donde es predecible el comportamiento del patógeno frente a distintos antibióticos, no se recomienda o no requiere de realizar una prueba de susceptibilidad antibiótica. (Bates *et al.*, 1991; Gould *et al.*, 2000; Holland *et al.* 2009).

Dentro de los métodos de identificación o determinación de resistencia antibiótica podemos encontrar una gran variedad, el método fenotípico o convencional se basan en la detección de la expresión fenotípica *in vitro* de resistencia a los antibióticos, con lo cual se determina la Concentración Mínima Inhibitoria en sus siglas MIC/CMI, que permite evaluar una cantidad o concentración mínima de antibiótico en determinados microgramos por mililitro en que inhibe el crecimiento de un microorganismo (Holland *et al.* 2009).

Para evaluar algún método de susceptibilidad antibiótico y determinar la MIC es necesario exponer el microorganismo a distintas concentraciones del antibiótico y en condiciones adecuadas de ambiente, atmósfera, y medio de cultivo con los suplementos nutricionales requeridos por el patógeno a evaluar, para que posterior a la incubación se pueda hacer una lectura del método de susceptibilidad y analizar e interpretar la MIC de acuerdo a unos puntos de corte dados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) en resultados cuantitativos, mientras que un antibiograma nos puede dar resultados de microorganismo sensible o resistente (Ferraro, 2001; CLSI, 2008).

Otros métodos reportados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana son: dilución en caldo que consiste en la preparación de una secuencia de tubos con caldo de cultivo, que además se les agrega una determinada concentración de antimicrobiano distinta en cada uno de los tubos para que posteriormente se pueden inocular con una cantidad de suspensión de microorganismo de interés a una temperatura de 35°C y se determina la concentración mínima inhibitoria (CIM), esta técnica se emplea para medir cuantitativamente la actividad "*in vitro*" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano (Reller *et al.*, 1974; Jorgensen y Turnidge, 1998; Malbrán, 2012).

El método de dilución en agar es técnicamente igual al empleado para dilución en caldo, a diferencia de este se emplea por lo general para microorganismo anaerobios, consiste en preparar distintas concentraciones de antibiótico y se mezclan con la preparación del agar

antes de servirse en la caja de petri, allí se colocan inóculos de suspensión de microorganismos ajustadas de acuerdo a la escala de Mcfarland para ser incubados y posteriormente hacer la lectura de la MIC. (51, Jorgensen y Turnidge, 2007)

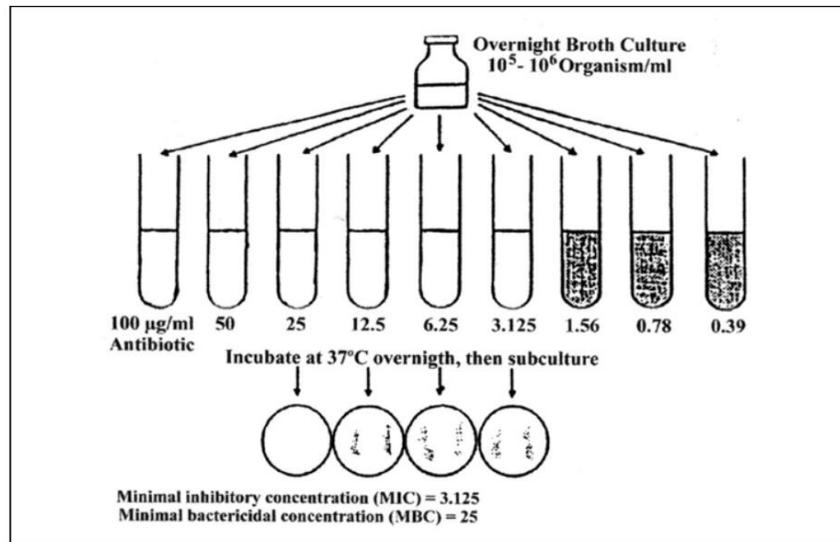


Figura 1. Método de dilución en agar. Tomada de: *Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución*, 2012.

El método de difusión en disco es muy empleado por ser sencillo y muy rápido, ha sido estandarizado y permite una categorización cualitativa de aislamientos como susceptibles, intermedios o resistentes. Se emplea para microorganismos comunes y de rápido crecimiento. Consiste en un disco de papel de filtro impregnado con antibiótico que se coloca sobre la superficie de una placa de agar que luego de ser incubado se ve un halo de no crecimiento alrededor del disco, de acuerdo al diámetro de halo sin crecimiento se determina si el microorganismo de interés es sensible o resistente. Sin embargo, no es apropiado para hacer seguimiento de resistencia antibiótica, debido a que solo ofrece datos semi cuantitativos y no se puede determinar la MIC (Bauer *et al.*, 1966; Jorgensen y Turnidge, 2007; Holland *et al.* 2009).

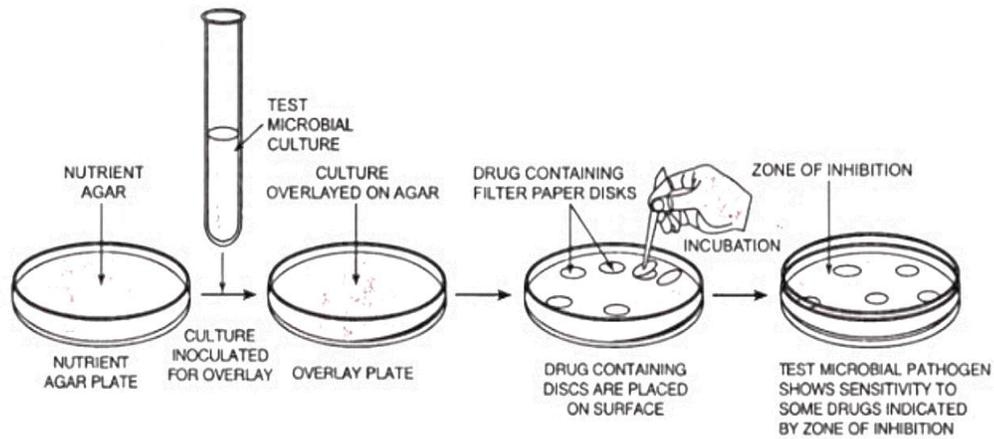


FIG. 20.3. Antimicrobial drug susceptibility test by agar diffusion technique.

Figura 2. Método de difusión en disco. Tomada de: *Top 4 Tests for Antimicrobial Drug Susceptibility*

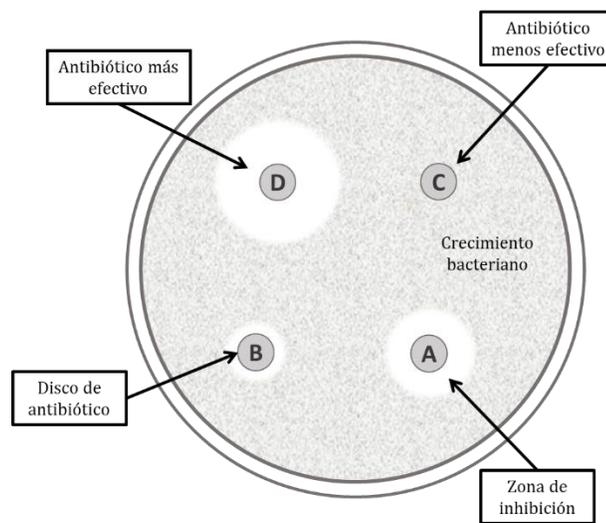


Figura 3. Método Kirby-Bauer

2.8.1 Métodos de detección y punto de corte

En algunos casos, la prueba de una sola concentración de fármaco puede ser el método más fiable y conveniente para la detección de resistencia estos métodos son conocidos como Screening y Breakpoints o métodos de detección por puntos de corte o interrupción, a menudo se utiliza la prueba de susceptibilidad de punto de corte en el que se evalúa un antibiótico, pero sólo a una concentración que se ha estandarizado es el punto de corte del

cual se define si es sensible o resistente. En este método no se evalúa la susceptibilidad a concentraciones de antibiótica que sean menores al punto de corte (Evangelista y Truant, 2002; Holland *et al.* 2009).

2.8.2 Métodos cuantitativos, prueba del epsilómetro (*e-test*)

Es una tira revestida de plástico que libera un gradiente antimicrobiano en medios de agar. Luego de la incubación se revisa en qué parte se crea una elipse de inhibición del crecimiento sobre la tira de plástico con antibiótico. Es sencillo de realizar, este método es, aunque es costoso. Es más comúnmente usado para fármacos no frecuentemente utilizados o para organismos fastidiosos o anaeróbicos debido a que la tira puede colocarse sobre medios enriquecidos para aumentar el crecimiento. (Baker *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 2002; Holland *et al.* 2009).

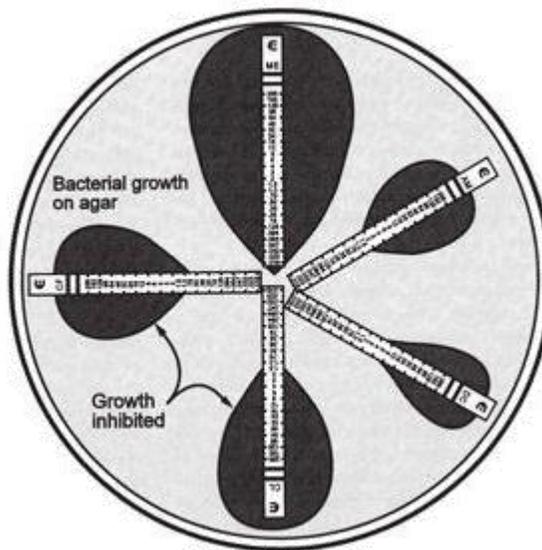


Figura 4. Método Etest®. Tomada de: *Infectious diseases, Basic medical Key*

Además de los métodos fenotípicos que suelen ser rápidos, existen métodos genotípicos que se espera que a futuro las pruebas genéticas y moleculares reemplacen las pruebas fenotípicas; estos métodos moleculares van dirigidos a identificar específicamente las mutaciones responsables de la resistencia antimicrobiana ya que estos ensayos pueden facilitar la detección en tiempo real como la reacción en cadena polimerasa, directamente

de los especímenes de los pacientes antes de que los resultados del cultivo estén disponibles, Se han desarrollado un gran número de sondas y cebadores diferentes dirigidos a genes asociados con la resistencia a la mayoría de las familias de antibióticos (Tenover, 2007; Holland *et al.* 2009).

2.9 Prevotella spp y susceptibilidad antibiótica

La susceptibilidad antimicrobiana ha sido evaluada en diferentes especies de *Prevotella*. Bancescu *et al*, 2015 evaluaron la susceptibilidad a penicilina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, metronidazol y clindamicina con método de microdilución en agar en 33 aislamientos de *Prevotella* proveniente de infecciones cervicofaciales, encontrando el 33% de los aislamientos resistentes a penicilina y ampicilina y el 3% resistente a clindamicina (Bancescu *et al.*, 2015).

Por otra parte, Veloo *et al*, 2015 reportaron la susceptibilidad de patógenos anaerobios orales frente a amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, clindamicina y metronidazol usando E-test en aislamientos colectados entre 2011 - 2013. Se observó que en los aislamientos de *Prevotella* la resistencia amoxicilina incremento de un 30% en 2011 a 60% en 2013, además se detectó una resistencia a clindamicina del 11% (Veloo *et al*, 2015).

Xie *et al.*, en 2014 evaluaron la resistencia a Amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, clindamicina y roxitromicina de anaerobios aislados de abscesos periodontales utilizando el método de dilución en agar y reportaron que *Prevotella spp* fue el género que presentó mayor resistencia, en especial frente a clindamicina, amoxicilina y roxitromicina, con un 38.1%, 30.9% y 26.2% respectivamente (Xie *et al.*, 2014).

Una de las desventajas de la evaluación de susceptibilidad antibiótica reportada en diferentes estudios en aislamientos de *Prevotella* es el tamaño reducido de la muestra sumado a que los pocos aislamientos que se reportan son provenientes de infecciones orales, en las cuales el paciente ya ha sido sometido a terapia antibiótica y por tanto los microorganismos ya han sufrido algún tipo de presión que induce en ellos la producción de mecanismos de resistencia.

Evaluar la susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos provenientes de pacientes con diferentes condiciones clínicas orales (sanos y enfermos) permite conocer en general cual es el perfil de resistencia de estos microorganismos frente a los antibióticos que comúnmente se prescriben en odontología como son: amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, metronidazol, clindamicina, entre otros. Estos microorganismos hacen parte de la microbiota normal oral, pero podrían funcionar como reservorio de genes que podrían ser transferidos entre diferentes microorganismos lo que complicaría la terapia antibiótica en pacientes con infecciones a nivel oral y extra-oral.

Por último, cabe resaltar que existe poca literatura reportada sobre este tema, además que la literatura disponible no es muy actual y presenta ciertas limitaciones, como número reducido de muestras e inclusión única de pacientes con afecciones periodontales o endodónticas, dejando de lado la posibilidad de detectar la presencia de dichos genes de resistencia y evaluación de la susceptibilidad antibiótica en aislamiento provenientes de población oralmente sana, dato que es relevante investigar. Esta carencia científica es preocupante teniendo en cuenta la importancia del manejo farmacológico en el tratamiento de infecciones en el campo odontológico y el creciente aumento en el consumo excesivo e indebido de antibióticos reportado en poblaciones de diferentes países del mundo (Ioannidis *et al.*, 2009), especialmente en países en vía de desarrollo, como Colombia, país donde no se ha investigado a profundidad este fenómeno.

3 Planteamiento del problema

El género *Prevotella* pertenece a la microbiota oral normal. Sin embargo, son aislados frecuentemente de infecciones polimicrobianas (Briceño *et al.*, 2009). La mayoría de las infecciones orales se manejan únicamente con tratamiento mecánico y/o quirúrgico. Pero, en pacientes con riesgo sistémico, es necesario un tratamiento antibiótico adicional, que suele ser prescrito empíricamente, basado en los datos publicados en la literatura científica. *Prevotella* spp ha cobrado importancia clínica debido a su amplio perfil de resistencia frente a varias familias de antibióticos (Rodríguez A y Rodríguez M, 2009; Alauzet *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2015). Las bacterias anaerobias Gram negativas de origen oral han mostrado ser altamente susceptibles a los antimicrobianos. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos en estas bacterias ha aumentado en algunos países y la monoterapia no ha sido recomendada para el tratamiento de infecciones mixtas como como las infecciones orales (Bancescu *et al.*, 2015). En las infecciones de origen odontogénico el tratamiento antibiótico de primera y segunda elección es especialmente con antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y macrólidos, debido a que ellos presentan un buen efecto contra la mayoría de las bacterias causantes de estas infecciones y también porque tienen una baja incidencia de efectos adversos (Slots y Taubman, 1992). La susceptibilidad a los antibióticos por parte de microorganismos anaerobios, incluidos *Prevotella* spp, cada vez es menor y la frecuencia de cepas resistentes a β -lactámicos u otros antibióticos, así como a la terapia combinada se han incrementado en los últimos años (Briceño *et al.*, 2009). Las tasas de resistencia están determinadas por diversos factores tales como la especie o ribotipo, la geografía, el consumo de antibióticos y la presencia de genes de resistencia (Grenier y Turgeon, 1994).

Se ha identificado la presencia de genes de resistencia en *Prevotella* spp como son *cfxA*, *cfxA₂*, *cfxA₃*, *cfxA₆*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ*, *ermG*, *ermQ* y *nim*, los cuales se comparten gradualmente entre otras especies bacterianas por transferencia horizontal de genes y en las poblaciones de bacterias residentes y transitorias de la cavidad oral. Lo anterior podría hacer que estos microorganismos frente a una terapia antibiótica inapropiada se les induzca una presión selectiva en su genoma provocando la expresión de estos genes y por tanto la resistencia antibiótica (Socransky *et al.*, 1998; Tafur *et al.*, 2008; Cortés y Laguilavo, 2012).

Diferentes estudios han sido realizados para evaluar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos orales de *Prevotella* spp. Sin embargo, una de las principales limitantes ha sido la recuperación del microorganismo debido a sus condiciones nutricionales y de crecimiento exigente, lo que reduce en la mayoría de estudios el tamaño de la muestra analizada. En Colombia no se conoce el perfil de susceptibilidad antibiótica de este género microbiano, que ha cobrado importancia clínica en los últimos años. Estudios previos realizados en nuestro grupo han evaluado concentración mínima inhibitoria por el método de dilución en agar con aislamientos provenientes de infecciones cervicofaciales, lo cual ha permitido establecer un método de trabajo estandarizado para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana en bacterias anaerobias además y como fortaleza de este trabajo se cuenta con un tamaño de muestra importante con respecto a lo reportado en la literatura, lo que permitirá identificar cuál es el perfil de susceptibilidad de los aislamientos orales de *P. intermedia* y *P. nigrescens* provenientes de muestras de pacientes que asistieron a clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque entre 2005-2016.

4 Justificación

La presente investigación evalúa la relación que existe entre la presencia de genes de resistencia y la susceptibilidad antibiótica en aislamientos orales de *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*, se decide evaluar esta especie y no otra ya que se ha reportado un amplio perfil de resistencia frente a las familias de antibióticos más utilizados en el campo de la odontología como son β -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos y metronidazol, en microorganismos anaerobios que hacen parte de la microbiota oral normal en especial *Prevotella* spp (Kim *et al.*, 2011). Pese a esto, este género tiene la capacidad de comportarse como patógeno oportunista en infecciones orales y cervicofaciales y se ha relacionado con la resistencia a dichos antibióticos, pues se ha demostrado la presencia de genes de resistencia como *cfxA*, *cfxA₂*, *bla_{TEM}*, *tetQ*, *tetM*, *nim*, *ermG*, *ermQ* (Brook *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2015), además puede actuar como reservorio de genes y transferir este material genético a otras especies generando un aumento en la resistencia, lo cual complicaría la terapia antibiótica en el manejo de infecciones a nivel oro facial y cervical (Briceño *et al.*, 2009; Alauzet *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2011). De igual forma, es relevante tener en cuenta que se ha evidenciado un aumento en las tasas de resistencia antibiótica a nivel mundial, dada por una inadecuada prescripción, uso indiscriminado de los antibióticos, entre otros factores; los cuales favorecen a la expresión y mutación de genes por una presión selectiva (Ioannidis *et al.*, 2009; Okamoto *et al.*, 2001).

Es fundamental evaluar la relación existente entre la presencia de genes de resistencia y la susceptibilidad antibiótica presentes en aislamientos clínicos orales de *Prevotella* spp, considerando que este género hace parte de la microbiota oral normal pero que se comporta como patógeno oportunista y se asocia a diferentes infecciones de cavidad oral y de cabeza y cuello. Además, cabe resaltar que en Colombia existe poca evidencia científica al respecto (Jaramillo *et al.*, 2008) y no hay un seguimiento a la resistencia antibiótica en bacterias orales, no hay vigilancia epidemiológica y los reportes existentes en la literatura son de otros países como Japón, Estados Unidos y Grecia. (Okamoto *et al.*, 2001; Ioannidis *et al.*, 2009; Briceño *et al.*, 2009).

En Colombia no se estudia sobre resistencia antibiótica en bacterias origen oral, especialmente en microorganismos anaerobios, por lo que no se conoce cuál es la situación

en nuestro país en cuanto al comportamiento de estos microorganismos frente a los antibióticos. Así, el presente trabajo permitirá conocer la frecuencia de resistencia antibiótica y la frecuencia de genes de resistencia que circulan en aislamientos clínicos orales de *P. intermedia* y *P. nigrescens* de pacientes que asistieron a las clínicas odontológicas de la Universidad el Bosque entre 2005 y 2016. Lo anterior permitirá implementar estrategias y guías de manejo de la terapia antibiótica, así como planes de vigilancia epidemiológica de la resistencia antibiótica en bacterias anaerobias de origen oral.

5 Situación actual

Anteriormente se han realizado estudios que evalúan la resistencia a los antibióticos en las diferentes especies encontradas a nivel de cavidad oral. Se ha observado que desde que se ha implementado la terapia antibiótica para el manejo de infecciones orales, las especies bacterianas han ido adquiriendo o desarrollando diferentes mecanismos de resistencia ante estos medicamentos, el más común, genes de resistencia (Rôças y Sigueira, 2012). Los microorganismos anaerobios de cavidad oral son los que en su mayoría se ven asociados en cuanto a la presencia de estos genes, dentro de estos encontramos a *Prevotella* spp, el cual ha adquirido un gran interés a nivel clínico y científico (Iwahara *et al.*, 2006).

Pese a que el género *Prevotella* hace parte de la microbiota normal de cavidad oral, se ha asociado a infecciones orales y extra orales comportándose como patógenos oportunistas, ya que poseen diferentes factores de virulencia que ayudan a su supervivencia y además les permite hacer sinergismos poli microbianos con otras especies de la cavidad oral. Dentro de las asociaciones más frecuentes se encuentran: *Prevotella* y *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* y *Prevotella*, *Eubacterium* y *Prevotella* (Briceño *et al.*, 2009; Rodríguez-A y Rodríguez-M, 2009; Alauzet *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2015). Además, se ha asociado a microorganismos que se encuentran relacionados con enfermedad periodontal como son *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* puesto que *Prevotella* spp hace parte del complejo naranja y actúa como puente en la colonización de estos periodontopatógenos (Socransky *et al.*, 1998).

En la literatura científica se ha evidenciado que, dentro del género de *Prevotella* existen algunas especies en las que se identifican con mayor frecuencia los genes de resistencia mencionados. En *P. intermedia* se han identificado diferentes genes que codifican β -lactamasas y bombas de eflujo que proporcionan resistencia a los antibióticos (Ruan *et al.*, 2015).

Los estudios sobre resistencia antibiótica en *Prevotella* spp se han realizado enfocándose principalmente en los antibióticos de primera elección en el manejo farmacológico como lo son los β -lactámicos. En este microorganismo, se ha reportado la producción de enzimas β -lactamasas y enzimas β -lactamasas de espectro extendido las cuales están dadas por la

regulación de la expresión de los genes *cfxA*, *cfxA₂* y *bla_{TEM}* (Rupp y Fey, 2003; Rôças y Sigueira, 2012; Fernández *et al.*, 2015)

Asimismo, se ha evaluado la presencia de genes de resistencia frente a otro tipo de antibióticos que han adquirido importancia en el manejo farmacológico de infecciones orales como metronidazol, eritromicina y las tetraciclinas; dicha resistencia se encuentra regulada por la expresión de genes como *nim*, *ermF*, *ermG*, *ermQ*, *tetQ* y *tetM*, los cuales se asocian a la producción de enzimas que tienen la capacidad de inactivar respectivamente cada antibiótico (Ioannidis *et al.*, 2009).

Por otro lado, en un estudio realizado en China en 41 pacientes, en el cual se evaluó el perfil de resistencia frente a antibióticos utilizados en el campo odontológico para el manejo de infecciones como lo son clindamicina, doxiciclina, amoxicilina, metronidazol, entre otros, en microorganismos anaerobios aislados de abscesos periodontales, utilizando el método de dilución en agar brucella; se reportó una resistencia frente a clindamicina, amoxicilina y metronidazol en un 38%,30% y 9.5% respectivamente. Además, se evidenció que el gen que se presentó con mayor frecuencia en los aislamientos de *Prevotella* spp fue *ermF* el cual media la resistencia a antibiótico como la clindamicina, 13 de los 19 aislamientos de *Prevotella* que contenían el gen *ermF* presentaron resistencia dicho antibiótico (Xie *et al.*, 2014).

Igualmente, Bancescu *et al.*, 2015 evaluó en una población de Rumania la susceptibilidad a penicilinas, metronidazol y clindamicina en 33 aislamientos de *Prevotella* spp y reportó que 11 de los 33 aislamientos eran resistentes tanto a la penicilina G como a la ampicilina y además presentaron resultados positivos para un tipo de β -lactamasas, las penicilinasas (Bancescu *et al.*, 2015).

Desde que se ha implementado el uso de los antibióticos para el manejo de las infecciones de cabeza y cuello se ha venido reportado un aumento en la tasa de resistencia antibiótica. Veloo y van Winkelhoff, (2015) evaluaron en una población de Groningen, los perfiles de susceptibilidad a antibióticos frente a amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, clindamicina y metronidazol en microorganismos que frecuentemente están aislados en cavidad oral; y se observó que la resistencia en los aislamientos de *Prevotella* spp. a amoxicilina aumentó en un 30% en el periodo 2011-2013 (Veloo y van Winkelhoff, 2015).

En el caso de Latinoamérica existen muy pocos reportes en cuanto a genes y perfiles de resistencia antimicrobiana de algunos microorganismos de interés clínico (Briceño *et al.*, 2009; Valenzuela y de Quadros, 2009). En Colombia, cabe destacar el estudio realizado por Jaramillo *et al.*, 2008 quien reportó resistencia de *Prevotella intermedia/nigrescens* a tetraciclinas del 13%, amoxicilina 13.6%, metronidazol 9% y azitromicina 5% en pacientes con periodontitis crónica (Jaramillo *et al.*, 2008). Igualmente, Ardila *et al.*, 2010 analizó la susceptibilidad antibiótica de algunos microorganismos aislados en muestras de 76 pacientes con periodontitis en donde se evidenció una alta frecuencia en la resistencia a clindamicina en *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* y *F. nucleatum*, por el contrario, se presenta alta sensibilidad a amoxicilina- ácido clavulánico y moxifloxacino (Ardila *et al.*, 2009).

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Comparar la susceptibilidad antibiótica y la presencia de genes de resistencia en *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*.

6.2 Objetivos específicos

- Identificar la presencia de los genes *cfxA*, *cfxA₂*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* en aislamientos orales de *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*.
- Determinar la susceptibilidad a amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, tetraciclina, doxiciclina, gentamicina, eritromicina, clindamicina y metronidazol en aislamientos orales de *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*.

7 Metodología del proyecto

7.1 Tipo de estudio

Observacional descriptivo *in vitro*.

7.2 Población y muestra (criterios de selección y exclusión)

Se evaluaron 1200 aislamientos de *Prevotella* spp, provenientes de diferentes muestras clínicas orales de pacientes que asistieron a consulta a las clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque; recolectados entre los años 2005 y 2016 que se encuentran 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.

7.3 Procesamiento microbiológico

Se descongelaron 1200 aislamientos clínicos de *Prevotella* spp, provenientes de diferentes muestras clínicas orales de pacientes que asistieron a consulta a las clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque entre 2005 y 2016.

Se tomó 50 μl de cada aislamiento y se realizó una siembra por agotamiento en agar Brucella enriquecido con 5% sangre de cordero, 0.0005% hemina y 0.00005% menadiona (BBB Microbiology Systems, cockeysville, MD); se llevó a incubación a 37°C en atmósfera de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) durante 7 días para la recuperación de *Prevotella* spp. Posteriormente se verificó el crecimiento, morfología de colonias y pureza. Los aislamientos puros fueron confirmados por características morfológicas de las colonias, como todas aquellas colonias planas de borde uniforme, regular con tonalidades desde un marrón claro hasta negro, prueba de ONPG(orto-nitrofenil- β -galactósido) y capacidad de auto florecer en presencia de luz ultravioleta.

Seguido a esto, cada aislamiento fue guardado en caldo BHI con 10% de glicerol y conservado a -80°C para mantener al microorganismo viable, por otra parte, también fue guardado en 500 μl de H₂O grado molecular en tubos Eppendorf de 1.5 mL y conservado a -20°C para extracción de DNA y pruebas moleculares posteriores.

7.3.1 Extracción de DNA de aislamientos de *Prevotella* spp

Para la identificación de especie y detección de los genes de resistencia en los aislamientos de *Prevotella* spp, se realizó la extracción de DNA por choque térmico para cada uno de ellos; para ello la muestra previamente conservada en agua y congelada a -20°C fue sometida a extracción de DNA por choque térmico, el cual consistió someter a ebullición la muestra llevándola a un beaker con agua destilada desionizada a una temperatura de 100°C durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, en centrífuga refrigerada (Microcentrifuga refrigerada, Himac-Hitachi modelo: bCT15RE). El sobrenadante se transfirió a nuevo tubo Eppendorf estéril de 1,5mL previamente marcado y este fue el producto final considerado como DNA, el cual fue conservado a -20°C hasta su uso.

7.3.2 Identificación de *P. intermedia* y *P. nigrescens* por reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los aislamientos orales de *Prevotella* spp para identificar las especies de *P. intermedia* y *P. nigrescens*. La detección de estos microorganismos se realizó mediante PCR convencional de acuerdo con las recomendaciones de Ashimoto *et al.*, 1996 modificaciones para este estudio como se describe a continuación.

La reacción para identificar *P. intermedia* y *P. nigrescens* se produjo en un volumen final de 25 µL, de los cuales 5µL correspondieron a la muestra y 20µL a la mezcla de reacción. *P. intermedia* la mezcla de reacción contenía buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 9,0 a 25°C], 1,5 mM MgCl₂ y 0.1% de Triton® X-100); 0,25UI de Taq DNA polimerasa (Promega); 1 mM MgCl₂; 0,2mM de cada desoxirribonucleótido y 2µM de cada primer. Para *P. nigrescens* la mezcla de reacción contenía buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 9,0 a 25°C], 1,5 mM MgCl₂ y 0.1% de Triton® X-100); 0,125UI de Taq DNA polimerasa (Promega); 2 mM MgCl₂; 0,08mM de cada desoxirribonucleótido y 1,5µM de cada primer.

Los ciclos de temperatura se llevaron a cabo en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad) realizado para *P. intermedia* con el siguiente protocolo: un paso inicial de 95°C durante 2 minutos, seguido de 36 ciclos de: 94°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. Y para *P. nigrescens*: un paso inicial de 95°C durante 2 minutos, seguido de 36 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 62°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos y un paso final de 72°C durante 10 minutos. Como control positivo se empleó DNA de la cepa de referencia de *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Prevotella nigrescens* ATCC 33561 y como control negativo agua molecular.

Los productos de la PCR se separaron electroforéticamente para visualizar las bandas en un transiluminador (GelDoc-BioRad) con luz ultravioleta a 300 nm. La identificación de cada microorganismo se confirmó por la presencia de sus productos de amplificación usando una electroforesis en un gel de agarosa a una concentración de 1.5% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Las secuencias de primers y condiciones de amplificación para cada especie de *Prevotella* son descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de primers para *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*

Especie	Secuencia de Primers	Longitud en pb	Autor
<i>P. intermedia</i>	F: 5' TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG3' R: 5' TCAACATCTCTGTATCCTGCGT3'	575 pb	Ashimoto <i>et al.</i> , 1996
<i>P. nigrescens</i>	F: 5' ATGAAACAAAGGTTTTCCGGTAAG3' R: 5' CCCACGTCTCTGTGGGCTGCGA3'	804 pb	Ashimoto <i>et al.</i> , 1996

7.3.3 Detección de los genes de resistencia *cfxA*, *cfxA₂*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF* por PCR convencional

Se realizó PCR para la identificación de los genes *cfxA*, *cfxA₂*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ* y *ermF*, utilizando los primers descritos por diferentes autores (tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de primers utilizados para los genes *cfxA* *cfxA₂* *bla_{TEM}* *tetM*, *tetQ* y *ermF*.

Gen	Secuencia de Primers	Longitud en pb	Autor
<i>cfxA</i>	F: 5'-GCAAGTGCAGTTTAAAGATT-3' R: 5'-GCTTTAGTTTGCATTTTCATC-3'	934 pb	Fosse <i>et al.</i> 2002
<i>cfxA₂</i>	F: 5'-CAAAGYGACAAYAATGCCTGCG-3' R: 5'-TSACGAAGRCGGCWAT-3'	426 pb	Fosse <i>et al.</i> 2002
<i>bla_{tem}</i>	F: 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3' R: 5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGG-3'	858 pb	Ioannidis <i>et al.</i> 2009
<i>tetM</i>	F: 5'-GACACGCCAGGACATATGG-3' R: 5'-TGCTTTCCTCTTGTTTCGAG-3'	397 pb	Lacroix <i>et al.</i> 1995
<i>tetQ</i>	F: 5'-GGCTTCTACGACATCTATTA-3' R: 5'-CATCAACATTTATCTCTCTG-3'	755 pb	Lacroix <i>et al.</i> 1996
<i>ermF</i>	F: 5'-TTTCGGGTCAGCACTTTACTA-3' R: 5'-ACTTTCAGGACCTACCTCATA-3'	476 pb	Reig <i>et al.</i> , 2001

La presencia de los genes *cfxA* y *cfxA₂* se determinó por PCR convencional descrita previamente por Fosse *et al.*, 2002 con modificaciones para este estudio.

La reacción se produjo en un volumen final de 25 µL, de los cuales 5 µL corresponden a la muestra y 20 µL a la mezcla de reacción que contenía buffer de PCR 1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 9.0 a 25°C], 1,5 mM MgCl₂ y 0.1% de Triton® X-100), 0.125 UI de Taq DNA polimerasa (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada desoxirribonucleótido y 2µM de cada primer. Los ciclos de temperatura se llevaron 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: 95°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y un paso final de 72°C durante 5 minutos. Como control positivo se empleó la cepa de referencia de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y como control negativo agua grado molecular.

La detección del gen *bla_{TEM}* se llevó a cabo según el protocolo descrito por Ioannidis *et al.*, 2009 con modificaciones. La reacción se produjo en un volumen final de 25 µL, de los cuales 5 µL corresponden a la muestra y 20 µL a la mezcla de reacción que contenía buffer de PCR

1X, (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 9.0 a 25°C], 1 mM MgCl₂ y 0.1% de Triton® X-100), 0.25 UI de Taq DNA polimerasa (Promega), 1 mM MgCl₂, 20 mM de cada desoxirribonucleótido y 2 μM de cada primer. Para determinar la presencia de los genes *tetM* y *tetQ* se llevó a cabo el protocolo descrito por Lacroix *et al.*, 1995-1996 con algunas modificaciones para este estudio.

La reacción se produjo en un volumen final de 25 μL, de los cuales 5 μL corresponden a la muestra y 20 μL a la mezcla de reacción que contenía buffer de PCR 1X (1.0 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 9.0 a 25°C], 2.0 mM MgCl₂ y 0.1% de Triton® X-100); 0,04 UI de Taq DNA polimerasa (Promega); 1,5 mM MgCl₂; 0.02 mM de cada desoxirribonucleótido y 2 μM de cada primer.

La reacción y perfil térmico para los genes *bla_{TEM}*, *tetM* y *tetQ* se llevaron a cabo en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad) incluyendo un paso inicial de 94°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y un paso final de 72°C durante 7 minutos. Como control positivo para el gen *bla_{TEM}* se empleó la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922, para *tetQ* la cepa de referencia de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y para *tetM* *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y como control negativo agua grado molecular.

Para determinar la presencia del gen *ermF* se llevó a cabo el protocolo según lo descrito por Reig *et al.*, 2001, con algunas modificaciones. La reacción se produjo en un volumen final de 25 μL, de los cuales 7 μL corresponden a la muestra y 18 μL a la mezcla de reacción que contenía 2.5 μL buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), 1 mM MgCl₂ y 0.1% de Triton® X-100), 2 μL MgCl₂, 1.0 UI de Taq DNA polimerasa (Thermo), 1 μL de cada desoxirribonucleótido y 1 μL del primer. Los ciclos de temperatura se llevaron a cabo en un termociclador (MyCycler, Thermal Cycler, Bio-Rad) incluyendo un paso inicial de 95°C durante 1 minuto, seguido de 95°C durante 30 segundos, 55°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 una cepa de referencia para *ermF*.

Los productos de la PCR se separaron electroforéticamente para visualizar las bandas en un transiluminador (Gel Doc XR+-BioRad) con luz ultravioleta a 300 nm. La identificación de

cada microorganismo se confirmó por la presencia de sus productos de amplificación usando una electroforesis en un gel de agarosa a una concentración de 1.5% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Las secuencias de primers y condiciones de amplificación para cada gen son descritas en la tabla 3.

7.4 Determinación de Susceptibilidad antibiótica en *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*

Para la determinación de la susceptibilidad antibiótica, en este estudio se empleó el método de dilución en agar, siguiendo los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016) para cada uno de los antibióticos aquí evaluados.

7.4.1 Preparación de medio de cultivo

Agar Brucella suplementado como se indicó previamente, fue preparado con concentraciones crecientes de los antibióticos clindamicina, tetraciclina, doxiciclina, gentamicina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, metronidazol desde concentraciones de 0.25µg/mL, 0,5µg/mL, 1µg/mL, 2µg/mL, 4µg/mL, 8µg/mL, 16µg/mL, 32µg/mL hasta 64µg/mL y utilizado para evaluar la susceptibilidad antibiótica de aislamientos orales de *P. intermedia* y *P. nigrescens* siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2016 (figura 5).

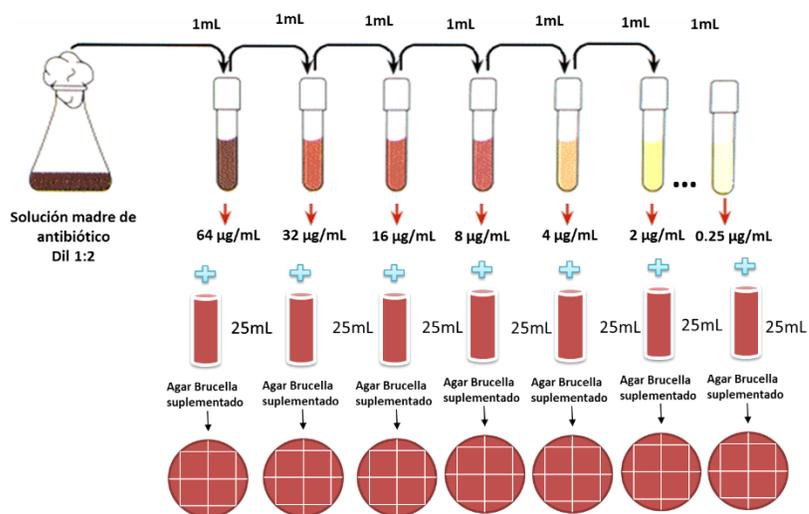


Figura 5. Esquema diagramático del método de dilución en agar brucella

7.4.2 Preparación de inóculos bacterianos

Aislamientos de *P. intermedia* y *P. nigrescens* previamente cultivados y verificada su pureza, fueron utilizados para ajustar espectrofotométricamente ($\lambda=620\text{nm}$) inóculos bacterianos a una concentración de 1×10^8 bacterias /mL (densidad óptica). Estos inóculos fueron empleados para la determinación de la MIC de cada uno de los antibióticos evaluados en este estudio.

Una vez ajustados los inóculos y dentro del rango establecido, se realizó siembra de $10\mu\text{L}$ de inóculo en cada pozo correspondiente al aislamiento a evaluar en el medio de cultivo preparado con una concentración de antibiótico específica: $0.25\mu\text{g/mL}$ - $64\mu\text{g/mL}$ (Figura 6).

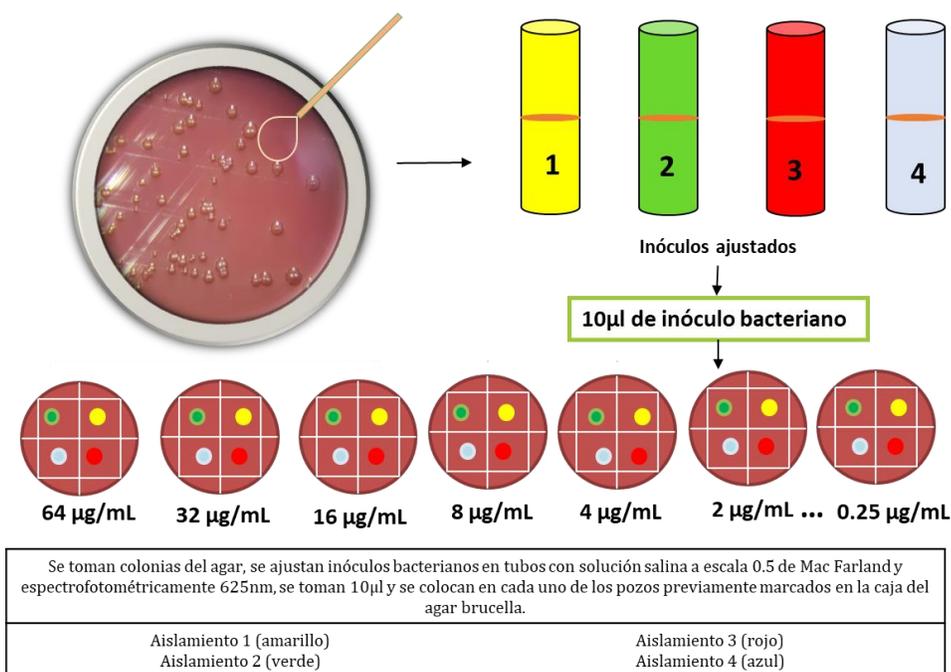


Figura 6. Protocolo de Montaje de la MIC de los aislamientos de *P. intermedia* y *P. nigrescens*

Posteriormente, las placas de cultivo inoculadas con cada aislamiento en cada una de las diferentes concentraciones se incubaron a 37°C durante 7 días en anaerobiosis (Thermo: AnaeroGen Oxiod Ltd, Basingstoke, UK - Anaerobic indicator BR0055B, Oxiod Ltd, Basingstoke, UK). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó lectura de e interpretación de las MIC para cada antibiótico evaluado en los aislamientos de *P.*

intermedia y *P. nigrescens*, con sus respectivas diluciones. Se determinó como concentración mínima inhibitoria la primera caja de agar con concentración de antibiótico en la que no se observa crecimiento bacteriano (Figura 7). Se empleó como control interno la cepa de referencia de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285.

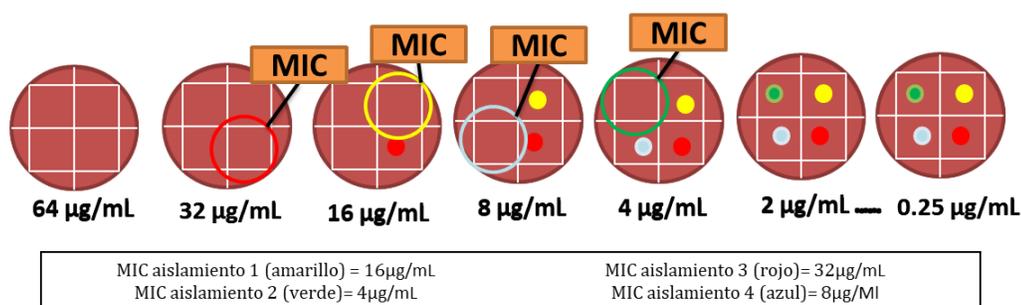


Figura 7. Lectura e interpretación de la de MIC de los antibióticos en aislamientos de *P. intermedia* y *P. nigrescens*

La susceptibilidad de los aislamientos evaluados, se expresaron como MIC₅₀ (concentración de antibiótico que inhibe el 50% de cepas evaluadas), MIC₉₀ (concentración de antibiótico que inhibe el 90% de cepas evaluadas) y Rango (Rango antimicrobiano en el cual se detectó inhibición). La frecuencia de aislamientos sensibles y resistentes se expresó en porcentaje. Los puntos de corte fueron definidos de acuerdo a lo reportado por el CLSI, 2016 (Tabla 4).

Tabla 4. Puntos de corte para interpretación de la MIC para microorganismos anaerobios fastidiosos. Tomada de: CLSI, 2016.

GRUPO	ANTIMICROBIANO	CRITERIOS INTERPRETACIÓN MIC (µg/mL)	
Penicilinas	Ampicilina	Susceptible ≤ 0.5	Resistente ≥ 2
	Penicilina	Susceptible ≤ 0.5	Resistente ≥ 2
Combinaciones inhibidoras de β-lactamasas	Amoxicilina-Ácido Clavulánico	Susceptible ≤ 4/2	Resistente ≥ 16/8
Lincosamidas	Clindamicina	Susceptible ≤ 2	Resistente ≥ 8
Tetraciclinas	Tetraciclina	Susceptible ≤ 4	Resistente ≥ 16
Macrólidos	Eritromicina	Susceptible ≤ 0.25	Resistente ≥ 1
Amino glucósidos	Gentamicina	Susceptible ≤ 4	Resistente ≥ 16
Nitroimidazoles	Metronidazol	Susceptible ≤ 8	Resistente ≥ 32

7.5 Plan de tabulación y análisis.

Se construyeron bases de datos en Microsoft Office Professional Plus Excel 2013 que fueron empleadas para calcular frecuencias de *Prevotella intermedia/nigrescens*, frecuencia de genes de resistencia y resistencia antibiótica para realizar un análisis descriptivo y expresar resultados en datos porcentuales.

8 Consideraciones éticas

8.1 Discusión sobre las 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 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

9.1 Frecuencia de *P. intermedia* y *P. nigrescens*

Se realizó identificación microbiológica de los 1200 aislamientos de *Prevotella* spp, de los cuales se recuperaron 500 aislamientos puros y viables de *Prevotella* spp los cuales fueron la unidad muestral general. Estos se usaron para la identificación de las especies de *P. intermedia* y *P. nigrescens*. La frecuencia de detección de estas especies fue del 11,4 % (n=57) y 20,4% (n=102) respectivamente. En la Tabla 5 se muestra la frecuencia de *P. intermedia* y *P. nigrescens* identificados en aislamientos clínicos de *Prevotella* spp.

Tabla 5. Frecuencia de *Prevotella nigrescens* y *Prevotella intermedia* en aislamientos orales de *Prevotella* spp.

Bacteria	Frecuencia (%)
<i>P. intermedia</i>	57 (11.4)
<i>P. nigrescens</i>	102(20.4)
<i>Prevotella</i> spp	341(68,2)
Total aislamientos	500(100)

9.2 Frecuencia de genes de resistencia en *P. intermedia* y *P. nigrescens*

La frecuencia de los genes que codifican para resistencia a antibióticos β -lactámicos: *cfxA*, *cfxA₂*, *bla_{TEM}*, tetraciclinas: *tetM*, *tetQ* y macrólidos: *ermF* fue determinada para los aislamientos de *P. intermedia* y *P. nigrescens*. El gen que se detectó con mayor frecuencia fue *tetQ* en un 46%, seguido de *cfxA* en un 37%, *tetM* 29%, *ermF* 22%, *bla_{TEM}* 17% y en un menor porcentaje *cfxA₂* con un 2%. En la tabla 6 se muestra la frecuencia de los genes estudiados para los aislamientos de *P. intermedia* y *P. nigrescens*.

Los genes de resistencia a tetraciclinas *tetQ* y *tetM* fueron detectados con mayor frecuencia en la especie *P. intermedia* con un 46% y 42% respectivamente. Seguindo de los genes de

resistencia a antibióticos β -lactámicos *cfxA*: 21%; *bla_{TEM}*: 4%, macrólidos *ermF*=3%. No se detectó presencia del gen *cfxA₂* (Tabla 6).

Para *P. nigrescens* se encontró una frecuencia igual para los genes *cfxA* y *tetQ* en un 46%, seguido de *ermF* en 30%, se observó una frecuencia similar en *tetM* y *bla_{TEM}* con un 27% y 25% respectivamente y en menor proporción *cfxA₂* en un 3%.

Tabla 6. Frecuencia de genes *CfxA*, *CfxA₂*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ*, *ermF* en aislamientos orales de *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*

Bacteria	n	<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. intermedia</i>	57	12(21)	0 (0)	2 (4)	24 (42)	26 (46)	5 (3)
<i>P. nigrescens</i>	102	47 (46)	3 (3)	25 (25)	22 (27)	47 (46)	31 (30)
Total	159	59(37)	3 (2)	27(17)	46 (29)	72 (46)	36 (22)

9.3 Susceptibilidad antibiótica en aislamientos de *P. intermedia* y *P. nigrescens*

En la tabla 7 se presenta la susceptibilidad antibiótica de los aislamientos orales de *P. intermedia* a los que se les identificaron al menos un gen de resistencia, representados en rango, MIC₅₀, MIC₉₀ y aislamientos sensibles y resistentes.

Tabla 7. Susceptibilidad antibiótica en aislamientos de *Prevotella intermedia*

Antibióticos	<i>Prevotella intermedia</i>					
	Punto de corte CLSI S/R (µg/mL)	n	Rango (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistente F(%)
AMX	≤ 0,5 / ≥ 2	11	<0,25 - 16	<0,25	4	2(18,2)
AMC	≤ 4 / ≥ 16	10	<0,25 - 16	1	8	2(20)
TE	≤ 4 / ≥ 16	10	<0,25 - 4	0,5	2	0
DO	≤ 4 / ≥ 16	11	<0,25 - 2	<0,25	1	0
E	≤ 0,25 / ≥ 1	10	<0,25-0,5	<0,25	<0,25	0
CC	≤ 2 / ≥ 8	10	<0,25-0,5	<0,25	<0,25	0
G	≤ 4 / ≥ 16	8	<0,25- 64	4	>64	7(87,5)
MTZ	≤ 8 / ≥ 32	10	<0,25 - 64	1	>64	4(40)

De un n total de 57 aislamientos de *P. intermedia* se determinó que los antibióticos a los que este microorganismo presentó mayor resistencia fueron gentamicina en un 87,5% y metronidazol con un 40% ; el rango de inhibición para estos dos antibióticos fue similar desde concentraciones $<0,25-64 \mu\text{g/mL}$; para gentamicina la MIC_{50} fue de $4 \mu\text{g/mL}$ y la $\text{MIC}_{90} >64 \mu\text{g/mL}$, por otra parte, para metronidazol la MIC_{50} fue de $1 \mu\text{g/mL}$ y la $\text{MIC}_{90} >64 \mu\text{g/mL}$, siendo adicionalmente estos microorganismos portadores del gen *ermF* en un 3%.

Así mismo se detectó resistencia a la amoxicilina y amoxicilina/Ac. Clavulánico en un 20% y 18,2% respectivamente en los aislamientos evaluados; para ambos la inhibición estuvo en un rango de $<0,25-16 \mu\text{g/mL}$; para AMX la MIC_{50} fue $<0,25 \mu\text{g/mL}$, mientras que la MIC_{90} de $4 \mu\text{g/mL}$, por el contrario, para AMC la MIC_{50} fue $1 \mu\text{g/mL}$ y la MIC_{90} de $8 \mu\text{g/mL}$. De los aislamientos evaluados ninguno presentó resistencia a doxiciclina (11), tetraciclina (10), eritromicina (10) y clindamicina (10). En el grupo de las tetraciclinas (TE y DO) se observó un rango de inhibición similar que fue de $<0,25-4 \mu\text{g/mL}$ y $0,25-2 \mu\text{g/mL}$ respectivamente; para TE la MIC_{50} fue $0,5 \mu\text{g/mL}$ y la MIC_{90} de $2 \mu\text{g/mL}$, para DO la MIC_{50} fue $<0,25 \mu\text{g/mL}$ y la MIC_{90} de $1 \mu\text{g/mL}$. En eritromicina y clindamicina se observaron los mismos resultados para ambos, un rango de inhibición de $<0,25-0,5 \mu\text{g/mL}$ y tanto la MIC_{50} como la MIC_{90} fue de $<0,25 \mu\text{g/mL}$.

En la tabla 8 se presentan los datos de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos clínicos orales de *P. nigrescens* a los que se les identificaron al menos un gen de resistencia, representados en rango, MIC_{50} , MIC_{90} y aislamientos sensibles y resistentes.

Tabla 8. Susceptibilidad antibiótica en aislamientos de *Prevotella nigrescens*

Antibióticos	<i>Prevotella nigrescens</i>					
	Punto de corte CLSI S/R ($\mu\text{g/mL}$)	n	Rango ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente F (%)
AMX	$\leq 0,5 / \geq 2$	35	<0,25 - >64	8	>64	29(82,8)
AMC	$\leq 4 / \geq 16$	26	0,5-64	8	64	8(30,7)
TE	$\leq 4 / \geq 16$	37	<0,25 - 16	1	16	6(16,2)
DO	$\leq 4 / \geq 16$	37	<0,25 - >64	<0,25	4	1(2,7)
E	$\leq 0,25 / \geq 1$	29	<0,25 - >64	0,5	32	13(44,8)
CC	$\leq 2 / \geq 8$	27	<0,25 - >64	1	>64	13(48,1)
G	$\leq 4 / \geq 16$	33	2 - >64	64	>64	29(87,8)
MTZ	$\leq 8 / \geq 32$	34	<0,25 - 64	1	8	4(11,8)

De los 102 aislamientos de *P. nigrescens* evaluados para determinar la susceptibilidad antibiótica, se observó que, los antibióticos a los que presentaron una mayor frecuencia de resistencia fueron a gentamicina y amoxicilina con un 87,8% y 82,8% respectivamente. En cuanto a gentamicina, el rango de inhibición fue de 2 ->64 $\mu\text{g/mL}$; la MIC₅₀ fue de 64 $\mu\text{g/mL}$ y la MIC₉₀ >64 $\mu\text{g/mL}$; por el contrario, en amoxicilina la inhibición fue mas amplio, comprendiendo concentraciones de antibioticos desde <0,25->64 $\mu\text{g/mL}$, la MIC₅₀ fue 8 $\mu\text{g/mL}$ y la MIC₉₀ fue >64 $\mu\text{g/mL}$. Por otra parte, se detectó una resistencia a clíndamicina y eritromicina en un 48,1% y 44,8% respectivamente; el rango de inhibición fue igual para los dos antibióticos <0,25->64 $\mu\text{g/mL}$; para eritromicina la MIC₅₀ fue 0,5 $\mu\text{g/mL}$ mientras que la MIC₉₀ 32 $\mu\text{g/mL}$, por el contrario, para clindamicina la MIC₅₀ fue 1 $\mu\text{g/mL}$ y la MIC₉₀ >64 $\mu\text{g/mL}$.

En cuanto a los demás antibióticos evaluados, se detectaron frecuencias de resistencia inferiores para amoxicilina/acido clavulánico, tetraciclina, metronidazol y doxiciclina con 30,7% (8), 16,2% (6), 11,8% (4) y 2,7% (1) respectivamente. Para AMC la inhibición estuvo en un rango de 0,5-64 $\mu\text{g/mL}$, la MIC₅₀ fue 8 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la MIC₉₀ fue 64 $\mu\text{g/mL}$. En el grupo de las tetraciclinas (TE y DO) se observó un rango de inhibición de <0,25-16 $\mu\text{g/mL}$ para TE y de <0,25->64 $\mu\text{g/mL}$ para DO; para TE la MIC₅₀ fue 1 $\mu\text{g/mL}$ y la MIC₉₀ de 16 $\mu\text{g/mL}$, para DO la MIC₅₀ fue <0,25 $\mu\text{g/mL}$ y la MIC₉₀ de 4 $\mu\text{g/mL}$. En metronidazol el rango de inhibición fue de <0,25 - 64 $\mu\text{g/mL}$, la MIC₅₀ fue de 1 $\mu\text{g/mL}$ y la MIC₉₀ 8 $\mu\text{g/mL}$.

10 Discusión

P. intermedia y *P. nigrescens* son microorganismos que hacen parte de la microbiota oral normal. Sin embargo, han generado interés clínico y epidemiológico debido a que participan con frecuencia en infecciones orales. Ha sido ampliamente documentado que este género microbiano actúa como patobionte en estados disbióticos a nivel oral y se asocia ampliamente con procesos infecciosos polimicrobianos de origen oral, donde han sido detectados en un 70% de los aislamientos provenientes de abscesos periodontales, de los cuales el 48.3% correspondían a bacterias negro pigmentadas y 21.7% no pigmentadas Xie *et al.* 2014. Así mismo Veloo y Winkelhoff en 2015 reportaron que *Prevotella* spp era el microorganismo anaerobio más prevalente en las muestras tomadas en 2011, 2012 y 2013 de pacientes de los Países Bajos, Socrancky *et al.*, en 1998 identificaron que *P. intermedia/nigrescens* se encontraba entre el 50 y 70% de las bolsas periodontales de los pacientes evaluados, *P. intermedia* y *P. nigrescens*, miembros del complejo naranja, se encuentran entre las especies que se encuentran con mayor frecuencia en la placa subgingival (Zambon *et al.*, 1981 ; Teanpaisan *et al.*, 1995 ; Kamma *et al.*, 2004). *P. intermedia* es un miembro asociado a la periodontitis del microbioma subgingival, mientras que *P. nigrescens* se ha detectado en la mayoría de los sujetos y no cambia en proporción de salud a enfermedad (Griffen *et al.*, 2012; Abusleme *et al.*, 2013). Por lo tanto, es una especie central del microbioma subgingival; además estos datos reportados son comparables con los obtenidos en este proyecto pues la especie detectada con mayor frecuencia fue *P. nigrescens*; adicionalmente, aunque en este estudio no se hizo una clasificación por diagnóstico la mayoría de muestras eran provenientes de pacientes oralmente sanos lo que demuestra el papel de *P. nigrescens* en este caso (Hong *et al.*, 2015). Sin embargo, es muy importante evidenciar que aun siendo la especie reportada en mayor frecuencia en microbiota normal es la que porta la mayor frecuencia de genes en este trabajo, lo que explica de manera importante la relación de *P. nigrescens* como reservorio genético. Un estudio mostró que, en la gingivitis natural, al inicio en un estado de salud gingival y después de 14 días de gingivitis experimental, el microorganismo predominante es *P. nigrescens* (Lie *et al.*, 2001). Gharbia *et al.* (1994) encontraron que *P. intermedia* y *P. nigrescens* pueden tener diferentes especificidades de sitio y propiedades de superficie y,

por lo tanto, se esperaría que sus funciones en la patogénesis de la periodontitis difieran (Gharbia *et al.*, 1994). Teniendo en cuenta lo anterior podría explicarse el porque tenemos diferencias en la frecuencia de *P. intermedia* y *P. nigrescens* en nuestro estudio.

En Colombia existe poca literatura relacionada con la resistencia antibiótica y seguimiento de aislamientos orales de *Prevotella* spp. Dentro de la evidencia disponible, en el trabajo de Ardila, *et al.*, en 2010 reportan que sujetos Colombianos con periodontitis que asistieron a las clínicas de la Universidad de Antioquia donde este microorganismo mostró resistencia variable a amoxicilina, metronidazol y clindamicina en el 35.55%, 26,66% y 22.22% de los aislamientos de *P. intermedia* / *nigrescens* respectivamente en comparación con amoxicilina/ácido clavulánico y moxifloxacino con los cuales mostraron ser 100% sensibles, así mismo Jaramillo A, *et al.*, 2005 caracterizaron clínica y microbiológicamente los abscesos periodontales de pacientes que asistieron a la Universidad el Valle en Cali Colombia, encontrando que *P. intermedia/nigrescens* eran el segundo microorganismo más frecuentemente aislado con un 60%.

Los resultados del presente estudio confirman que este microorganismo sirve como reservorio de genes de resistencia antibiótica, pues se identificaron genes como *cfxA*, *cfxA₂*, *bla_{TEM}*, *tetM*, *tetQ*, *ermF* y en efecto los están expresando, ya que se observó resistencia a las diferentes familias de antibioticos evaluados en este estudio.

Estos genes evaluados han sido frecuentemente identificados en *Prevotella* spp, Lacroix *et al.*, en 1995 sugirieron que el gen *tetM* está ampliamente diseminado en la microflora periodontal adulta, y la evidencia de su estudio en 1996, demuestra que la mitad de las 68 muestras de placa subgingivales analizadas eran *tetQ* positivas lo que sugiere que los genes de resistencia a tetraciclinas son muy frecuentes. Alauzet *et al.*, 2010, reporto que de 158 aislamientos de *Prevotella baroniae*, solo 4,4% presentaban el gen *nim* y Chung *et al.*, en 1999 detectaron el gen *ermF* en el 47% de los *Prevotella* spp identificadas; Fernández *et al.*, en 2015, reportaron mayores tasas de producción de β -lactamasas en *P. intermedia* que en *P. nigrescens*, todos los productores de β -lactamasas poseían el gen *cfxA* y el alelo más frecuente fue el alelo *cfxA₂*.

Al hacer pruebas de susceptibilidad antibiótica mediante el método dilución en agar y determinar la MIC se evidencia resistencia de la mayoría de los aislamientos a amoxicilina (31%) y gentamicina (36%), mientras que antibióticos como doxiciclina, tetraciclina, metronidazol mostraron ser los más eficientes, y en menor grado clindamicina, eritromicina y gentamicina; Esto es consecuencia de una mala terapia antibiótica, ya sea en las erróneas concentraciones y dosificaciones, o la auto prescripción está ejerciendo una presión selectiva en el genoma bacteriano, por lo cual están generando estos genes de resistencia complicando el manejo de infecciones. Por el contrario, si se tomaran muestras y se hicieran pruebas de susceptibilidad antibiótica más frecuentemente no se prescribirán antibióticos empíricamente y la terapia antibiótica sería guiada o dirigida de manera específica, evitando que aumente la resistencia antibiótica.

Antibióticos como amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y metronidazol que son los antibióticos de primera elección para el manejo de infecciones orales polimicrobianas, los dos primeros mostraron no ser suficientes debido a que el 67,3% de aislamientos evaluados fueron resistentes para amoxicilina mientras para amoxicilina/ácido clavulánico aproximadamente el 72,2% fueron sensibles, por otro lado metronidazol mostró ser eficiente debido a que el 81,8% de los aislamientos evaluados fueron susceptibles, por tanto se podría pensar en que la mejor opción es la terapia antibiótica combinada ya que no es suficiente la monoterapia.

Antibióticos como tetraciclina y doxiciclina no son los de primera elección, pero son los que se emplean cuando los de primera elección no son eficientes, estos mostraron ser eficientes debido a que el 87,2% y el 97,9% fueron sensibles respectivamente. En casos en que los pacientes son alérgicos a las penicilinas con mayor frecuencia se opta por prescribir macrólidos como azitromicina y/o eritromicina, en este estudio se evaluó eritromicina y de acuerdo a los estudios de susceptibilidad, aproximadamente un poco más de la mitad de los aislamientos evaluados (66,6%) fueron susceptibles, lo cual nos crea una gran inquietud de si debería ser una opción eficaz como alternativa para pacientes alérgicos a los antibióticos de primera elección, cuando tetraciclina y doxiciclina muestran una mayor efectividad. Entretanto el uso de aminoglucósidos como el evaluado en este estudio, gentamicina que ha sido ampliamente empleado en infecciones orales en combinación con penicilinas, cuando

están implicados microorganismos sobre infectantes como *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* entre otros, mostró ser altamente ineficiente debido a que el 87,8% de los aislamientos de *Prevotella intermedia/nigrescens* mostraron ser resistentes; mientras 64,9% de los aislamientos fueron sensibles frente a clindamicina y un 35,1% fueron resistentes.

Por otro lado, pese a la estandarización de protocolos para el manejo y almacenamiento viable de los aislamientos clínicos de *Prevotella spp.* El exigente crecimiento de estos microorganismos hace que hasta la fecha no se pueda tener el mismo número de aislamientos en los antibióticos evaluados para de *P. intermedia* y *P. nigrescens*, lo cual es una limitante importante en este tipo de análisis.

En este estudio no se realizó discriminación de datos por diagnóstico clínico de donde provenían las muestras en que se identificaron *P. intermedia* y *P. nigrescens*, debido a que esta asociación la están desarrollando otros estudiantes de la Universidad El Bosque que continúan con esta línea de profundización, por lo cual se pueden sobre o sub estimar los datos reportados en el presente estudio.

Los resultados de este estudio se unen a los reportes de resistencia antibiótica que alarman al sector mundial de la salud, puesto que demuestra que países latinoamericanos como Colombia en este caso, está presentando no solo una alta tasa de presencia de genes de resistencia sino que también los está expresando, evitando que los antibióticos de mayor uso o de primera elección sean eficientes como terapia antibiótica, y es por esto que se plantea, sustituir la monoterapia por una terapia antibiótica combinada y es necesario hacer investigaciones y estudios para identificar o desarrollar otro tipo de fármaco que evite el paso de genes de resistencia entre microorganismos.

11 Conclusiones

1. *Prevotella nigrescens* es la especie de este género detectada con mayor frecuencia en los aislamientos clínicos orales de *Prevotella* spp provenientes de pacientes con diferentes condiciones clínicas orales.
2. *P. intermedia* y *P. nigrescens* son un reservorio importante de genes que codifican para resistencia antibiótica frente a la terapia de primera y segunda elección en odontología y están expresando estos genes de resistencia, lo cual podría favorecer eventos de transferencia genética entre la microbiota normal, transeúnte y patógena complicando el manejo procesos infecciosos en la cavidad oral.

12 Referencias bibliográficas

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5721-32.
- Acevedo Salazar T., Hernández Pantoja A. Detección de genes de resistencia *antibiótica* *CfxA*, *CfxA2*, *blaTEM*, *tetM* y *tetQ* en aislamientos orales de *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*. [Tesis de pregrado] Programa de Odontología, facultad de odontología. Bogotá: Universidad El Bosque; 2017.
- Alauzet C, Mory F, Teyssier C, Hallage H, Carlier J. P, Grollier G, *et al.* Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2010; 54(1): 60-64.
- Ardila CM, Granada MI, Guzmán IC, Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* 2010; 45: 557-563.
- Arzese A. R, Tomasetig L, Botta G. A. 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.* 2000; 45(5): 577-582.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral microbiology and Immunology.* 1996; 11(4): 266-273.
- Basic medical Key. Fastest Basic medical Insight Engine [sede web]. 2016 [acceso 15 de octubre de 2017]. Infectious Diseases. Disponibles en: <https://basicmedicalkey.com/infectious-diseases-5/>
- Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: pp. 533-538.
- Bancescu G, Didilescu A, Bancescu A, Bari M. Antibiotic susceptibility of 33 *Prevotella* strains isolated from Romanian patients with abscesses in head and neck spaces. *Anaerobe.* 2015; 35 (PtA):41-4.

Bascones A, Aguirre JM, Bermejo A, Blanco A, Gay-Escoda C, González MA, *et al.* Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. *Av. Odontoestomatol* 2005; 21-6:311-331.

Bates D.W., Goldman L., and Lee T.H. Contaminant blood cultures and resource utilization: the true consequences of false-positive results. *JAMA* 1991; 265: pp. 365-369

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: pp. 493-496

Berini L, Gay C. Normas generales de tratamiento de la infección ontogénica. Antibioticoterapia. Profilaxis de las infecciones postquirurgicas y a distancia. In: Gay C, Berini L, editors. *Tratado de Cirugia Bucal. Tomo I.* Madrid: Ergon; 2004. p. 617-638

Biology discussion [sede Web]. [15 de octubre de 2017]. Top 4 Tests for Antimicrobial Drug Susceptibility. Disponible en: <http://www.biologydiscussion.com/medical-microbiology/top-4-tests-for-antimicrobial-drug-susceptibility/55863>

Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, *et al.* Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* 2010 Aug;4(8):962-74.

Briceño E, Pardi G, Perrone M. Nuevas especies del genero prevotella y su importancia en el área odontológica. Revisión de la literatura. *Act Odon Ven.* 2009;47(4).

Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clinical microbiology reviews.* 2013; 26(3), 526-546.

Chung W, Werckenthin C, Schwarz S, Roberts MC. Host range of the ermF rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43(1): 5-14.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238924-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.

Cortés L, Laguillavo E. Prevalencia de genes que codifican para la resistencia antibiótica en aislamientos de *Prevotella* spp, *Fusobacterium* spp, *Parvimonas micra* y *Streptococcus* del grupo Viridans aislados de infecciones cervicofaciales. [Tesis pregrado]. Bogotá D.C: Universidad el Bosque. Facultad de Odontología; 2012.

Daza RM. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud* 1998; 22: 57-67.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. *Clinical Microbiology and Infection* 2000; 6: 570-572.

Evangelista AT, Truant AL. Rapid systems and instruments for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. In Truant A.L. (eds): *Manual of commercial methods in medical microbiology*. Washington (DC): American Society of Microbiology, 2002. pp. 413-429.

Fernández-Canigia L, Cejas D, Gutkind G, Radice M. Detection and genetic characterization of β -lactamases in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from oral cavity infections and peritonsillar abscesses. *Anaerobe*. 2015; 33:8-13.

Ferraro M.J. Should we reevaluate antibiotic breakpoints? *Clin Infect Dis* 2001; (33) pp. S227-S229

Ferreira LQ, Avelar KE, Vieira JM, de Paula GR, Colombo AP, Domingues RM, *et al*. Association between the *cfxA* gene and transposon Tn4555 in *Bacteroides distasonis* strains and other *Bacteroides* species. *Curr Microbiol*. 2007 May;54(5):348-53.

Fosse T, Madinier I, Hannoun L, Giraud-Morin C, Hitzig C, Charbit Y, *et al*. High prevalence of *cfxA* β -lactamase in aminopenicillin-resistant *Prevotella* strains isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17: 85–88.

Giraud-Morin C1, Madinier I, Fosse T. Sequence analysis of *cfxA2*-like beta-lactamases in *Prevotella* species. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51:1293-6.

Gharbia S. E., Haapasalo M., Shah H. N., Kotiranta A., Lounatmaa K., Pearce M. A., et al. (1994). Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol.* 65, 56–61.

Gomes BP, Jacinto RC, Montagner F, Sousa EL, Ferraz CC. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod.* 2011; 37(8):1058-62.

Gould IM, MacKenzie FM, Struelens MJ, van der Meer JM. Towards a European strategy for controlling antibiotic resistance Nijmegen, Holland August 29–31, 1999. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6:670–4

Granizo JJ, Jiménez MJ, Bascones A, Aguilar L. Impacto ecológico del tratamiento antibiótico de las infecciones odontológicas. *Rev Esp Quimioterap* 2006;19(1):14-20

Grenier, D, Turgeron J. Occurrence and identity of proteolytic bacteria in adult periodontitis. *J. Periodontol.* 1994; 29: 365 – 370.

Gutiérrez JL, Perea EJ, Romero MM, Girón JA. Infecciones orofaciales de origen odontogénico. *Med Oral* 2004; 9:280-7.

Handal, et al. Chromosome- and plasmid-encoded β -lactamases in *Capnocytophaga* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:3940-3

Herrera D, Van Winkelhoff AJ, DelleMijn-Kippuw N, Winkel EG, Sanz M. Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and the Netherlands. *J Clin Periodontol* 2000; 27:520-5.

Holland TL, Woods CW, Joyce M. Antibacterial Susceptibility Testing in the Clinical Laboratory. *Infect Dis Clin N Am* .2009 (23) 757–790

Hong B. Y., Furtado Araujo M. V., Strausbaugh L. D., Terzi E., Ioannidou E., Diaz P. I. (2015). Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics. *PLoS ONE*10:e0127077. 10.1371/journal.pone.0127077

Ioannidis I, Sakellari D, Spala A, Arsenakis M, Konstantinidis, A. Prevalence of tetM, tetQ, nim and bla_{TEM} genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *Journal of clinical periodontology*. 2009; 36(7): 569-574.

Iwahara K., Kuriyama T, Shimura S, Williams D. W, Yanagisawa M, Nakagawa K, *et al*. 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*. 2006; 44(1): 172-176.

Jaramillo A, Arce RM, Herrera D, Betancourth M, Botero JE, Contreras A, Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses, *J Clin Periodontol* 2005; 32: 1213-1218.

Jaramillo A, Betancourth M, Mayorga-Fayad I, Castillo DM, Aya MR, Lafaurie GI, *et al*. Perfiles antimicrobianos de bacterias subgingivales en pacientes con periodontitis en Colombia. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 1, 61-65.

Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 1998; 26: pp. 973-980

Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In Murray P.R., Baron E.J., and Jorgensen J.H. (eds): *Manual of clinical microbiology*, 9th edition. Washington (DC): American Society for Microbiology, 2007. pp. 1152-1172.

Kamma J. J., Nakou M., Gmur R., Baehni P. C. (2004). Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.* 19, 314–321.

Kim SM, Kim HC, Lee SW. Characterization of antibiotic resistance determinants in oral biofilms. *The Journal of Microbiology*, 49(4), 595-602.

Koukos G, Konstantinidis A, Tsalikis L, Arsenakis M, Slini T, Sakellari D. Prevalence of β -lactam (bla_{TEM}) and Metronidazole (nim) Resistance Genes in the Oral Cavity of Greek Subjects. *Open Dent J*. 2016; 10: 89–98.

Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res*. 2014 May;93(5):445-51.

Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, *et al.* Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 285–288

Lacroix, JM, Walker CB. Detection and incidence of the tetracycline resistance determinant tet(M) in the microflora associated with adult periodontitis. *J Periodontol.* 1995 Feb;66(2):102-8.

Lacroix, JM, Walker CB. Detection and prevalence of the tetracycline resistance determinant TetQ in the microbiota associated with adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1996 Aug;11(4):282-8.

Langfeldt D, Neulinger SC, Heuer W, Staufenbiel I, Künzel S, Baines JF, *et al.* Composition of Microbial Oral Biofilms during Maturation in Young Healthy Adults. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e87449

Lie M. A., van der Weijden G. A., Timmerman M. F., Loos B. G., van Steenberghe T. J., van der Velden U. (2001). Occurrence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in relation to gingivitis and gingival health. *J. Clin. Periodontol.* 28, 189–193.

Liebana. *Microbiologia oral.* 2002

Liñares J, Martín-Herrero JE. Bases farmaco-microbiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Av Periodon Implantol.* 2003; 15,3:139-147.

López N, Socransky S, Da Silva I, Japlit M, Haffajee A. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology.* Sep2006, Vol. 33 Issue 9, p648-660

Madinier I, Fosse T, Giudicelli J, Labia R. Cloning and biochemical characterization of a class A β -lactamase from *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:2386-9.

Malbrán Carlos G. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución MIC testing. *CLSI-Servicio antimicrobiano INEI* 2012; 32(2)

Maestre-Vera JR. Opciones terapéuticas en la infección de origen odontogénico. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004 9: 19–31.

Matesanz P, Figuero E, Giménez MJ, Aguilar L, Llor C, Prieto J, *et al.* Del conocimiento de la etiología bacteriana al tratamiento y la prevención de las infecciones más prevalentes en la comunidad: las infecciones odontogénicas. *Rev Esp Quimioterap* 2005;18(2):136-145.

Mättö J, Asikainen S, Väisänen ML, Von Troil-Lindén B, Könönen E, Saarela M, *et al.* Beta-lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Oct;43(10):2383-8.

Moraes LC, Só MV, Dal Pizzol Tda S, Ferreira MB, Montagner F. Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different oral environments: a systematic review. *J Endod.* 2015 Apr;41(4):434-41.

Oberoi SS, Dhingra C, Sharma G, Sardana D. Antibiotics in dental practice: how justified are we. *Int Dent J.* 2015 Feb;65(1):4-10

Okamoto M, Takano K, Maeda N. Distribution of the tetracycline resistance determinant tetQ gene in oral isolates of black-pigmented anaerobes in Japan. *Oral microbiology and Immunology.* 2001; 16(4): 224-228.

Parker AC y Smith CJ. Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A beta lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. *Antimicrobial Agents Chemother* 1993; 37:1028-36.

Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. Wayne (PA): CLSI, 2008.

Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immun.* 2009;1(2):70-87.

Reig M, Galan JC, Fernando Baquero F, Perez JC. Macrolide Resistance in *Peptostreptococcus* spp. Mediated by ermTR: Possible Source of Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B

Resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* . 2001 Feb; 45 (2): 630 - 632.

Reller LB, Schoenknecht FD, Kenny MA, Sherris JC. Antibiotic Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa*: Selection of a Control Strain and Criteria for Magnesium and Calcium Content in Media. *J Infect Dis*. 1974 Nov;130(5):454-63.

Reyssset G. Genetics of 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* species. *Anaerobe*. 1996 Apr;2(2):59-69.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. *Anaerobe*. 2012 Dec;18(6):576-80.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Detection of antibiotic resistance genes in samples from acute and chronic endodontic infections and after treatment. *Arch Oral Biol*. 2013 Sep;58(9):1123-8.

Rodríguez-Alonso E, Rodríguez-Monje MT. Tratamiento antibiótico de la infección odontogénica. *IT del Sist Nacional de Salud*. 2009;33(3).

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 Feb 25;16:122.

Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae*. Considerations for diagnosis, preventions and drug treatment. *Drugs*. 2003; 63(4): 353-365.

Segura-Egea JJ, Velasco-Ortega E, Torres-Lagares D, Velasco-Ponferrada MC, Monsalve-Guil L, Llamas-Carreras JM. Pattern of antibiotic prescription in the management of endodontic infections amongst Spanish oral surgeons. *Int Endod J*. 2010 Apr;43(4):342-50.

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

Slots, J, Taubma, M. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. 1992:1ed.St. Louis USA. Editorial Mosby.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C and Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998; 25:134–144.

Tafur JD, Torres JD, Villegas V. Mechanisms of antibiotic Resistance in Gram negative bacteria. Centro Internacional de Investigaciones Médicas, CIDEIM. Cali, Colombia. 2008; 12(3)

Teanpaisan R., Douglas C. W., Walsh T. F. (1995). Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. *J. Periodont. Res.* 30, 245–251.

Tenover FC. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 418-423

Valenzuela MT, de Quadros C. Antibiotic resistance in Latin America: a cause for alarm. *Vaccine* 2009; 27 (suppl 3): C25-C28.

Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005; 32:893-898.

Van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Barendregt D, Dellelijn-Kippuw, Stijne A, Van der Velden U. Beta-lactamase producing bacteria in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1997;538-43.

Veloo AC, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility profiles of anaerobic pathogens in The Netherlands. *Anaerobe*. 2015; 31:19-24.

Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Cap. 35, pág, 649-662. Disponible online en: (<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>)

Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal pathogens. *Periodontol* 2000. 1996; 10:79-88.

Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A., et al: Evaluation of a new E test for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40: pp. 2755-2759

Xie Y, Chen J, He J, Miao X, Xu M, Wu X, *et al.* Antimicrobial Resistance and Prevalence of Resistance Genes of Obligate Anaerobes Isolated From Periodontal Abscesses. *J Periodontol.* 2014; 85(2): 327-334

Zambon J. J., Reynolds H. S., Slots J. (1981). Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infect. Immun.* 32, 198–203.

**XI ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS ACIN
2018**

infectio
REVISTA DE LA ASOCIACIÓN
COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA



Volumen 22. (S1). Agosto de 2018

Resúmenes XI Encuentro de Investigación en Enfermedades Infecciosas



ISSN: 0123-9392

Conclusiones. Es probable que la evolución de la resistencia a macrólidos y tetraciclinas dentro del clon COL923 se haya generado por la adquisición diferencial y co-integración de plásmidos. COLCIENCIAS 1308-65741107.

235. Conocimientos acerca del uso de antibióticos en prácticas ganaderas de los municipios de Arbeláez, Fusagasugá, Pasca y Silvania, Cundinamarca.

Arenas N, Guzmán I, Zambrano J, Torres J,
Universidad de Cundinamarca. nelson.arenas@gmail.com

Introducción. En Colombia, la producción lechera presenta una vocación a pequeña y mediana escala que no se adhiere a las restricciones operativas y sanitarias vigentes. Dicha situación, junto con la mala administración de antibióticos podría generar la aparición de cepas multiresistentes. Nuestro objetivo fue evaluar el conocimiento sobre la administración de antibióticos en productores ganaderos de Arbeláez, Fusagasugá, Pasca y Silvania.

Materiales y métodos. Se realizó una encuesta estructurada acerca del uso de antibióticos a 100 productores ganaderos tomados al azar en 4 municipios de Cundinamarca. En dichas áreas, se tomaron muestras de leche cruda en las rutas de recolección y distribución para cultivo bacteriano, identificación fenotípica de especie y pruebas de susceptibilidad por el método de difusión de disco. El análisis estadístico se realizó en el programa Epi-Info 7.2.

Resultados. En la encuesta, el 72% de los ganaderos reporta que sólo usan antibióticos para tratar enfermedades. 46% suministraron antibióticos por recomendación particular, 24% por una experiencia exitosa previa y 20% por calidad del producto. 56% de los productores nunca han solicitado asistencia técnica, 33% considera costoso el servicio veterinario y 22% presentan barreras geográficas. En las rutas recolectoras de leche, se identificó *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus Beta hemolítico*. *E. coli* presentó resistencia a cuatro antibióticos; mientras, la cepa de *S. agalactiae* fue resistente a ocho antibióticos.

Conclusiones. Se estableció un escaso conocimiento en la administración de antibióticos en ganaderos del Sumapaz y la circulación de patógenos multiresistentes a antibióticos en la leche cruda y que constituyen un riesgo para la salud animal y humana.

236. Diseño y evaluación de una máquina de inteligencia artificial para la predicción de péptidos antimicrobianos a partir de secuencias de proteínas.

Correa A, Vélez A., Quintero-Gil C, Mera C, Orduz S.
Grupo Biología Funcional, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Instituto Tecnológico Metropolitano. alcorrea@unal.edu.co

Introducción. La búsqueda y diseño de nuevos péptidos antimicrobianos (PAMs) incluye métodos costosos tanto en tiempo como en dinero. Las máquinas de aprendizaje automático (MAA) son una alternativa para la predicción de PAMs. Por tanto, nos propusimos construir MAA para clasificar y predecir PAMs con la identificación de patrones comunes dentro de un conjunto de secuencias peptídicas.

Materiales y métodos. Se construyó una base de datos a partir de un conjunto positivo de 604 péptidos provenientes de invertebrados con actividad antimicrobiana y un conjunto negativo de 1059 péptidos sin actividad. Se realizó un proceso automático de extracción de características calculando propiedades fisicoquímicas y descriptores moleculares de cada secuencia. Para la predicción, se entrenaron cuatro algoritmos, Random Forest (RF), Naïve Bayes, Máquina de Vectores de Soporte (MVS) y una Red Neuronal (RN), y se evaluó el rendimiento de las MAA utilizando un conjunto de 25 péptidos de prueba evaluados *in vitro* y activos contra *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* para comparar con los resultados de predicción.

Resultados. Los modelos de predicción obtenidos con los algoritmos RF, Naïve Bayes y RN lograron predecir PAMs que tienen una actividad antimicrobiana *in vitro* en concentraciones menores a 25 µM con una precisión del 95%.

Conclusiones. Tres de los algoritmos de aprendizaje utilizados logran determinar si una secuencia peptídica es candidata a ser un PAM. Estos algoritmos identifican patrones comunes entre el conjunto de PAMs, teniendo en cuenta su composición y la auto-correlación con residuos dentro de las secuencias.

237. Detección de la susceptibilidad antibiótica en aislamientos orales de *Prevotella nigrescens*.

Castillo Y, Montaña A, Cardenas E, Delgadillo N, Lafaurie GI, Castillo DM,
Instituto UIBO-Unidad de Investigación Básica Oral; Facultad de Odontología; Universidad El Bosque. castilloyormaris@unbosque.edu.co

Introducción. El género *Prevotella* pertenece a la microbiota oral normal. Sin embargo, son aislados de infecciones polimicrobianas, que se manejan frecuentemente con tratamiento mecánico. En pacientes con riesgo sistémico, es necesario un tratamiento antibiótico adicional. *Prevotella nigrescens* es muy

importante 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. El propósito de estudio fue determinar la susceptibilidad a Amoxicilina, Tetraciclina, Doxiciclina en aislamientos orales de *Prevotella nigrescens*.

Materiales y métodos. Estudio experimental *in vitro*. Se evaluaron aislamientos orales de *P. nigrescens* previamente confirmados por PCR. Se determinó la resistencia antibiótica, mediante el método de dilución en agar sobre placas de agar brucella suplementado con hemina, menadiona y sangre de cordero, además de concentraciones de antibióticos desde 0.25µg/mL hasta 64µg/mL. Como control positivo se usó *Bacteroides fragilis* ATCC 25285. La interpretación de los resultados de la actividad *in vitro* de los antibióticos se realizó según los puntos de corte reportados por el CLSI. Se realizó análisis descriptivo de los datos.

Resultados. *Prevotella nigrescens* presentó resistencia antibiótica con el 88% de 26 aislamientos evaluados resistentes a amoxicilina, 19% de 31 aislamientos fueron resistentes para tetraciclina, 32% de los 25 aislamientos evaluados fueron resistentes para doxiciclina.

Conclusiones. los aislamientos clínicos orales de *P. nigrescens* presentan alta resistencia antibiótica a la amoxicilina, antibiótico de primera elección para infecciones de origen odontogénico.

PARASITOLOGÍA

238. Detección y localización de un candidato a NADK en *Plasmodium falciparum*.

Guasca L, Ramirez M,
Universidad Nacional de Colombia. lkguascap@unal.edu.co

Introducción. La NAD quinasa (NADK) es una enzima importante en el metabolismo redox a nivel celular y se ha propuesto como un blanco importante para la supervivencia de algunos patógenos. Sin embargo en *P. falciparum* esta enzima aún no ha sido caracterizada generándose muchos interrogantes sobre la presencia de su producto el NADP⁺ en el parásito y en diversas vías metabólicas que lo emplean como sustrato. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar un candidato de la enzima en *P. falciparum* con la producción de anticuerpos policlonales que permitan su detección en extractos proteicos y su localización a nivel subcelular en el protozoo.

Materiales y métodos. La caracterización *in vivo* del candidato PfNADK se realizó con la producción de anticuerpos policlonales en modelos aviares (IgY) y murinos (IgG). Inicialmente se obtuvo como antígeno proteína recombinante del candidato, purificada a partir de cuerpos de inclusión. Las inoculaciones en ambos modelos se realizaron por un periodo de cuatro semanas. Se caracterizaron los anticuerpos producidos en el suero de ambos modelos evaluando factores como cantidad mínima de antígeno reconocido y diferentes concentraciones de los anticuerpos.

Resultados. Una vez caracterizados se emplearon para reconocer la proteína candidato por ensayos de inmunodetección sobre proteínas totales del *P. falciparum* y determinar una posible localización subcelular en extractos del parásito por inmunofluorescencia

Conclusiones. Los resultados obtenidos permitieron identificar una proteína citoplasmática de 76kDa lo cual coincide con los análisis bioinformáticos anteriormente predichos, determinándose por primera vez la presencia de una posible enzima NADK en este patógeno.

239. Estandarización de una prueba de RT-qPCR para cuantificar la expresión del marcador de agotamiento celular PD-1 en PBMCs humanos.

García-López L, Cardona N, Vargas-Montes M, Osorio-Méndez F,
Rincón-Andrade M, Gómez-Marín J,
Universidad del Quindío. lauralorenagar@hotmail.com

Introducción. El receptor de muerte programada 1 (PD-1) se expresa en la superficie de diversas células del sistema inmune y su activación lleva a la disfuncionalidad y muerte por apoptosis; fenómeno denominado agotamiento celular. La sobreexpresión de PD-1 se ha descrito como un factor importante en la reactivación de enfermedades crónicas, incluyendo la toxoplasmosis en el ratón. El objetivo de este trabajo es estandarizar un ensayo de RT-qPCR para cuantificar la expresión de PD-1 en PBMCs humanas.

Materiales y métodos. Se aislaron PBMCs de sangre y, a partir de ellas, RNA total. Para eliminar el DNA genómico, las reacciones se trataron con DNAasa I. Con el RNA obtenido se realizaron extracciones de RT-qPCR de un