



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Genètica i Microbiologia
Facultat de Biociències



Department of Microbiology

Prevalencia y caracterización de genes de resistencia a antibióticos en bacterias orales

Alexandre Arredondo Campaña

Tesis Doctoral

2020

Directores: Dr. Rubén Alberto León Berrios y Dra. Vanessa Blanc Pociello

Tutora: Dra. Montserrat Llagostera Casas



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Genètica i Microbiologia
Facultat de Biociències



Department of Microbiology

Prevalencia y caracterización de genes de resistencia a antibióticos en bacterias orales

Tesis doctoral presentada por Alexandre Arredondo Campaña para optar al Grado de Doctor en el programa de Doctorado en Microbiología por la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Con el visto bueno de los directores de la Tesis Doctoral,

Dr. Rubén Alberto León Berrios

Dra. Vanessa Blanc Pociello

A qui ho llegeixi

*I jumped in the river, what did I see?
Black-eyed angels swam with me
A moon full of stars and astral cars
And all the figures I used to see*

*All my lovers were there with me
All my past and futures
And we all went to heaven in a little row boat
There was nothing to fear and nothing to doubt*

Radiohead – Pyramid Song

Agradecimientos

Escriuré aquesta part en català ja que és un escrit que ha de sortir del cor, i aquesta és la llengua que em surt del cor.

En primer lloc gràcies **Rubén** i **Vanessa** per confiar en mi. No se què va veure en mi o què us va fer pensar que era una bona idea que fes el doctorat amb vosaltres més enllà de les ganes que jo en tenia, però fos el que fos us n'estic molt agraït per la oportunitat i per tot el que m'heu ensenyat i que no hagués après de cap altra manera. No tot el que he après amb vosaltres ha sigut a través dels articles o a través del laboratori, i de nou us ho torno a agraïr.

A l'**Enric Masdevall**, que sense tenir cap necessitat va accedir a que fes la tesis a la seva empresa i va posar tots els mitjans necessaris per a que aquesta és duigués a terme, també li estic profundament agraït. Espero que aquesta tesis el faci sentir orgullós del primer doctorat que surt del Dentaid Research Center.

A tots els meus companys de departament (i us posaré per ordre alfabètic segons el cognom): **Gerard**, que tant m'has ensenyat. Has sigut el meu referent al laboratori i sempre has tingut la paciència per perdre els minuts i les hores necessàries per explicar-me tot allò que em fes falta per avançar. També has perdut minuts i hores esbrancant-me per deixar una caixa de puntes aquí o allà, o dient-me que reculli la cabina de PCR, etc. Ets un rondinaire sense remei, però penso de veritat que tens un cor enorme. **Manuel**, l'última incorporació a aquesta casa de bojós i, efectivament, encaixes perfectament. Gràcies per les teves revisions i suport moral, crec que ens queden molts moments divertits per endavant! **Marta**, si no recordo malament vas ser la primera persona que vaig tenir a sobre quan vaig començar a fer PCRs i també em vas ensenyar un bon grapat de coses quan era un inútil total. Moltes gràcies també per aguantar amb estocisme les meves tonteries, que tots sabem que no són poques. **Rubén**, que vaig estar amb tu un parell de mesos abans de començar a fer la meva tesina i em vas ensenyar les bases del laboratori. Ara amb perspectiva puc afirmar rotundament que em va ajudar molt a no tenir por d'agafar el toro per les banyes a l'hora de fer la feina, fos la que fos i encara que suposés quedar-me fins les tantes fent medis. **Sergio**, a ti te escribo en castellano porqué no me sale en catalán, aunque no por ello saldrá menos del corazón ¡Viva Binéfar! Aunque mis primeros recuerdos contigo consisten básicamente en un intento tuyo por sabotear mi dignidad como becario *amateur*, te sigo guardando algo (no mucho) de cariño ¡Acuérdate de apagar el gas! **Rosa**, la penúltima incorporació del laboratori i la més joveneta del grup. Companya en l'aventura vegana/vegetariana, vals més del que segurament et penses, falta que t'ho creguis una mica més! **Agnès** ... qualsevol cosa que posi per escrit es quedarà curta,

per tant millor no estendre'ns en un exercici inútil. Només cal dir que en tu he conegut a la germana que mai he tingut.

Als meus companys d'altres departaments: **Pablo, Dani, Encarni, Marian, Esters, Mireia i Sandra** gràcies per haver sigut sempre tant amables amb mi i demostrar-me sempre tant d'afecte tot i les meves moltes tonteries i tocadetes de nassos constants. A la **Carol, la Sandre, Meri i l'Alberto**, moltes gràcies també per deixar-me la porta del vostre laboratori oberta i per ajudar-me sempre que ho he necessitat.

Als meus **amics: Lidia, David, Xavi, Pablo, Núria, Nàdia, Patri, Isma, Bea, Marc, Marta, Alba i Fran**, que han fet aquests anys més fàcils ajudant a distreure la ment. A tots vosaltres que sempre heu estat allà oferint consell i consol quan ha sigut necessari i que sens dubte sempre heu volgut el millor per mi. Sempre que us he necessitat hi heu estat, i espero estar com a mínim a la mateixa alçada sempre que em necessiteu.

A tu, **Tania**, per tots els anys que hem passat junts mentre feia aquesta tesis. Et desitjo tota la felicitat del món i la millor de les sorts, i no puc si no agrair-te que confessis en mi i m'empenyessis per fer el salt per iniciar aquest projecte.

I finalment a me **Mare**, que no li dic prou quant l'estimo ni li dono suficientment les gràcies per tot el que fa per mi dia rere dia. Suposo que tots els fills pequem d'això (o almenys això vull creure com a disculpa), i tot i que un agraïment en una tesis doctoral no és suficient per paliar lo anterior, almenys cada cop que no li digui prou o m'ho tiri en cara li podré dir "però mama, que ja t'ho vaig dir als agraïments de la tesis!".

Índice

1. Introducción general	1
1.1 Biofilm oral	3
1.1.1 Formación del biofilm oral	4
1.1.2 Propiedades del biofilm oral	9
1.1.3 Patologías causadas por el biofilm oral	10
1.2 Tetraciclinas	15
1.2.1 Clasificación	17
1.2.2 Estructura química	18
1.2.3 Mecanismo de acción	19
1.2.4 Usos de las tetraciclinas	20
1.2.5 Resistencia a tetraciclinas	23
1.3 β -lactámicos	26
1.3.1 Clasificación	29
1.3.2 Estructura química	30
1.3.3 Mecanismo de acción	31
1.3.4 Usos de los β -lactámicos	33
1.3.5 Resistencias a β -lactámicos	34
1.4 Macrólidos	37
1.4.1 Clasificación	38
1.4.2 Estructura química	38
1.4.3 Mecanismo de acción	39
1.4.4 Usos de los macrólidos	40
1.4.5 Resistencia a macrólidos	42
2. Objetivos	45
3. Capítulo 1. Genes de resistencia a antibióticos en la microbiota aislada de muestras subgingivales de sujetos sanos	49
3.1 Resumen	51
3.2 Introducción	52
3.3 Material y Métodos	53
3.3.1 Población sujeta a estudio	53
3.3.2 Toma de muestra subgingival y cultivo bacteriano	54
3.3.3 Extracción de DNA y secuenciación	54
3.3.4 Análisis <i>in vitro</i> de resistencia a antibióticos	56
3.3.5 Detección de genes de resistencia a antibióticos	57
3.4 Resultados	57
3.5 Discusión	61

4. Capítulo 2. Genes de resistencia a antibióticos en la microbiota aislada de muestras subgingivales de pacientes con periodontitis crónica	65
4.1 Resumen	67
4.2 Introducción	68
4.3 Material y métodos	69
4.3.1 Población sujeta a estudio	69
4.3.2 Toma de muestra subgingival y cultivo bacteriano	69
4.3.3 Extracción de DNA y secuenciación	69
4.3.4 Análisis de resistencia a antibióticos <i>in vitro</i>	69
4.3.5 Detección de genes de resistencia a antibióticos	70
4.4 Resultados	70
4.5 Discusión	74
5. Capítulo 3. Comparación de bacterias resistentes a tetraciclina aisladas de individuos sanos y de individuos con periodontitis crónica	77
5.1 Resumen	79
5.2 Introducción	80
5.3 Material y métodos	81
5.3.1 Población sujeta a estudio, toma de muestras subgingivales, cultivo bacteriano y métodos moleculares	81
5.3.2 Análisis estadístico	81
5.4 Resultados	82
5.5 Discusión	86
6. Capítulo 4. Detección y análisis de la expresión de <i>tet(B)</i> en <i>Streptococcus oralis</i>	93
6.1 Resumen	95
6.2 Introducción	96
6.3 Material y métodos	98
6.3.1 Obtención de los aislados y condiciones de cultivo	98
6.3.2 Detección de <i>tet(B)</i> e identificación de especies	98
6.3.3 Secuenciación	99
6.3.4 Extracción de RNA y expresión de <i>tet(B)</i>	100
6.3.5 Construcción de mutantes defectivos para <i>tet(M)</i>	101
6.3.6 Test de susceptibilidad antibiótica	102
6.4 Resultados	102
6.4.1 Secuencias de los genes <i>tet(B)</i> y 16S rRNA	102
6.4.2 Expresión de <i>tet(B)</i>	103

6.4.3 Susceptibilidad a tetraciclina	105
6.5 Discusión	105
7. Capítulo 5. Susceptibilidad a Azitromicina y a Eritromicina y genes de resistencia a macrólidos en aislados del género <i>Prevotella</i> de pacientes con periodontitis	109
7.1 Resumen	111
7.2 Introducción	112
7.3 Material y métodos	114
7.3.1 Población sujeta a estudio, toma de muestra subgingival y cultivo bacteriano	114
7.3.2 Extracción de DNA, Secuenciación del gen 16S rRNA y <i>screening</i> de genes de resistencia a macrólidos	114
7.3.3 Test de susceptibilidad antibiótica	115
7.3.4 Análisis estadístico	116
7.4 Resultados	116
7.5 Discusión	120
8. Capítulo 6. Prevalencia de bacterias resistentes a β -lactámicos aisladas de pacientes con periodontitis	125
8.1 Resumen	127
8.2 Introducción	128
8.3 Material y métodos	129
8.3.1 Población sujeta a estudio, muestreo de bacterias subgingivales y cultivo bacteriano	129
8.3.2 Extracción de DNA y secuenciación	130
8.3.3 Detección de genes β -lactamasas	130
8.3.4 Análisis de resistencia a antibióticos <i>in vitro</i>	131
8.3.5 Análisis estadístico	132
8.4 Resultados	132
8.5 Discusión	146
9. Discusión general	151
10. Conclusiones	163
11. Bibliografía	167
12. Anexos	195

Glosario

AMX	Amoxicilina
ARIA	Amoxicillin Resistant Isolates in Anaerobiosis
ARIM	Amoxicillin Resistant Isolates in Microaerophilia
ATP	Adenosin trifosfato
AZM	Azitromicina
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
cDNA	DNA complementario
CHL	Cloramfenicol
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CRIA	Cefotaxime Resistant Isolates in Anaerobiosis
CRIM	Cefotaxime Resistant Isolates in Microaerophilia
CTX	Cefotaxima
DNA	Desoxiribonucleic acid
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERY	Eritromicina
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
KAN	Kanamicina
MSPP	Muestra subgingival de paciente con periodontitis
MSSS	Muestra subgingival de sujeto sano
MZ	Metronidazol
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBP	Penicillin Binding Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial de Hidrógeno
PPR	Proteína de Protección Ribosomal
RAR	Raspado y Alisado Radicular
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	RNA ribosomal
tRNA	RNA de transferencia
RTF	Reduced Transport Fluid
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative PCR
STR	Streptomycin
TAE	Tris-Acetate-EDTA buffer
TEM	Transmission Electron Microscopy
TET	Tetraciclina
UFC	Unidad Formadora de Colonia
VIH	Virus Inmunodeficiencia Humana

Índice de figuras

Figura 1. Micrografía de la película adquirida	5
Figura 2. Interacciones que se dan entre bacterias orales	5
Figura 3. Representación esquemática del biofilm oral	6
Figura 4. Complejos de Socransky y Haffajje	7
Figura 5. Fases de crecimiento de los biofilms	8
Figura 6. Efecto <i>in vitro</i> de los antibióticos en biofilms bacterianos	10
Figura 7. Repercusión de la ingesta de comidas sobre el pH de la saliva	11
Figura 8. Tetraciclinas mencionadas en la introducción	18
Figura 9. Interacción de la tetraciclina con la subunidad 30S ribosomal	20
Figura 10. Esquema de la bomba de flujo TetA(B)	24
Figura 11. Mecanismo de acción de las proteínas de protección ribosomal	25
Figura 12. β -lactámicos mencionados en la introducción	31
Figura 13. Síntesis de peptidoglucano en una bacteria gramnegativa	32
Figura 14. Macrólidos mencionados en la introducción	39
Figura 15. Morfologías bacterianas en una placa de agar sangre con tetraciclina	58
Figura 16. Gel de agarosa al 2% de una PCR multiplex del grupo 1	59
Figura 17. Prevalencia de genes de resistencia y de resistencias fenotípicas	59
Figura 18. Prevalencia de genes de resistencia y de resistencias fenotípicas	71
Figura 19. Prevalencia de genes de resistencia y de resistencias fenotípicas	83
Figura 20. Gel de agarosa al 2% para comprobar la integridad de RNA	104
Figura 21. Curvas de amplificación de los genes 16S rRNA y <i>tet</i> (B)	104

Summary
Resum
Resumen

Summary

The oral cavity is a widely colonised environment by bacteria, which grow in a biofilm, a multispecies structure that confers many beneficial properties to the bacteria that form it. Some of these benefits are a higher tolerance to chemical and mechanical stress, and a higher communication and exchange of genetic material between microorganisms. The growth of the biofilm, until the establishment of oral pathogens, may lead to diseases such as caries, gingivitis or periodontitis. The use of antibiotics may be indicated as an adjuvant for the treatment of periodontal disease. These treatments might fail if resistance to the antibiotics administered are present. The indiscriminate use of antibiotics has led to an increase of resistance and to the emergence of multidrug resistance bacteria, creating a growing issue in modern medicine. Some international organizations have underlined the importance of surveillance of antibiotic resistance and their causes as an essential measure to avoid its propagation. Moreover, they have required the making of strategic guidelines to fight them. In this Thesis, we studied the resistance of the oral microbiota to three of the main classes of antibiotics used in the dental practice: tetracyclines, macrolides and β -lactams.

In this Thesis we worked with the subgingival samples of 129 individuals with good oral health and with 130 patients with periodontitis. From these samples, we extracted the microbiota resistant to tetracycline, amoxicillin and cefotaxime, and we studied the prevalence of genes capable of conferring resistance to these antibiotics. In the tetracycline resistant microbiota of both populations, we studied the prevalence of eleven *tet* genes: *tet*(M), *tet*(W), *tet*(Q), *tet*(O), *tet*(32), *tet*(31), *tet*(L), *tet*(S), *tet*(37), *tet*(B) y *tet*(K), and the multidrug resistance to six other antibiotics: amoxicillin, cefotaxime, kanamycin, erythromycin, streptomycin and chloramphenicol. We observed a high load of tetracycline resistant bacteria, a high prevalence of the different *tet* genes and high percentages of multidrug resistant isolates. Moreover, the results indicated a wide distribution of mobile genetic elements, which might be the carriers and propagators of

these genes. The comparison between healthy subjects and patients with periodontitis showed differences at the prevalence of the detected genes and the species that carried them, as well as with the multidrug resistance profiles. Through the analysis of the *tet* genes, we found many *tet* genes in some genera in which they had not been detected before. This was the case of *tet(B)* in two *Streptococcus oralis* isolates, from which we studied both its full sequence and its expression.

The microbiota resistant to β -lactams, the most used class of antibiotics in the dental practice, was studied in the samples obtained from patients with periodontitis through those isolates that grew on media with amoxicillin or cefotaxime. We found resistance to these antibiotics in most of the samples, together with genes that coded for β -lactamases and extended spectrum β -lactamases, as well as high percentages of multidrug resistance to the tested antibiotics.

The results of this Thesis indicate that antibiotic resistances are widely distributed among the subgingival microbiota of Spanish individuals. Moreover, the high prevalence of antibiotic resistance genes, seem to indicate that the mouth is a reservoir of such genes, with the ability to disseminate to other oral bacteria or even to other niches of the human body. The detection of resistances to the different classes of antibiotics might put in danger the future of the antibiotic therapy as an adjuvant of the periodontal treatment. These results highlight the need to establish an exhaustive surveillance of the evolution of antibiotic resistance of the oral microbiota, with the objective to establish the necessary strategies in order to stop their growing propagation.

Resum

La cavitat bucal és un ambient àmpliament colonitzat per bacteris, els quals creixen en forma de biofilm, una estructura multiespècie que confereix avantatges úniques als bacteris que hi creixen; com poden ser una major tolerància al estrès químic i mecànic i una major comunicació e intercanvi genètic entre els microorganismes. La maduració del biofilm oral fins a l'establiment de patògens, pot donar lloc a l'aparició de patologies com ara la càries, la gingivitis o la periodontitis. L'ús d'antibiòtics pot fer-se necessari com a tractament coadjuvant per a la correcta resolució de les patologies periodontal. Tanmateix, aquests tractaments podrien fracassar si existeixen resistències bacterianes als antibiòtics administrats. L'ús indiscriminat d'aquests

El seu ús indiscriminat ha portat a l'augment de les resistències i de l'aparició de bacteris multiresistents, fenòmens, tots dos, que han generat un problema creixent per a la medicina moderna. Diferents organismes internacionals han posat de manifest la importància de la monitorització de les resistències a antibiòtics i de les seves causes com a mesura essencial per evitar la seva propagació. A més, han sol·licitat l'elaboració de guies d'estratègia per combatre-les. En aquesta Tesi es va estudiar la resistència de la microbiota bucal a tres de les classes d'antibiòtics més utilitzades en la pràctica dental: tetraciclina, macròlids i β -lactàmics.

En aquesta Tesi Doctoral es va treballar amb les mostres subgingivals de 129 subjectes amb bona salut bucal i 130 pacients amb periodontitis. D'aquestes mostres es va extreure la microbiota resistent a tetraciclina, amoxicil·lina i cefotaxima i es va estudiar la prevalença de gens de resistència a aquests antibiòtics. En ambdues poblacions es va estudiar, en aquells microorganismes que van créixer en medi amb tetraciclina, la prevalença d'onze gens *tet*: *tet(M)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(O)*, *tet(32)*, *tet(31)*, *tet(I)*, *tet(S)*, *tet(37)*, *tet(B)* i *tet(K)*, i la multiresistència a sis antibiòtics: amoxicil·lina, cefotaxima, kanamicina, eritromicina, estreptomina i cloramfenicol. Es va observar una alta

càrrega de bacteris resistents a tetraciclina, una alta prevalença de diferents gens *tet* i elevats percentatges d'aïllats multiresistents. A més, es van trobar indicis d'una àmplia distribució d'elements genètics mòbils, els quals podrien ser els possibles portadors i disseminadors d'aquests gens. La comparació entre subjectes sans i amb periodontitis va evidenciar diferències en la prevalença dels gens detectats i de les espècies portadores, així com dels perfils de multiresistència. Mitjançant l'anàlisi de gens *tet* es va detectar per primera vegada la presència de certs gens en determinats gèneres bacterians. Aquest va ser el cas de *tet(B)* en dos aïllats de *Streptococcus oralis*. Aquest gen es va analitzar en profunditat, estudiant tant la seqüència completa de el gen, com la seva expressió.

La microbiota resistent a β -lactàmics, la classe d'antibiòtics més utilitzada en la pràctica dental, va ser estudiada en mostres de pacients amb periodontitis a partir dels aïllats que van créixer en medi amb amoxicil·lina o cefotaxima. Es va trobar resistència a aquests antibiòtics en la majoria de les mostres analitzades juntament amb gens que codifiquen per β -lactamases i β -lactamases d'espectre ampliat, així com elevats percentatges de multiresistència als antibiòtics testats.

Els resultats d'aquest estudi indiquen que les resistències a antibiòtics estan àmpliament distribuïdes entre la microbiota subgingival de individus espanyols. A més, l'elevada prevalença de gens de resistència sembla indicar que la boca és un reservori d'aquests gens amb capacitat per a disseminar-se a altres bacteris orals o fins i tot a altres nínxols del cos humà. La detecció de resistències a diferents classes d'antibiòtics podria posar en perill el futur de la teràpia antibiòtica com a coadjuvant de el tractament de la periodontitis. Aquests resultats posen de manifest la necessitat d'establir una monitorització exhaustiva de l'evolució de les resistències a antibiòtics en la microbiota oral, amb l'objectiu d'instaurar les estratègies necessàries per frenar la seva creixent disseminació.

Resumen

La cavidad bucal es un ambiente ampliamente colonizado por bacterias, las cuales crecen en forma de biofilm, una estructura multiespecie que confiere multitud de propiedades beneficiosas a las bacterias que lo conforman entre las que están una mayor tolerancia a estrés químico y mecánico y una mayor comunicación e intercambio genético entre los microorganismos. La maduración del biofilm oral hasta el establecimiento de patógenos orales, puede dar lugar a la aparición de patologías tales como la caries, la gingivitis o la periodontitis. El uso de antibióticos puede ser necesario como tratamiento coadyuvante para la correcta resolución de las patologías periodontales; tratamientos estos, que podrían fallar en caso de existir resistencias a los antibióticos administrados. Su uso indiscriminado ha llevado al aumento de las resistencias y a la aparición de bacterias multirresistentes, generando un problema creciente para la medicina moderna. Ciertos organismos internacionales han puesto de manifiesto la importancia de la monitorización de las resistencias a antibióticos y de sus causas como medida esencial para evitar su propagación. Además, han solicitado la elaboración de guías de estrategia para combatirlas. En esta Tesis se estudió la resistencia de la microbiota bucal a tres de las clases de antibióticos más utilizadas en la práctica dental: tetraciclinas, macrólidos y β -lactámicos.

En esta Tesis Doctoral se trabajó con las muestras subgingivales de 129 sujetos con buena salud bucal y 130 pacientes con periodontitis. De estas muestras se extrajo la microbiota resistente a tetraciclina, amoxicilina y cefotaxima y se estudió la prevalencia de genes de resistencia a dichos antibióticos. En ambas poblaciones se estudió, en aquellos microorganismos que crecieron en medio con tetraciclina, la prevalencia de once genes *tet*: *tet*(M), *tet*(W), *tet*(Q), *tet*(O), *tet*(32), *tet*(31), *tet*(L), *tet*(S), *tet*(37), *tet*(B) y *tet*(K), y la multirresistencia a otros seis antibióticos: amoxicilina, cefotaxima, kanamicina, eritromicina, estreptomina y cloramfenicol. Se observó una alta carga de bacterias resistentes a tetraciclina, una elevada prevalencia de distintos genes *tet* y

altos porcentajes de aislados multirresistentes. Además, se encontraron indicios de una amplia distribución de elementos genéticos móviles, los cuales podrían ser los posibles portadores y diseminadores de estos genes. La comparación entre sujetos sanos y con periodontitis arrojó diferencias a nivel de la prevalencia de los genes detectados y de las especies que los portaban, así como de los perfiles de multirresistencia. Mediante el análisis de genes *tet* se detectó por primera vez la presencia de ciertos genes en determinados géneros bacterianos. Este fue el caso de la detección de *tet(B)* en dos aislados de *Streptococcus oralis*, lo cual fue analizado en profundidad, estudiando tanto la secuencia completa del gen como su expresión.

La microbiota resistente a β -lactámicos, la clase de antibióticos más utilizada en la práctica dental, fue estudiada en muestras de pacientes con periodontitis a partir de los aislados que crecieron en medio con amoxicilina o cefotaxima. Se encontró resistencia a estos antibióticos en la mayoría de las muestras analizadas junto con genes que codifican para β -lactamasas y β -lactamasas de espectro extendido, así como altos porcentajes de multirresistencia a los antibióticos testados.

Los resultados del presente trabajo indican que las resistencias a antibióticos están ampliamente distribuidas entre la microbiota subgingival de sujetos españoles. Además, la elevada prevalencia de genes de resistencia parece indicar que la boca es un reservorio de dichos genes con capacidad para diseminarse a otras bacterias orales o incluso a otros nichos del cuerpo humano. La detección de resistencias a distintas clases de antibióticos podría poner en peligro el futuro de la terapia antibiótica como coadyuvante del tratamiento de la periodontitis. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de establecer una monitorización exhaustiva de la evolución de las resistencias a antibióticos en la microbiota oral, con el objetivo de instaurar las estrategias necesarias para frenar su creciente diseminación.

Introducción general

1. Introducción general

1.1 Biofilm oral

La cavidad bucal es un ambiente ampliamente colonizado por bacterias. La gran variedad de superficies, nutrientes y condiciones ambientales existentes permiten la presencia de distintos nichos ecológicos (mucosa oral, dorso lingual, amígdalas, dientes naturales o artificiales, etc.), lo cual, a su vez, propicia el establecimiento de un elevado número de especies bacterianas¹.

La microbiota humana, conjunto de microorganismos que colonizan distintos tejidos del cuerpo, suele vivir en una relación de mutualismo con su hospedador, obteniendo ambas partes beneficios de la relación². En el ambiente oral la microbiota está compuesta por un gran número de especies distintas. Análisis recientes han estimado una diversidad de aproximadamente 3.700 y 6.800 filotipos distintos en saliva y placa supragingival respectivamente. Sin embargo, hay estimaciones que sugieren que la diversidad total de la microbiota oral se podría situar alrededor de los 19.000 filotipos³. Dentro de esta diversidad, se ha descrito que en estado de salud bucal existe un “microbioma núcleo”, consistente en ciertas especies bacterianas que comúnmente están presentes en el ambiente oral cuando no hay enfermedad. Se ha determinado que los taxones predominantes en este núcleo corresponden a Firmicutes (géneros *Streptococcus* y *Granulicatella*), Proteobacterias (géneros *Neisseria* y *Haemophilus*), Actinobacterias (géneros *Corynebacterium*, *Rothia* y *Actinomyces*), Bacteroidetes (géneros *Prevotella*, *Capnocytophaga* y *Porphyromonas*) y Fusobacterias (*Fusobacterium*)². Estas especies crecen y coagregan en el ambiente oral formando una estructura llamada biofilm oral, el cual está compuesto por distintas capas de microorganismos que se agrupan conformando poblaciones bacterianas diferentes⁴. Este crecimiento en forma de biofilm otorga propiedades ventajosas tales como

protección frente al entorno, captación y metabolizado de nutrientes y eliminación de metabolitos dañinos⁵.

1.1.1 Formación del biofilm oral

El sustrato de adhesión del biofilm oral que crece sobre los dientes es una capa de proteínas y glucoproteínas que se adhiere al esmalte dental (Figura 1). Al menos 10 proteínas distintas han sido identificadas como iniciadoras de esta película adquirida, entre las que se encuentran histatinas, estaterinas, glucosiltransferasas, lisozima, cistatina y lactoferrina⁶. Estas proteínas se unen al esmalte debido a las interacciones electrostáticas que se generan entre la doble capa iónica de los iones de calcio y fosfato del esmalte y de los grupos con carga o cadenas laterales con carga de las proteínas⁶. La película adquirida funciona como blanco para la unión de las adhesinas de los colonizadores primarios, los cuales pertenecen principalmente a géneros como *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Veillonella* y *Campylobacter*, que se adhieren mediante adhesinas a ciertos epítomos proteicos de la película^{4,5,7}. Los fenómenos de coagregación bacteriana entre especies que componen el biofilm oral presentan elevada especificidad. Pese a la alta diversidad de especies bacterianas y de adhesinas que existen en el ambiente oral, se ha observado que hay una tendencia evolutiva a favorecer la adhesión y, por lo tanto, al establecimiento del biofilm^{8,9}. Los estreptococos y los actinomicetos además de coagregar entre sí, también pueden hacerlo con otros géneros bacterianos. Cuando se da esta situación, se crea un puente de coagregación en el que uno de los implicados presenta en su superficie mediadores de coagregación que pueden servir para más de un género o especie (Figura 2). Esta propiedad permite que bacterias que en un principio no pueden coagregar entre sí formen parte del mismo complejo⁹.

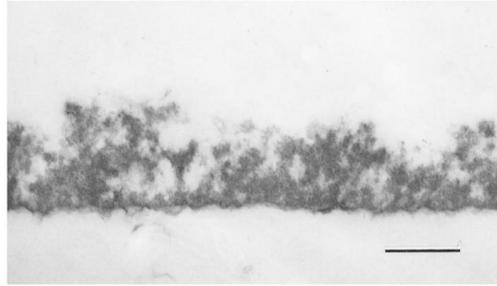


Figura 1. Micrografía captada por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la película adquirida tras 2 horas de su formación. Tamaño de la línea de referencia = 200 nm. Figura extraída de la referencia 6.

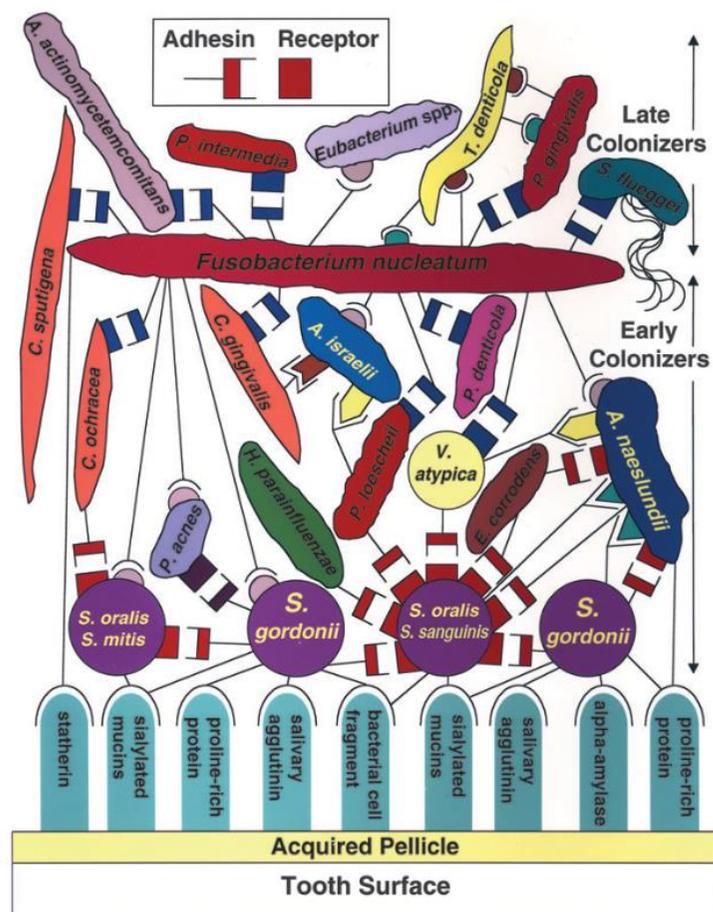


Figura 2. Representación esquemática de las interacciones que se dan entre bacterias orales y las proteínas de la película adquirida que se encuentra en la superficie dental. Figura extraída de la referencia 8.

En las 4 horas siguientes a una higiene oral profesional, entre un 47% y un 85% de la población bacteriana detectada corresponde a estreptococos¹⁰. A partir de las 12 horas se diversifica la población y se incluyen especies de los géneros *Capnocytophaga*, *Haemophilus*, *Veillonella* y *Prevotella*⁸. Uno de los pilares centrales para la diversidad del biofilm oral son las fusobacterias y las corinebacterias. Éstas aparecen a partir de las 12 y 24 horas del establecimiento del biofilm, respectivamente, y tienen un importante papel estructural, ejerciendo de puente entre los colonizadores tempranos y los tardíos. Los colonizadores tardíos no suelen coagregar con los colonizadores tempranos, pero sí que lo hacen con fusobacterias como *Fusobacterium nucleatum* y corinebacterias como *Corynebacterium matruchotti* (Figura 3)^{11,12}. Los colonizadores tardíos son en su mayoría bacterias gramnegativas anaerobias estrictas, que están asociadas a patologías orales. Las especies más relevantes corresponden, entre otros, a los géneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Campylobacter* y *Tannerella*^{5,13,14}.

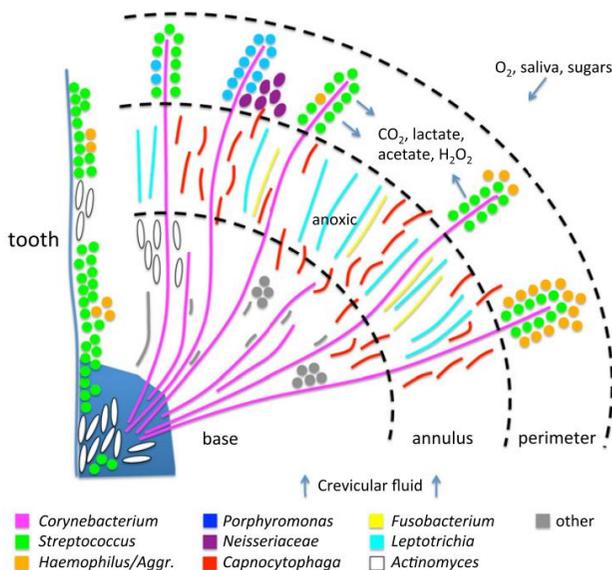


Figura 3. Representación esquemática de un biofilm en el que se muestra como las bacterias del género *Corynebacterium* (en morado) tienen un importante papel estructural (imagen extraída de la referencia 12).

Socransky y Haffajje¹³, a partir del análisis de 13.000 muestras subgingivales obtenidas de 185 sujetos adultos con distintas condiciones de salud bucal, postularon la existencia de 6 grupos de especies bacterianas relacionadas entre sí, a los que se les dotó de códigos de colores: 4 grupos básicos para el establecimiento del biofilm con códigos de colores: azul, morado, verde y amarillo; un grupo naranja encima de estos 4 grupos; y un grupo rojo encima del naranja (Figura 4). Los colores son indicativos de una progresión hacia la enfermedad periodontal, siendo los colores naranja y rojo los más relacionados con ésta. Este modelo piramidal ha sido ampliamente aceptado y supone una herramienta útil para entender la relación que mantienen las especies del biofilm oral con el nivel de salud periodontal.

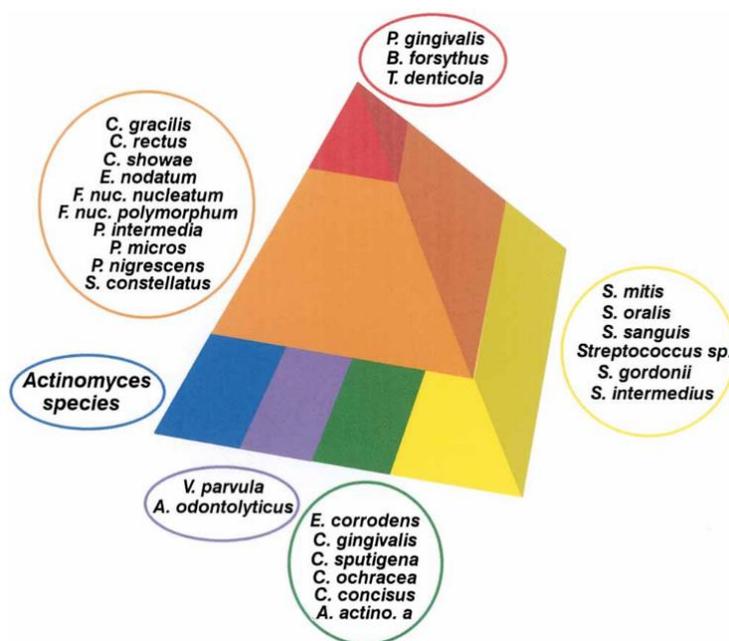


Figura 4. Complejos de Socransky y Haffajje. En la base de la pirámide se observan los 4 grupos de colonizadores primarios. Encima de estos colonizadores se asienta el complejo naranja y sobre este el rojo. La estructuración del biofilm suele seguir el orden mostrado en el esquema, aunque en menor medida se pueden dar casos en los que los complejos naranja o rojo asuman el rol de colonizadores primarios, o que el complejo rojo se establezca encima de los colonizadores primarios (imagen extraída de la referencia 5).

Las bacterias que componen el biofilm oral se encuentran rodeadas de una matriz extracelular secretada por ellas mismas y que está compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos y DNA extracelular¹⁵. La composición de la matriz varía entre individuos del mismo modo que lo hacen las poblaciones bacterianas que la producen¹⁶⁻¹⁸. Dicha composición, junto a factores ambientales, determina en gran parte la morfología del biofilm, pudiendo ser liso, rugoso, esponjoso o filamentosos¹⁵. Mediante la degradación mecánica o enzimática de la matriz extracelular, el biofilm consigue llegar a su fase final: la dispersión. Ésta se puede dar por erosión, desprendimiento o por sembrado¹⁹⁻²¹. En los dos primeros casos la dispersión se puede producir activa o pasivamente, mientras que el sembrado siempre es un procedimiento iniciado por las propias bacterias¹⁹. Cuando existe escasez de nutrientes o las condiciones ambientales se vuelven adversas²², puede iniciarse un proceso de dispersión por sembrado, en el que se facilita el desprendimiento de células del biofilm mediante la síntesis de enzimas como la dispersina B sintetizada por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*²³, la hialuronidasa de *Streptococcus intermedius*²⁴ o la enzima SRPE (surface-protein-releasing enzyme) de *Streptococcus mutans*²⁵. Estas bacterias desagregadas fluyen en la corriente de saliva hasta que interaccionan con un sustrato de adhesión y forman un nuevo biofilm¹⁹ (Figura 5).

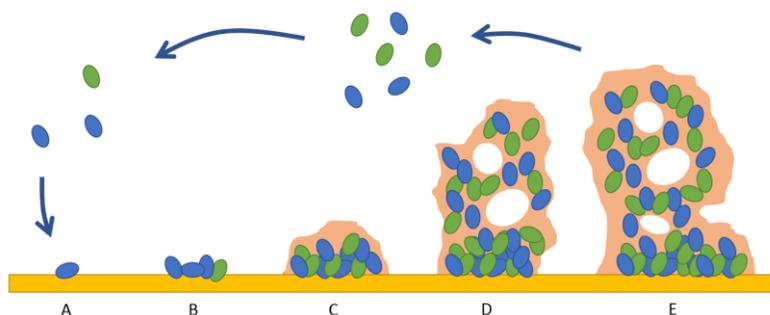


Figura 5. Fases de crecimiento de los biofilms: el biofilm empieza con la adhesión de una célula en una superficie (A). Después de adherirse, las células se replican y forman una matriz de polisacáridos protectora (B). El biofilm va madurando y creciendo tanto en número de células como en volumen y complejidad de la matriz extracelular, formándose estructuras que aumentan su viabilidad (C y D). Finalmente, el biofilm puede llegar a la fase de dispersión, en la que células del mismo pueden desprenderse e iniciar un nuevo biofilm (E).

1.1.2 Propiedades del biofilm oral

El biofilm oral permite a las bacterias que lo componen la creación de cadenas tróficas en las que los metabolismos de unas y otras se complementan, sintetizando nutrientes asimilables a partir de la saliva y otras fuentes nutricionales²⁶⁻²⁸. Los nutrientes difunden por los canales acuosos que atraviesan la matriz extracelular y que a su vez también sirven como conductos donde verter los residuos metabólicos²⁹⁻³¹.

Crece en biofilm también otorga a las bacterias una mayor resistencia al estrés ambiental y a los tratamientos que se usen para combatirlo³²⁻³⁴. Al ser una biopelícula adherida a una superficie, resiste mucho mejor el estrés mecánico que las células en estado planctónico. No solo su capacidad de adherencia le asegura un punto de anclaje, sino que también presenta un comportamiento viscoelástico que le permite resistir la fuerza de cizallamiento que otros fluidos ejercen sobre él³⁵⁻³⁷. Por otra parte, la matriz extracelular disminuye la permeabilidad del biofilm a agentes químicos como los antibióticos (Figura 6) u otros antisépticos, así como a los anticuerpos del sistema inmunológico, los cuales ven dificultada su capacidad de interactuar con sus epítomos de la superficie de las bacterias^{32,38,39}. A esta menor permeabilidad hay que añadirle la existencia de células en el biofilm que se encuentran en un estado latente y que por lo tanto, no pueden verse afectadas por aquellos antibióticos que dependen de la síntesis de proteínas o de la división celular para ser efectivos^{29,40,41}.

Además de todo lo anterior, el intercambio genético que se da dentro del biofilm incrementa la tolerancia a antimicrobianos de los microorganismos que lo componen. La elevada densidad bacteriana de especies distintas facilita que se den fenómenos de conjugación, transformación y transducción⁴². La alta diversidad de especies que existe en el ambiente oral (y por ende el enorme *pool* de genes distintos disponibles) da lugar a un abanico enorme de posibilidades de transferencia de genes^{43,44}.

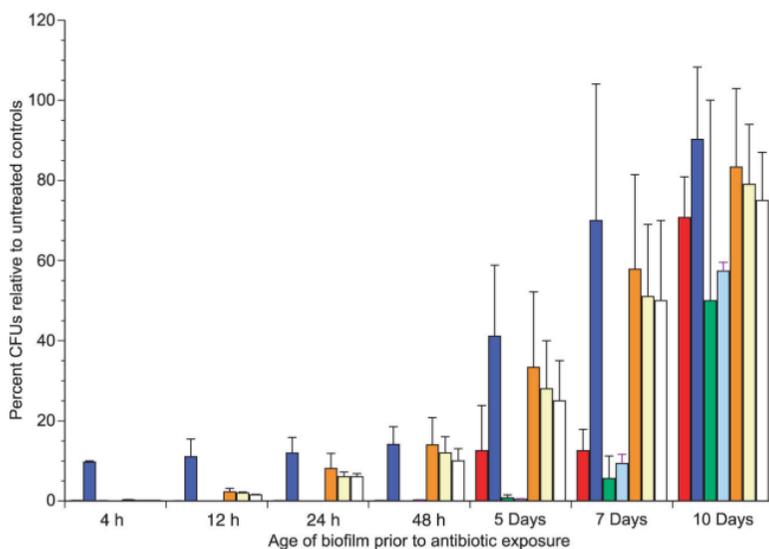


Figura 6. Efecto de los antibióticos en biofilms bacterianos in vitro a lo largo de su crecimiento. En el estudio se eligieron los antibióticos más usados en el tratamiento periodontal: amoxicilina (rojo), metronidazol (azul), amoxicilina/metronidazol (verde), amoxicilina/ácido clavulánico (celeste), tetraciclina (naranja), doxiciclina (amarillo) y minociclina (blanco). Cada biofilm contó con un control sin tratar en el que se midieron las unidades formadoras de colonias para poder comparar el efecto del antibiótico. Notar como la efectividad de los antibióticos disminuye drásticamente a partir del quinto día (gráfico extraído de la referencia 178).

1.1.3 Patologías causadas por el biofilm oral

El biofilm oral es considerado como una de las principales causas de la caries dental y de las enfermedades periodontales. Si bien es cierto que las enfermedades bucales han sido relacionadas con ciertas comunidades microbianas, hay microorganismos concretos que han podido ser aislados recurrentemente de sitios con caries, como *S. mutans*⁴⁵; o de sitios con periodontitis, como *A. actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*⁴⁶.

1.1.3.1 Caries

La caries es una patología causada por la desmineralización del esmalte, la fracción inorgánica del diente, debido a su solubilidad a pHs bajos⁴⁷. Esta disminución de pH puede ser debida a los metabolitos bacterianos que son fruto del metabolismo de azúcares de la dieta como el dextrano o fructano⁴⁸. La exposición prolongada a pHs bajos permite la proliferación de aquellas especies bacterianas que toleran mejor estas condiciones, como *S. mutans*, bacterias del género *Lactobacillus* y del género *Veillonella*⁴⁹. Estas especies bacterianas, por su catabolismo ácido, prolongan la situación de acidez. Cuando se alcanzan valores críticos de pH 5 – 5,5, la hidroxiapatita del esmalte actúa como tampón^{50,51}. No obstante, uno de los principales mecanismos de remineralización que permite revertir el daño causado por la bajada de pH es la producción de saliva. Su secreción se estimula tras la ingesta de alimentos y, además de actuar como tampón⁵², los iones de calcio y fosfato presentes en elevadas concentraciones se van depositando paulatinamente en la superficie dental gracias a proteínas ricas en prolina como la estaterina⁵³. Pese a estos mecanismos de protección y reparación, una exposición repetida a azúcares metabolizables por bacterias acidófilas aumenta el tiempo en que el esmalte está sometido a pHs ácidos, sobrepasando la capacidad que tiene la saliva de tamponarlo y provocando caries⁵⁴ (Figura 7).

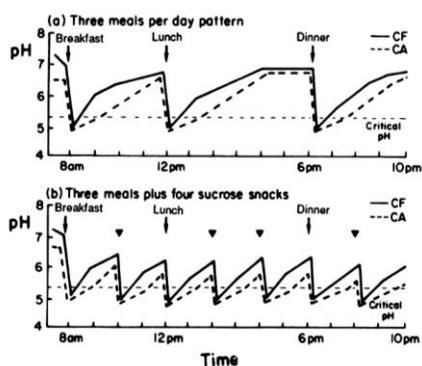


Figura 7. Representación gráfica de la repercusión que tiene en el pH oral la ingesta de comidas 3 veces al día (a) y 3 veces al día pero incluyendo alimentos ricos en sacarosa entre comida y comida (gráfico extraído de la referencia 52).

1.1.3.2 Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad crónica multifactorial asociada a un biofilm disbiótico, con una prevalencia mundial del 11%⁵⁵, que cursa con inflamación de los tejidos periodontales y que puede derivar en la pérdida de piezas dentales debido a la destrucción del hueso alveolar que sirve de soporte al diente^{56,57}. La periodontitis viene precedida en la mayoría de casos por la gingivitis, la cual es una de las enfermedades orales más prevalentes entre la población mundial⁵⁸. Ésta puede aparecer tras 2 o 3 semanas de acumulación de placa sin perturbación, es decir, sin ningún tipo de higiene oral⁵⁹. Se caracteriza por la inflamación gingival del tejido blando, sin pérdida de adhesión del tejido conectivo ni degradación ósea. Sin embargo, en la periodontitis ocurre la separación de las fibras de colágeno del cemento dental y los eventos inflamatorios asociados a la pérdida del tejido conectivo dan lugar a la reabsorción ósea alveolar⁶⁰. Pese a que la gingivitis precede a la periodontitis, solo una minoría de individuos con gingivitis desarrollan periodontitis⁶¹. Así pues, la susceptibilidad que presenta el huésped a los patógenos periodontales juega un papel muy importante^{62,63}. Por ejemplo, se ha descrito que diferencias genéticas relacionadas con el sistema inmunológico como alteraciones en los genes de la IL-1, el receptor de la vitamina D o el receptor *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) tienen relación con la enfermedad periodontal⁶⁴. Además, hay un mayor riesgo de padecer periodontitis si existen antecedentes familiares⁶⁵⁻⁶⁷ o si se tienen ciertos hábitos poco saludables como la falta de higiene oral o el tabaquismo, que pueden aumentar las probabilidades de padecer periodontitis y fomentar tanto la gravedad como la distribución de la enfermedad⁶⁸.

El diagnóstico de periodontitis se basa en las siguientes variables clínicas: 1) presencia o ausencia de signos de inflamación 2) profundidad de sondaje y sangrado 3) alcance y patrón de pérdida de hueso y nivel clínico de inserción 4) historia médica y dental del

paciente 5) presencia o ausencia de un conjunto de signos y síntomas tales como ulceración y cantidades observables de placa y cálculos⁶⁹⁻⁷¹. La profundidad de sondaje (distancia que hay desde el margen gingival hasta la base de la hendidura sondada) es una herramienta útil y rápida para analizar la profundidad de las bolsas periodontales, donde habitan los microorganismos periodontopatógenos. Sin embargo, el nivel clínico de inserción (distancia que hay desde el punto de unión del esmalte y el cemento dental respecto a la base de la hendidura sondada), pese a ser una medida más difícil de obtener, da una mayor información del daño periodontal y de la perspectiva de resolución del tratamiento⁷². Hasta 2017, la periodontitis se diagnosticaba como crónica o agresiva y localizada o generalizada⁷³. La periodontitis agresiva se consideraba aquella periodontitis donde se observaba un avance muy rápido de la enfermedad, mientras que la crónica era aquella con un avance gradual en el tiempo⁷⁴. Sin embargo, en 2017 la clasificación de la enfermedad periodontal se actualizó, dividiendo la enfermedad periodontal en 4 estadios, de menor a mayor gravedad, basados en las variables clínicas previamente mencionadas. Estos estadios se complementan con una gradación de la A a la C, donde se valora el riesgo de progresión de la enfermedad de acuerdo al estado de salud general del paciente, incluyendo tabaquismo y diabetes entre otras variables clínicas sistémicas⁷⁵.

Para la detección de periodontopatógenos se han desarrollado análisis de DNA⁷⁶⁻⁷⁸, perfiles antigénicos⁷⁹⁻⁸¹ y actividades enzimáticas^{82,83}. Estas herramientas son útiles para determinar la presencia o ausencia de microorganismos, pero, con la excepción de algunas técnicas específicas⁸⁴, no aportan información acerca de su susceptibilidad a antimicrobianos. Para obtener esta información suele ser necesaria la realización de ensayos en los que los microorganismos deben ser cultivados en el laboratorio⁸⁵.

El control de la placa dental es la primera opción para prevenir enfermedades periodontales y va dirigido a la eliminación de los factores etiológicos de la gingivitis y

la periodontitis⁶¹. Uno de los métodos más efectivos y contrastados es la higiene mecánica profesional, orientada a la eliminación de la placa supragingival y de los 1-3 primeros mm de placa subgingival⁶¹. La higiene mecánica profesional se puede complementar con la aplicación de moléculas antisépticas, antiplaca o antimicrobianas (sin incluir antibióticos) tales como la clorhexidina, que aportan un efecto bactericida^{61,86}. Si bien su uso puede reducir la microbiota, incluida la peridontopatógena, de las bolsas periodontales⁸⁷⁻⁸⁹, para el tratamiento de la periodontitis suele ser necesario el raspado y alisado radicular o cirugía periodontal⁵. El raspado y alisado radicular (RAR) consiste en la eliminación de la placa y cálculos en la superficie de la raíz dental mediante el raspado con cureta, y en la eliminación de aquel cemento dental o dentina superficial que esté contaminada por toxinas o microorganismos⁹⁰. Esta técnica tiene buenos resultados y normalmente es suficiente para detener la enfermedad y volver a un estado de salud periodontal⁹¹ sin tener que recurrir a la cirugía⁹². En ocasiones, el RAR puede ser complementado con la administración de antibióticos como tratamiento coadyuvante⁹³⁻⁹⁵. Los antibióticos, ya sea vía fluido gingival crevicular al ser administrados sistémicamente o por difusión simple al ser administrados localmente, permiten una acción antibacteriana en aquellos recovecos del surco gingival en los que la terapia mecánica no es efectiva, aumentando así la eficacia del tratamiento^{96,97}. Los antibióticos más utilizados en periodoncia incluyen la amoxicilina (AMX), metronidazol (MZ), azitromicina (AZM) y tetraciclinas (TET), ya sea administrados local o sistémicamente⁹⁸.

1.2 Tetraciclinas

Las TETs son un grupo de antibióticos de amplio espectro descubierto a principios de los años 40 del siglo XX⁹⁹. Investigadores de los laboratorios Lederle, de la compañía Cyanamid, iniciaron una búsqueda de nuevos antibióticos para comercializarlos. A partir de muestras de suelo, aislaron un gran número de cepas bacterianas con actividad antimicrobiana, de las cuales destacaron una cepa de *Streptomyces*, posteriormente nombrada *Streptomyces aureofaciens*, que originaba una colonia amarillenta que inhibía el crecimiento de un gran número de cepas bacterianas a la vez que creaba grandes halos de inhibición en agar. El compuesto producido por *S. aureofaciens* se denominó aureomicina (clortetraciclina) y fue aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) en 1948, y utilizado inmediatamente en la práctica clínica con éxito. Poco después, investigadores de la compañía Pfizer aislaron *Streptomyces rimosus*, el cual producía un compuesto parecido a la aureomicina, pero más soluble en agua y con una mayor actividad biológica. Al compuesto lo llamaron terramicina (oxitetraciclina) y fue aprobado por la FDA en 1950^{100,101}.

La estructura química de ambos compuestos se publicó en 1952, y se observó que ambos antibióticos compartían un núcleo de naftaceno donde las diferencias radicaban en que la terramicina tenía un grupo hidroxilo en la posición C5 y en la posición C7 faltaba un átomo de cloro (Figura 8)¹⁰². Ese mismo año, y con la estructura ya conocida, Lloyd Conover, de Pfizer, hipotetizó que la aureomicina podría ser más eficaz sin el átomo de cloro, por lo que sintetizó un derivado sin dicho átomo al que llamó TET. La TET demostró ser más potente, más soluble y con una actividad farmacológica más favorable¹⁰³. Con la aparición de la TET y el conocimiento estructural de la terramicina y la aureomicina, se cambió el nombre de las dos últimas, llamándolas oxitetraciclina y clortetraciclina respectivamente, adecuando los nombres a las características estructurales que presentaban.

Los siguientes derivados fueron la doxiciclina y la minociclina, aprobados por la FDA para su uso clínico en 1967 y 1971, respectivamente. La doxiciclina se sintetizó a partir de la metaciclina, un derivado de la oxitetraciclina a la que se le modificó la posición C6, halogenándola y deshidratándola. A su vez, la metaciclina sirvió de base para la síntesis de la doxiciclina, sustituyendo el grupo metileno en la posición C6 por un grupo metilo^{104,105}. La síntesis de la minociclina parte de la demeclociclina, una TET producida por una cepa de *Streptomyces* genéticamente modificada y cuya diferencia respecto a la clortetraciclina era la carencia de un grupo metilo en la posición C6¹⁰⁶. A esta TET se le despojó del grupo hidroxil en la posición C6 y del átomo de cloro en la posición C7 con tal de conseguir la TET más básica con actividad antimicrobiana, llamada sanciclina. A la sanciclina se le añadió un grupo dimetilamino en la posición C7, dando paso a la minociclina, cuyas propiedades antibacterianas y farmacológicas eran superiores a las TETs de primera generación e incluso a la doxiciclina¹⁰⁷.

En la década de los 80 se reactivó la síntesis de derivados de las TETs y se sintetizó la tigeciclina adicionando un grupo t-butil glicilamida en la posición C9 de la minociclina, siendo aprobada para uso clínico por la FDA en 2006¹⁰⁸. La omadaciclina y la eravaciclina son dos nuevos derivados de las TETs que aún se encuentran en fase de estudio. Ambos, al igual que la tigeciclina, parten de la minociclina. En el caso de la omadaciclina se añade un grupo t-butil dimetilamino en la posición C9¹⁰⁹, mientras que en el caso de la eravaciclina se sustituye el radical dimetilamina de la posición C7 por un átomo de flúor y, además, se añade el grupo pirrolidinoacetamido en la posición C9¹¹⁰.

Debido a su amplio espectro y escasez de efectos secundarios, las TETs fueron ampliamente usadas desde su descubrimiento⁹⁹. Se han empleado para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, enfermedades de transmisión sexual e incluso como tratamiento antiacné^{111,112}. También se han usado TETs para tratar infecciones

en animales y como promotor del crecimiento en granjas debido sus efectos antiinflamatorios sobre el tracto gastrointestinal del ganado¹¹³. Este uso tan extendido ha potenciado la aparición de resistencias en diversos microorganismos, provocando que cayeran en desuso debido a su ineficacia. Sin embargo, con la aparición de nuevas resistencias y la síntesis de una nueva generación de tetraciclinas, éstas han vuelto a ganar importancia⁹⁹.

1.2.1 Clasificación

Actualmente existen tres generaciones de TETs:

- i. Primera generación: clortetraciclina, oxitetraciclina y TET. Son aquellas TETs que se aislaron directamente de las cepas de *S. aureofaciens* y *S. rimosus* en el caso de la clortetraciclina y la oxitetraciclina, respectivamente. Con una ligera modificación se obtuvo la TET a partir de la clortetraciclina.
- ii. Segunda generación: metaciclina, doxiciclina, demeclociclina, sanciclina y minociclina. Aparecieron al querer mejorar las TETs existentes mediante vías semisintéticas. A excepción de la sanciclina, el resto de los miembros de esta generación tienen o han tenido uso clínico.
- iii. Tercera generación: tigeciclina, eravaciclina y omadaciclina. Es la generación de las glicilciclinas, las cuales no se ven afectadas por bombas de flujo como Tet(A), Tet(B) o Tet(C)¹¹⁴ o las proteínas de protección ribosomal¹⁰⁹. Tanto la omadaciclina como la eravaciclina todavía están en fase de estudio clínico, aunque con resultados prometedores puesto que obtienen concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) similares a los de la tigeciclina^{109,115-119}.

1.2.2 Estructura química

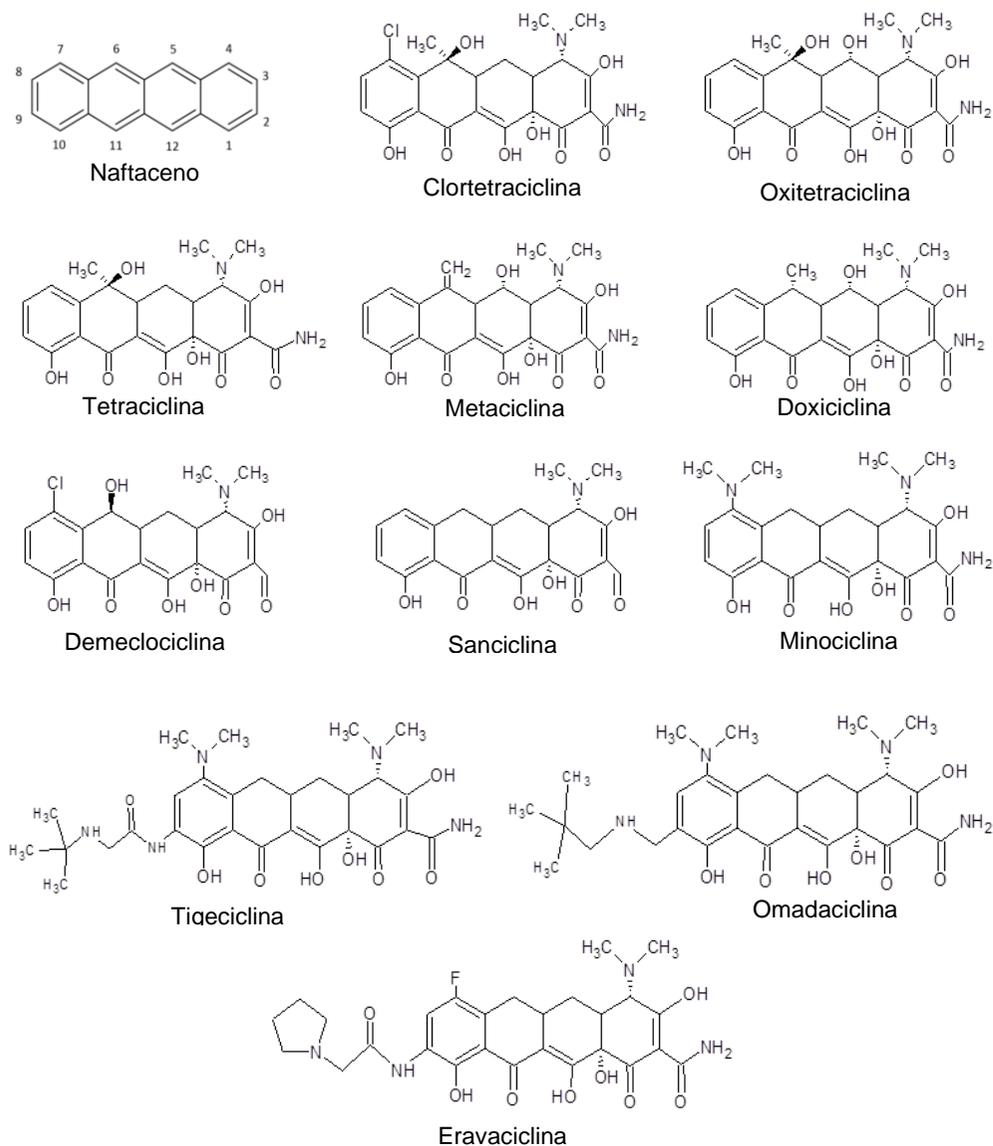


Figura 8. Estructura química de las distintas generaciones de TETs. En la primera fila se muestra el anillo de naftaceno, característico de todas las TETs, así como las dos TETs originales: clortetraciclina y oxitetraciclina. En la segunda fila la primera TET modificada, a la que se le dio el nombre de la clase, así como la doxiciclina y su precursor, la metaciclina. En la tercera fila la minociclina y sus dos precursores: la demeciclina y la sanciclina. En las dos últimas filas las glicilciclina: tiaciclina, omadaciclina y evaraciclina, la primera en uso y las siguientes todavía en ensayos clínicos.

1.2.3 Mecanismo de acción

Las TETs tienen un efecto bacteriostático, impidiendo la síntesis proteica mediante su unión, junto con Mg^{2+} , a la región A de la subunidad 30S del ribosoma y bloqueando la unión del aa-tRNA¹²⁰. Al no producirse dicha unión, el ribosoma no puede añadir aminoácidos a la proteína y por lo tanto ésta no se sintetiza. Este mecanismo genera tan sólo bacteriostasis ya que no mata directamente a las células, sino que impide su viabilidad al no poder sintetizar proteínas¹²⁰. La TET atraviesa la membrana externa de las bacterias grampositivas a través de las porinas OmpF y OmpC en forma de un complejo catiónico conjuntamente con magnesio^{111,113,121}. Una vez atravesada la membrana externa, se acumula en el espacio periplasmático donde se libera del catión Mg^{+2} y atraviesa la membrana interna gracias a su débil lipofilia¹¹¹. Para atravesar la membrana celular, la TET necesita la energía producida por el gradiente de protones. Una vez dentro del citoplasma, ésta vuelve a ser quelada por un ion metálico debido a la mayor concentración iónica y de pH que existe en el interior de la célula¹²¹. La TET puede unirse a la subunidad 30S del ribosoma (Figura 9) en seis puntos distintos, aunque es el sitio de unión Tet-1 el de mayor afinidad. Dicho punto se encuentra cerca del sitio A del ribosoma, en la zona de aceptación del aa-tRNA. Los efectos de la unión de la TET a los otros 5 sitios no han sido esclarecidos, pero variantes más complejas, como la tigeciclina, solo tienen afinidad por el punto Tet-1, indicando que el resto de puntos de unión no guardan relación con la capacidad bacteriostática del antibiótico^{120,122,123}

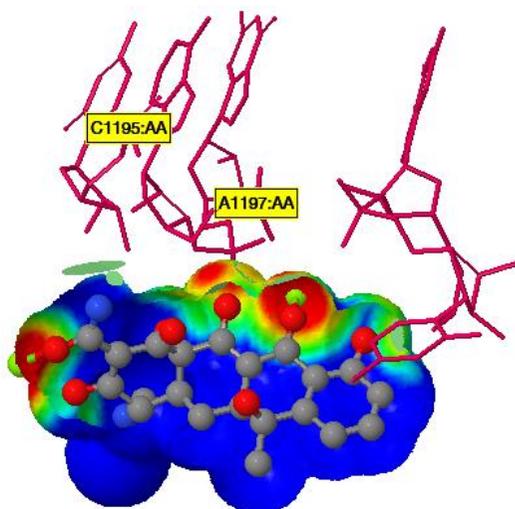


Figura 9. Representación esquemática de la interacción de la TET con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. En la figura se observa un mapa de calor, donde los colores más cálidos corresponden a una mayor afinidad. Obtenido mediante la herramienta JSmol de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)

1.2.4 Usos de las TETs

Las TETs se han usado desde su descubrimiento como antibióticos y como factores de crecimiento en la ganadería¹¹¹. Su actividad como factor de crecimiento fue descubierta en 1949, al observar que la adición de clortetraciclina en concentraciones subterapéuticas en el alimento de pollos jóvenes aumentaba su crecimiento¹²⁴. Esta práctica ha sido muy criticada debido a la presión selectiva que se genera en el ambiente y su uso se ha ido restringiendo o incluso prohibido en algunos países¹²⁵. Además, algunos autores también cuestionan la efectividad de las TETs como factores de crecimiento, argumentando que la productividad de las granjas aumentó incluso después de la prohibición de su uso¹²⁵⁻¹²⁷.

En clínica, las TETs se han demostrado efectivas tanto en bacterias aerobias como anaerobias, incluyendo rickettsias, clamidias, micoplasmas, espiroquetas, protozoos y micobacterias¹²⁸. También son efectivas frente a *Helicobacter pylori*, cuyo tratamiento habitual basado en MZ y claritromicina presenta es ineficaz frente a algunas cepas^{111,129}. En la tabla 1 se describen aquellas infecciones para las que las TETs son una primera opción de tratamiento y aquellas en las que pueden suponer una alternativa a otros antibióticos en caso de aparecer resistencias a la primera opción u otras contraindicaciones.

Las TETs pueden ser administradas de forma oral y parenteral en la gran mayoría de tratamientos¹³⁰. Sin embargo, el fácil acceso al ambiente oral posibilita la aplicación del antibiótico de manera local, sin tener que ser absorbido en el intestino o ser inyectado. La aplicación local del antibiótico permite, además, evitar la aparición excesiva de resistencias, puesto que solo afecta al lugar de aplicación y disminuye el riesgo de padecer efectos secundarios^{131–133}.

En el ambiente oral las TETs se pueden aplicar en forma de pomada o en forma de fibras impregnadas de antibiótico^{134–136}. Las fibras de TET proporcionan un método indoloro y eficaz de tratar la periodontitis mediante la aplicación local de antibiótico¹³⁷. Pueden ser de distintos materiales, como etilcelulosa o tiras acrílicas, y estar impregnadas con diferentes concentraciones de antibiótico según la marca comercial, pero en todos los casos tienen un efecto demostrado en la disminución de la profundidad de sondaje y del nivel clínico de inserción^{135,137,138}.

Tabla 1. Lista de infecciones para las que las TETs son la primera opción de tratamiento y aquellas en las que es una opción válida como alternativa al antibiótico de primera opción. Adaptada de la referencia 111.

Infecciones para las cuales se administra TET	
Primera opción	Alternativa aceptable a otros antibióticos
Aparato respiratorio	
Neumonía atípica por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Chlamydia psittaci</i>	Neumonía adquirida en la comunidad Exacerbaciones agudas de la bronquitis aguda Legionelosis (doxiclina)
Intestino	
Cólera Profilaxis para la diarrea del viajero	
Genitales	
Uretritis no gonocócica	Sífilis
Cervicitis	Epididimitis
Linfogranuloma venéreo	Prostatitis
Enfermedad pélvica inflamatoria	
Granuloma inguinal	
Local y sistémico	
Fiebre manchada de las montañas rocosas	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)
Tifus epidémico y endémico	MRSA (cuando la vancomicina u otros agentes no son apropiados se utiliza minociclina)
Fiebre Q Brucelosis (junto con rifampicina o estreptomicina)	<i>Yersinia pestis</i>
Enfermedad de Lyme	Bartonelosis
Fiebre reincidente	Leptospirosis
Infecciones periodontales (terapia tópica con TET o minociclina)	Enfermedad de Whipple
Acné vulgar (tratamiento tópico y sistémico)	Infecciones cutáneas causadas por <i>Mycobacterium marinum</i> y en administraciones de distintos antibióticos para las infecciones oculares causadas por <i>Mycobacterium chelonae</i>
Profilaxis para <i>Plasmodium falciparum</i> resistente a mefloquina	Gastritis causada por <i>H. pylori</i> (TET en administraciones de distintos antibióticos)

Las pomadas o geles de TET o derivados tienen otras propiedades: mientras que las fibras están impregnadas y administran el antibiótico en pequeñas dosis a lo largo del tiempo, las pomadas son absorbidas rápidamente y por lo tanto, su efecto es más limitado en el tiempo¹³³. Sin embargo, el uso de altas concentraciones en pomadas junto con su aplicación repetida, da lugar a resultados parecidos a los obtenidos con fibras impregnadas de TET^{133,139-142}. El uso de pomadas no está exento de efectos secundarios, puesto que un estudio reciente demostró que su uso fomentaba el desplazamiento de la microbiota residente en la bolsa periodontal por parte de una microbiota resistente a TET. Pese a esto, tras 20-30 días del tratamiento, las bacterias resistentes a TET recuperaron su nivel original al reiniciarse la competitividad con los nuevos colonizadores¹³⁶.

1.2.5 Resistencia a TETs

Las bacterias han desarrollado distintos mecanismos de resistencia a las TETs, principalmente las bombas de flujo, la protección ribosomal y la inactivación enzimática (Tabla 2). Las bombas de flujo fueron los primeros sistemas de resistencia que se detectaron y consisten en la expulsión activa de las moléculas de TET fuera de la célula por un gradiente de protones (Figura 10)¹⁴³. La mayoría de las bombas de flujo confieren resistencia a TETs de primera generación, pero no a minociclina ni a gliciliclinas. Sin embargo, *tet(B)* codifica para una bomba de flujo que confiere resistencia a minociclina y a TET, aunque es ineficaz para TETs de tercera generación^{113,144}. La mayoría de los genes que codifican para bombas de flujo se encuentran codificados en plásmidos, aunque algunos se han descrito integrados en el cromosoma^{145,146}. Hasta la fecha, las bombas de flujo encontradas en la microbiota oral son Tet(A), Tet(B), Tet(G), Tet(K), Tet(L), Tet(40) y TetAB(46)^{111,147}.

Tabla 2. Lista de resistencias a TET clasificadas según su mecanismo de acción. Información recopilada de "Tet mechanisms of resistance"¹⁴⁷.

Bombas de flujo	Protección ribosomal	Inactivación enzimática
Tet(A), Tet(B), Tet(D), Tet(E), Tet(59), Tet(G), Tet(H), Tet(J), Tet(V), Tet(Y), Tet(Z), Tet(30), Tet(31), Tet(33), Tet(57), Tet(35), Tet(39), Tet(41), Tet(K), Tet(L), Tet(38), Tet(45), Tet(58), TetA(P), Tet(40), Otr(B), Otr(C), Tcr3, Tet(42), Tet(43), TetAB(46), TetAB(60), Tet(62)	Tet(M), Tet(O), Tet(S), Tet(W), Tet(32), Tet(Q), Tet(T), Tet(36), Tet(61), Otr(A), TetB(P), Tet(44), Tet(O/32/O), Tet(O/W/32/O), Tet(O/W/32/O/W/O), Tet(W/32/O), Tet(O/W), Tet (W/32/O/W/O), Tet(O/W/O), Tet(O/W/32/O), Tet(S/M), Tet(W/N/W)	Tet(X), Tet(37), Tet(34), Tet(47), Tet(48), Tet(49), Tet(50), Tet(51), Tet(52), Tet(53), Tet(54), Tet(55), Tet(56)

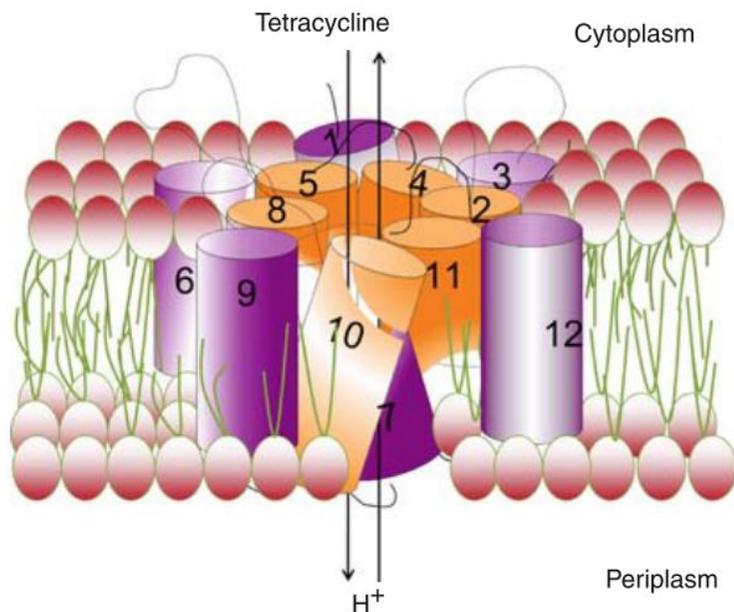


Figura 10. Esquema de la bomba de flujo TetA(B) en la que se muestra la inclinación de las hélices transmembrana y el canal que forman por el que se exporta la TET. Figura extraída de la referencia 99.

Las proteínas de protección ribosomal (PPRs) se encargan de evitar que la TET interaccione con los ribosomas a los que afecta. Mediante GTP, se unen a un ribosoma afectado por TET y deshacen la unión, hidrolizándose el GTP a continuación, liberando la PPR y dejando el ribosoma libre (Figura 11)¹⁴⁸. Este mecanismo relaciona las PPRs que confieren resistencia a TET con los factores de elongación EF-Tu y EF-G, con los que comparten regiones de homología en su secuencia nucleotídica^{149,150}. Las PPRs más prevalentes en el ambiente oral son Tet(M) y Tet(O), las cuales comparten un 75% de homología en su secuencia aminoacídica¹⁵¹. En dicho ambiente se han descrito, entre otras, Tet(M), Tet(O), Tet(Q), Tet(S), Tet(W), Tet(32), Tet(44) y los elementos mosaicos Tet(O/W/32/O), Tet(O/32/O) y Tet(S/M)^{111,147}. Los elementos mosaicos están formados por regiones que comparten $\geq 80\%$ de homología con otros genes de resistencia a TET pero que no contienen el gen completo^{152,153}.

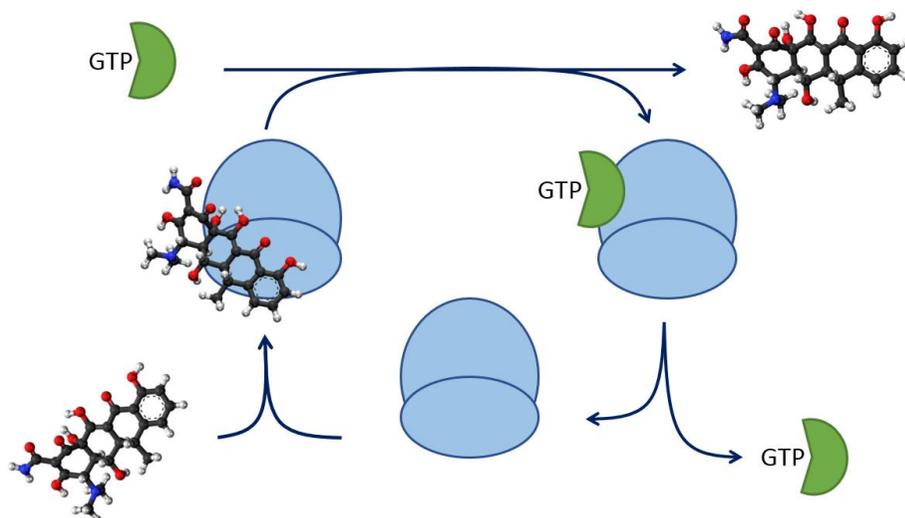


Figura 11. Esquema del mecanismo de acción de las proteínas de protección ribosomal. La TET se une al sitio A de la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo la correcta síntesis proteica. Las PPR pueden disociar la TET del ribosoma compitiendo por el mismo lugar de unión. Posteriormente la PPR se separa del ribosoma mediante gasto de GTP y el ribosoma es libre para continuar la traducción.

Actualmente se conocen 13 genes que codifican para enzimas de inactivación (Tabla 2), de las cuales solo se ha encontrado Tet(37) en el ambiente oral^{99,147}. Estas enzimas

modifican las TETs en presencia de oxígeno y NADPH, añadiendo un grupo hidroxilo en la posición C11 y afectando su capacidad de unión con Mg^{2+} y por lo tanto su interacción con el ribosoma. Esta modificación provoca la desestabilización y descomposición del antibiótico¹⁵⁴. Estas enzimas pueden actuar sobre TETs de primera, segunda y tercera generación¹⁵⁵.

1.3 β -lactámicos

Los β -lactámicos fueron los primeros antibióticos descubiertos por la ciencia moderna, aunque hay registros que indican que probablemente fueron utilizados en la antigüedad. Soja fermentada, pan de cebada y quesos enmohecidos fueron algunas de las primeras fuentes de β -lactámicos, y fueron utilizadas por médicos y curanderos en la antigüedad¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Las propiedades antibacterianas del género *Penicillium* se observaron ya en el siglo XIX, cuando científicos como Sanderson o Lister observaron la inhibición del crecimiento de bacterias al entrar en contacto con ciertos mohos^{159,160}. Con la descripción hecha por Alexander Fleming en 1929 sobre los efectos de un extracto crudo de *Penicillium chrysogenum* sobre estafilococos, se inició el aislamiento y el uso de las penicilinas naturales. De los cultivos de *P. chrysogenum* se pudieron obtener 5 compuestos: las penicilinas F, G, X, K y la dihidro penicilina F¹⁶¹. De estas, la penicilina G, o bencilpenicilina, fue la más fabricada en los Estados Unidos de América (EUA) y se obtenía añadiendo licor de maíz fermentado. Esto aumentaba la cantidad de penicilina que se podía extraer de los reactores y provocaba un cambio conformacional debido al ácido fenilacético presente en el licor, el cual servía de precursor de la cadena lateral de la penicilina G^{162,163}. Estas penicilinas tenían un espectro de acción limitado a grampositivos, con escasa o nula acción contra gramnegativos¹⁶⁴.

La detección de β -lactamasas hospitalarias en los años 50 trajo consigo la urgencia por descubrir nuevos compuestos que no fueran sensibles a su acción. Ernst Brandl y Hans Margreiter describieron que con la adición de 2-fenoxietanol durante la fermentación se conseguía una penicilina con mayor actividad biológica y resistencia a ácido, lo cual la convertía en una buena candidata para ser usada oralmente. La llamaron penicilina V y fue ampliamente utilizada¹⁶⁵. Simultáneamente, Giuseppe Brotzu aislaba una cepa de *Acremonium strictum* (anteriormente llamado *Cephalosporium acremonium*) de la que se obtuvo la penicilina N y la cefalosporina C. La penicilina N tenía un espectro muy parecido al del resto de penicilinas naturales, pero con una mayor actividad frente a *Salmonella* spp¹⁶⁶. A raíz del descubrimiento de la penicilina N, se hipotetizó que las cadenas laterales de las penicilinas tenían una gran importancia en el espectro de acción y en la resistencia a β -lactamasas, por lo que se empezó a trabajar en la semisíntesis de β -lactámicos a partir del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA)¹⁶⁷. Este compuesto también se producía de forma natural en los reactores de fermentación y constituye una unidad básica con anillo β -lactámico, lo cual permitía la síntesis de derivados mediante acilación. La ampicilina y la AMX, también llamadas aminopenicilinas, son unos de estos derivados y nacieron con la intención de sintetizar penicilinas más indicadas para el consumo oral. Además, demostraron un aumento en la actividad contra gramnegativos como *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*¹⁶⁴.

El descubrimiento de la penicilina N y de las primeras penicilinas semisintéticas no solucionaron el creciente problema de las β -lactamasas, a las que seguían siendo sensibles. Se creía que generando un impedimento estérico alrededor del grupo amida del anillo β -lactámico se reduciría la afinidad por las β -lactamasas. Con este fin se sintetizaron la meticilina y la cloxacilina entre otras, diferenciándose entre ellas principalmente por la capacidad de la cloxacilina de ser administrada oralmente. Estos

antibióticos presentaban una mayor resistencia a las β -lactamasas al dificultar la interacción del anillo β -lactámico con el centro catalítico de las β -lactamasas^{164,168,169}.

La carbenicilina y la ticarcilina, introducidas en 1969 y 1973 respectivamente, tenían una mayor actividad frente a gramnegativos como *Pseudomonas aeruginosa* debido a su resistencia frente a β -lactamasas del tipo C (descritas más adelante). Otros β -lactámicos con mayor efectividad frente a gramnegativos fueron la piperacilina, el mecilinam y la temocilina^{164,170,171}.

Las cefalosporinas, que se descubrieron en *A. strictum*, también han tenido un largo desarrollo. La primera generación de cefalosporinas, teniendo a la cefalotina y la cefaloridina como primeros compuestos, fueron introducidas en los años 60. Su síntesis comenzaba a partir de modificaciones del ácido 7-aminocefalosporánico y tenían actividad principalmente frente a especies del género *Staphylococcus* y *Streptococcus*, aunque también frente a gramnegativos que no produjeran β -lactamasas^{164,172}. Con la segunda generación de cefalosporinas, sintetizadas usando las cadenas laterales de las penicilinas semisintéticas y con la cefuroxima como ejemplo, se amplió el espectro a una mayor cantidad de bacterias gramnegativas a costa de perder actividad frente a grampositivos^{164,173}. Sin embargo, su mayor estabilidad frente a penicilinasas, permitió su acción frente a bacterias que eran resistentes a la primera generación de cefalosporinas. La tercera generación de cefalosporinas, que incluye la cefotaxima (CTX), la ceftazidima y la ceftriaxona, presenta una mayor actividad frente a gramnegativas pero una menor actividad frente a grampositivas en comparación con las cefalosporinas de primera generación. Debido a la rigidez de su cadena lateral, esta generación presenta resistencia a β -lactamasas de clase A y a la β -lactamasa TEM-1^{173,174}. Sin embargo, tienen alta afinidad por β -lactamasas de clase C¹⁶⁴. Por último, la cuarta generación de cefalosporinas, con la cefepima como uno de sus mayores

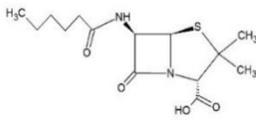
exponentes, presenta una solución a esta debilidad, añadiendo una carga positiva en la cadena lateral del carbono 3¹⁶⁴.

1.3.1 Clasificación

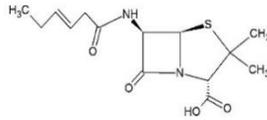
Los antibióticos β -lactámicos tratados en esta introducción (Figura 12) se pueden clasificar en:

- i. Penicilinas: dihidro penicilina F, penicilina F, penicilina G, penicilina K, penicilina N, penicilina V y penicilina X. Son las penicilinas naturales, obtenidas a partir de cultivos de *P. chrysogenum* a los que se les añadía distintos compuestos durante la fermentación.
- ii. Aminopenicilinas: ampicilina y AMX. Fueron las primeras penicilinas semisintéticas, más convenientes para el consumo oral y efectivas contra bacterias gramnegativas¹⁶⁴.
- iii. Oxazolilpenicilinas: metecilina y cloxacilina. Penicilinas desarrolladas para resistir las penicilinasas sintetizadas por estafilococos¹⁶⁴.
- iv. Antipseudomonales: ticarcilina, carbenicilina, piperacilina, mecilinam y temocilina. Sintetizadas principalmente para combatir *P. aeruginosa* y otros gramnegativos.
- v. Cefalosporinas 1^a generación: cefalotina y cefaloridina. Las cefalosporinas fueron ganando espectro de acción y resistencia frente a β -lactamasas a medida que se sintetizaban nuevas generaciones.
- vi. Cefalosporinas 2^a generación: cefuroxima.
- vii. Cefalosporinas 3^a generación: CTX, ceftriaxona y ceftazidima.
- viii. Cefalosporinas 4^a generación: cefepima.

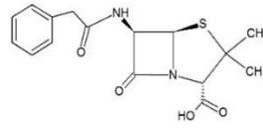
1.3.2 Estructura química



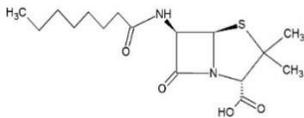
Dihidro penicilina F



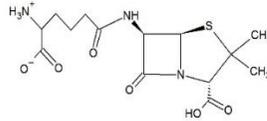
Penicilina F



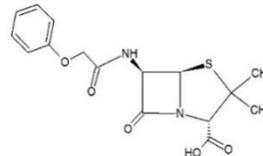
Penicilina G



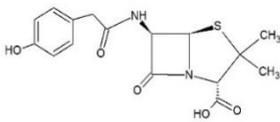
Penicilina K



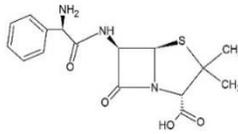
Penicilina N



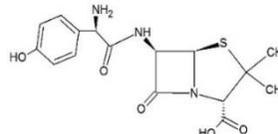
Penicilina V



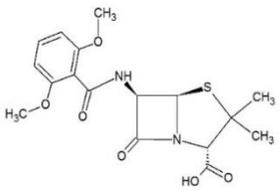
Penicilina X



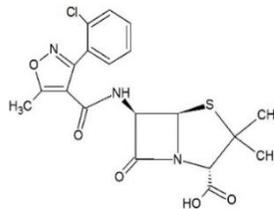
Ampicilina



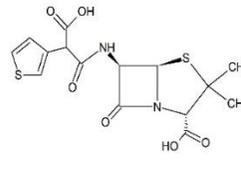
Amoxicilina



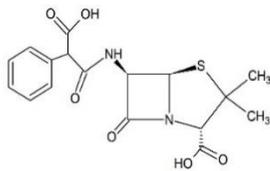
Meticilina



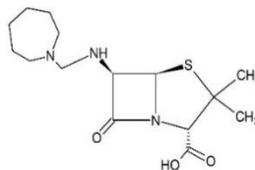
Cloxacilina



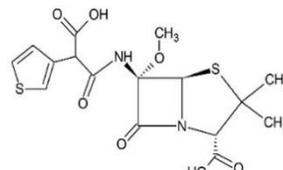
Ticarcilina



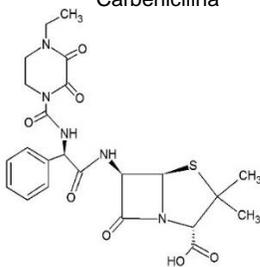
Carbenicilina



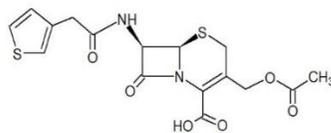
Mecilnam



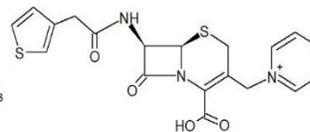
Temocilina



Piperacilina



Cefalotina



Cefaloridina

Continúa de la página anterior

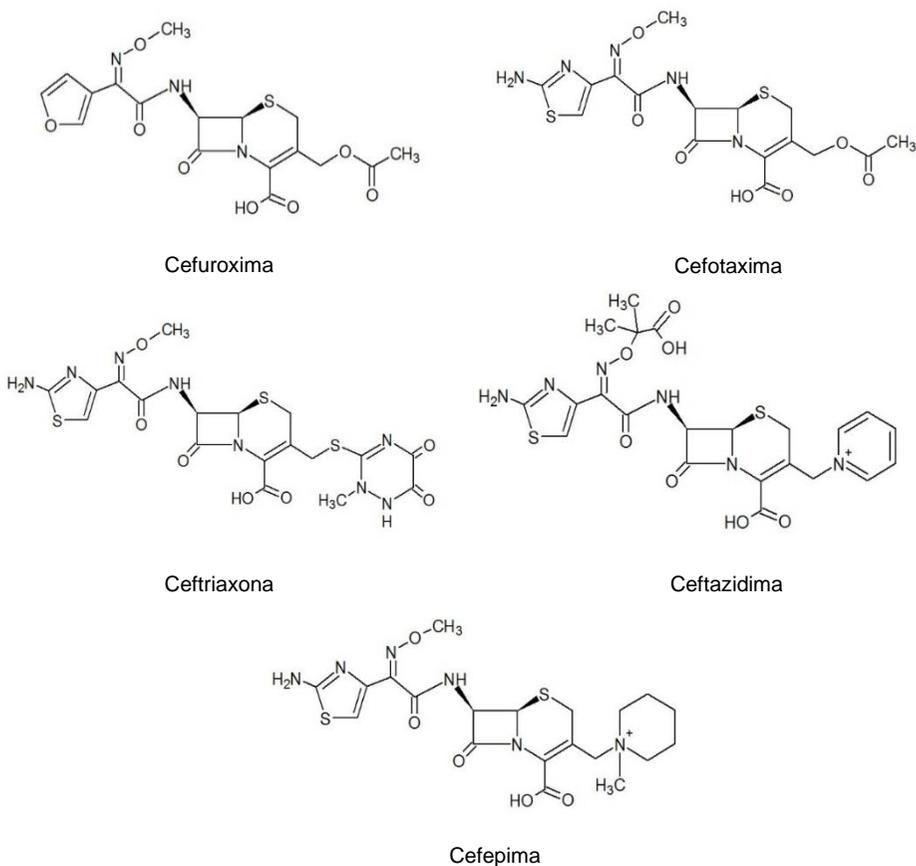


Figura 12. Estructura química de los β -lactámicos tratados en esta introducción. De izquierda a derecha y de arriba a abajo, las 16 primeras estructuras representan antibióticos β -lactámicos de la familia de las penicilinas, mientras que 7 restantes representan cefalosporinas. La principal diferencia entre las dos familias, más allá de sus derivados, radica en el grupo químico adyacente al anillo β -lactámico. Si bien en las penicilinas el anillo se encuentra siempre junto a una tiazolidina, en el caso de las cefalosporinas el anillo se encuentra adyacente a un anillo dihidrotiazina.

1.3.3 Mecanismo de acción

Los β -lactámicos actúan sobre la pared celular bacteriana, específicamente sobre el peptidoglucano. El peptidoglucano está constituido por un heteropolímero de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Este heteropolímero forma una red conectada a través de la unión de oligopéptidos que penden del monómero de ácido N-acetilmurámico (Figura 13). Las Penicillin Binding Proteins (PBPs) son proteínas que

se encargan de facilitar esta unión, conocida como transpeptidación¹⁷⁵. Estas proteínas tienen una elevada afinidad por β -lactámicos como la penicilina, de ahí su nombre, y en presencia de éstos tienden a unirse al antibiótico en lugar de interconectar los monómeros de ácido N-acetilmurámico.

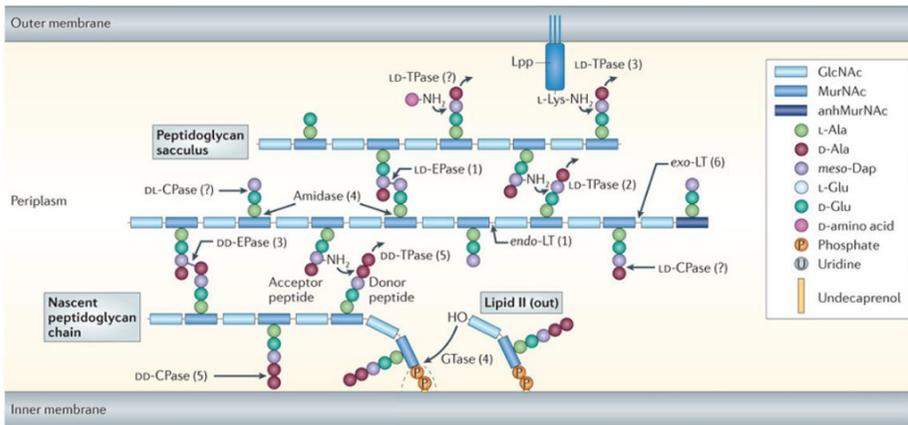


Figura 13. Síntesis del peptidoglucano en una bacteria gramnegativa. En la figura aparecen representados los monómeros de N-acetilglucosamina y de ácido N-acetilmurámico. De cada monómero de ácido N-acetilmurámico nace una cadena de oligopéptidos, las cuales se unen entre sí permitiendo una estructura entrelazada. Figura adaptada de la referencia 176.

Los β -lactámicos impiden la transpeptidación uniéndose a las PBP's y creando la acumulación de monómeros pobremente unidos entre sí. Esto da lugar a una pared celular mecánicamente debilitada y más susceptible a romperse por presiones osmóticas o mecánicas. Además, la acumulación de cadenas de peptidoglucano incorrectamente unidas favorece la activación de hidrolasas y autolisinas que degradan el peptidoglucano restante¹⁷⁶. Esta degradación de la pared celular por distintas vías deriva en la lisis bacteriana y por lo tanto los β -lactámicos son una clase de antibióticos bacteriolíticos.

1.3.4 Usos de los β -lactámicos

Los β -lactámicos son antibióticos de amplio espectro y escasos efectos secundarios debido a la especificidad de su mecanismo de acción. Actualmente se utilizan para el tratamiento de multitud de infecciones (Tabla 3) y son unos de los antimicrobianos más usados en la práctica clínica¹⁷⁷.

Tabla 3. Lista de β -lactámicos usados para tratar distintas infecciones. Adaptada de la referencia 178.

Tipo de infección	β -lactámicos usados
Infecciones de la piel y tejidos blandos	Cefalosporinas, penicilinas y carbapenem
Infecciones de cuello y de cabeza	Cefalosporinas, penicilinas y carbapenem
Infecciones bucales	Penicilinas
Faringitis	Cefalosporinas y penicilinas
Sinusitis	Penicilas y cefalosporinas
Meningitis	Cefalosporinas (de tercera y cuarta generación) y carbapenem.
Infecciones del tracto respiratorio inferior	Penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas (especialmente para infecciones nosocomiales)
Infecciones del tracto urinario	Penicilinas, cefalosporinas, monobactams y carbapenemas (especialmente para infecciones provocadas por bacterias gramnegativas multirresistentes)
Infecciones intraabdominales	Cefalosporinas (en combinación con agentes que actúen frente anaerobios), carbapenemas y ureidopenicilina junto con inhibidores de β -lactamasas
Infecciones articulares y óseas	Penicilinas y cefalosporinas
Endocarditis infecciosa	Penicilinas y cefalosporinas

En odontología, los β -lactámicos se usan en el tratamiento de infecciones endodónticas, abscesos dentoalveolares, como profiláctico en procedimientos dentales para evitar endocarditis infecciosa y para aquellos pacientes con articulaciones protésicas, y como coadyuvante para el tratamiento de la periodontitis^{179,180}. La AMX es el β -lactámico más utilizado en periodontitis y se puede administrar sistémicamente junto con MZ, el cual ataca específicamente a las bacterias anaerobias, o con ácido clavulánico, inhibidor de β -lactamasas^{42,181}. Experimentos con modelos de biofilm oral *in vitro* han demostrado que la combinación de AMX con MZ es la más efectiva para disminuir la carga bacteriana y reducir la actividad metabólica^{182,183}. Sin embargo, la combinación *in vivo* de estos antibióticos junto con RAR ofrece resultados parecidos a la administración local de otros antibióticos como la TET^{183,184}, por lo que la elección del antibiótico por parte del facultativo puede obedecer más a factores como los efectos secundarios, la facilidad de toma por parte del paciente o incluso a las consecuencias derivadas de su uso extensivo. Algunos autores piden condicionar el uso de la AMX a un estudio microbiológico previo, en el cual se confirme la presencia de periodontopatógenos como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*^{185,186} para evitar un sobreuso de antibióticos y propiciar el aumento de resistencias en otras bacterias como *Streptococcus*¹⁸⁷.

1.3.5 Resistencias a β -lactámicos

La resistencia a β -lactámicos puede venir dada por distintos métodos, como la síntesis de PBPs de baja afinidad por el antibiótico o la síntesis de β -lactamasas que inactivan el antibiótico^{164,188,189}. Por su capacidad de propagación entre bacterias de distintas especies, las β -lactamasas tienen una alta importancia clínica¹⁹⁰. Estas enzimas hidrolizan el anillo β -lactámico del antibiótico, inactivándolo y permitiendo la síntesis de peptidoglucano. La clasificación de las β -lactamasas ha ido cambiando a medida que las técnicas para caracterizarlas evolucionaban. Inicialmente se clasificaron según el sustrato que hidrolizaban¹⁹¹ y posteriormente según su estructura molecular,

separándolas en 4 clases (A, B, C y D)¹⁹². Bush *et al.*^{193–195} unificó las distintas clasificaciones en una sola, englobando las enzimas en 4 grupos numéricos (Tabla 4).

Tabla 4. Clases de β -lactamasas correlacionadas con el sustrato que hidrolizan y los genes con mayor relevancia clínica que las codifican. Las enzimas están codificadas por genes que pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano, en plásmidos o en ambos (rojo, azul y verde, respectivamente) Adaptada de las referencias 164 y 195.

Grupo de Bush-Jacoby	Clase molecular	Sustrato hidrolizado	Enzimas
1	C	Cefalosporinas	AmpC, ACT-1, CMY-2, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	CMY-37
2a	A	Penicilinas	PC1
2b	A	Penicilinas y cefalosporinas tempranas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactams	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactams	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina y cefepime	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemas	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	CepA, CfxA
2f	A	Carbapenemas	KPC-2, SME-1
3a	B	Todos los β -lactámicos excepto aztreonam	IMP-1, VIM-1, CcrA, L1, GOB-1, FEZ-1
3b	B	Carbapenemas	CphA, Sfh-1

Las β -lactamasas de grupo 1 coinciden con el grupo C de Ambler¹⁹². Son cefalosporinasas codificadas en gran medida por *ampC*¹⁶⁴. Estas enzimas pueden conferir resistencia a cefalosporinas tempranas si se sintetizan de manera basal. Una producción elevada de la enzima puede aumentar la capacidad de resistencia y extenderla a penicilinas y a la mayoría de cefalosporinas^{196,197}.

Las β -lactamasas del grupo 2 incluyen las serina-carbapenemasas y las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y agrupa las clases A y D de Ambler. Las enzimas de este grupo son generalmente inhibidas por el ácido clavulánico, por tazobactam y, en menor medida, por sulbactam¹⁹⁵, aunque existen algunas variantes de TEM-1 y de SHV-1 que tienen una afinidad reducida a los inhibidores de β -lactamasas si bien también confieren un escaso nivel de resistencia¹⁹⁸. Las BLEEs, que incluyen las enzimas TEM, SHV y CTX-M, pueden hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro, como la CTX, aztreonam, penicilinas y cefalosporinas tempranas¹⁶⁴. Las serina-carbapenemasas confieren un perfil de resistencia parecido al de las BLEEs y además son capaces de hidrolizar carbapenemas¹⁹⁹. Los genes que codifican para serina-carbapenemasas, como OXA, han sido encontrados en plásmidos que codifican también para genes de resistencia a otros antibióticos, confiriendo resistencia a prácticamente todas las clases de antibióticos²⁰⁰.

Las β -lactamasas del grupo 3, también llamadas metalo- β -lactamasas, contienen uno o dos iones de zinc en su centro activo para catalizar la hidrólisis del antibiótico¹⁹⁹. Pueden hidrolizar distintos β -lactámicos, incluyendo carbapenemas y solo son inactivadas mediante quelantes que no tienen utilidad clínica²⁰¹. En un principio se describieron como cromosómicas, pero en los años 90 se identificó un plásmido que codificaba para metalo- β -lactamasas, facilitando su diseminación y provocando que se hayan convertido en una importante fuente de resistencia a carbapenemas en Asia y sur de Europa^{164,202}.

En la clasificación original de 1995, Bush *et al.* crearon un cuarto grupo, en el que se incluyeron aquellas penicilinasas que podían hidrolizar, entre otras, la cloxacilina y a su vez presentaban altos niveles de resistencia a ácido clavulánico¹⁹⁵. En la revisión de la clasificación de 2010, el grupo 4 fue eliminado al asumirse que estas penicilinasas deberían ser incluidas en otro grupo una vez caracterizadas en profundidad²⁰³.

1.4 Macrólidos

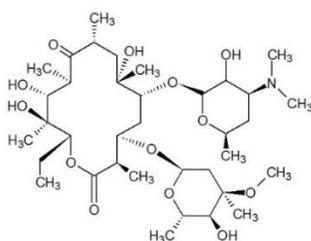
Los macrólidos fueron descubiertos en 1949 por J.M. McGuire, que aisló la eritromicina (ERY) de *Saccharopolyspora erythraea*, un actinomiceto proveniente de muestras de suelo obtenidas de Filipinas²⁰⁴. Estos antibióticos tienen como núcleo un anillo lactona de 14, 15 o 16 miembros²⁰⁵. De entre los macrólidos naturales de 14 miembros cabe destacar a la ERY como principal exponente junto con la oleandomicina, la cual también ha tenido cierta repercusión clínica²⁰⁶. Los macrólidos naturales de 16 miembros incluyen dos subfamilias dependiendo de las sustituciones que presenten en el anillo lactona: la subfamilia tilosina y la subfamilia leucomicina-espíramicina^{207,208}. De esta última, la josamicina ha sido ampliamente utilizada²⁰⁶ y la espíramicina se ha usado en veterinaria, ganadería y en algunas aplicaciones humanas²⁰⁹⁻²¹¹. La ERY posee varias limitaciones, entre las que se encuentran la inestabilidad química (especialmente en condiciones ácidas) y el bajo grado de biodisponibilidad oral²⁰⁵. Para solucionar estas carencias se diseñaron los macrólidos semi-sintéticos²¹², ya fuera modificando el amino azúcar unido al grupo 5-hidroxil²¹³ o mediante cambios estructurales del anillo lactona²¹⁴. Como resultado de estas modificaciones aparecieron macrólidos como la roxitromicina, la diritromicina y la claritromicina²¹⁵⁻²¹⁷, que subsanaron parcialmente las carencias de la ERY y ampliaron su espectro de acción²⁰⁵. En los macrólidos de 16 miembros también se hicieron modificaciones, sintetizando macrólidos como la miocamicina y la rokitamicina, con las que se lograron mejoras como mayores concentraciones en los tejidos, mayor nivel de biodisponibilidad oral, más eficacia frente a microorganismos susceptibles y tolerancia por parte de los pacientes^{218,219}. Los macrólidos de 15 miembros se sintetizaron mediante la inserción de un átomo de nitrógeno en el anillo lactona de la ERY, dando lugar a la AZM, antibiótico de la subclase de las azalidas²²⁰. La AZM es un antibiótico ampliamente utilizado con un espectro de acción aumentado respecto a la ERY y con propiedades inmunomoduladoras que han propiciado su uso para el tratamiento de numerosas infecciones²²¹⁻²²³.

1.4.1 Clasificación

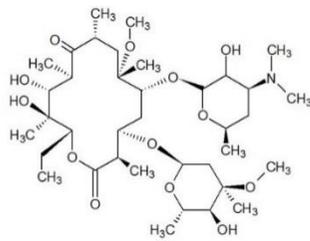
Los macrólidos mencionados en esta introducción (Figura 14) se clasifican según el número de miembros de su anillo lactona y de su origen natural o semisintético:

- i. Grupo 1: macrólidos de 14 miembros.
 - a. Naturales: ERY y oleandomicina.
 - b. Semisintéticas: claritromicina, diritromicina y roxitromicina.
- ii. Grupo 2: macrólidos de 16 miembros.
 - a. Naturales: espiramicina y josamicina.
 - b. Semisintéticas: miocamicina y rokitamicina.
- iii. Grupo 3: macrólidos de 15 miembros.
 - a. Semisintéticas: AZM.

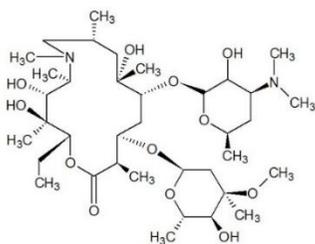
1.4.2 Estructura química



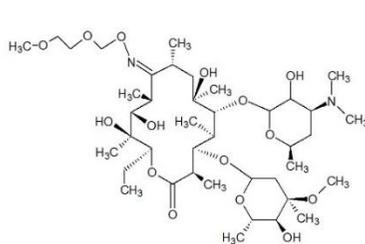
Eritromicina



Clarithromicina



Azitromicina



Roxitromicina

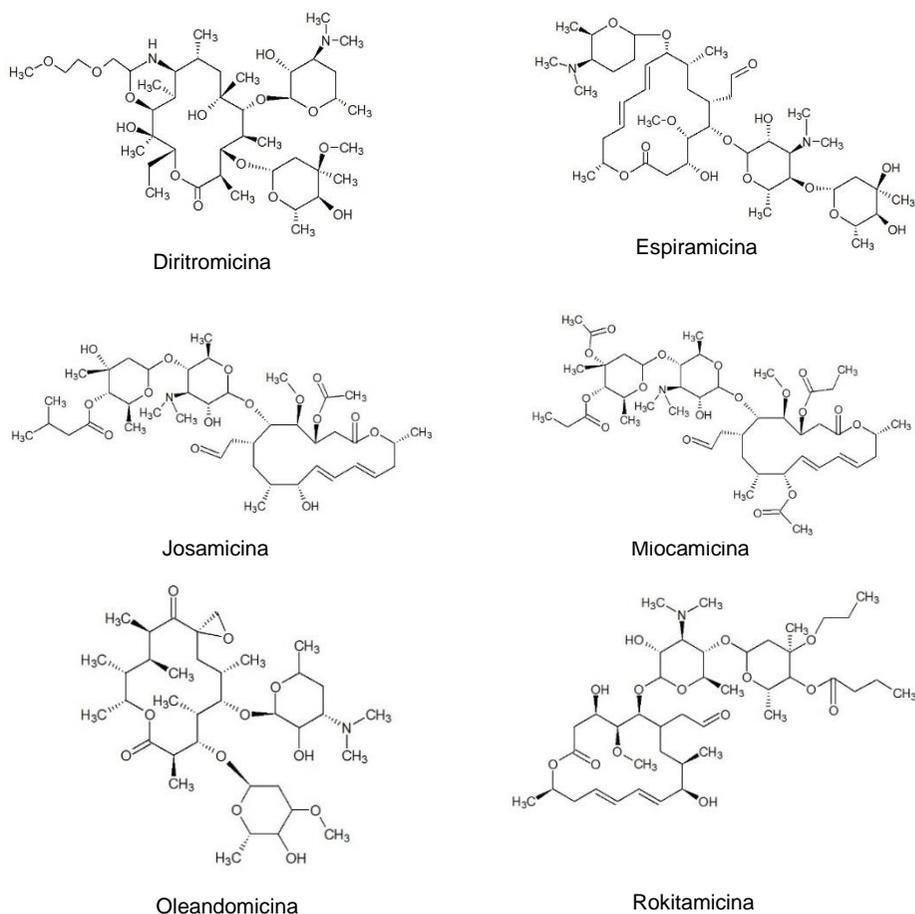


Figura 14. Estructura química de los macrólidos mencionados en esta introducción.

1.4.3 Mecanismo de acción

Al igual que las TETs, los macrólidos tienen un efecto bacteriostático sobre las bacterias susceptibles. Su efecto antimicrobiano se basa en la inhibición de la síntesis proteica, impidiendo a los ribosomas que traduzcan RNA mensajero. Los macrólidos se unen al 23S rRNA de la subunidad ribosomal 50S en el canal de salida del péptido nascente, bloqueando su salida y estimulando la disociación del tRNA del ribosoma durante la translocación^{164,224}. Además, los macrólidos pueden interferir en el ensamblado de la subunidad 50S, inhibiendo la síntesis proteica mediante dos mecanismos

simultáneos¹⁶⁴. La unión del antibiótico con el ribosoma se da principalmente por el anillo de lactona del macrólido, que se une a la pared del canal de salida y orienta el azúcar desosamina del antibiótico hacia el centro peptidil transferasa. La orientación del antibiótico dentro del ribosoma puede variar entre especies bacterianas y entre distintos macrólidos, y estas diferencias dan lugar a distintos espectros de acción^{164,225,226}.

1.4.4 Usos de los macrólidos

Los macrólidos son una opción válida para el tratamiento de ciertas infecciones (Tabla 5) y también han tenido un rol muy importante como alternativa a las penicilinas en aquellos pacientes alérgicos o frente a microorganismos resistentes²⁰⁵.

En odontología son varios los macrólidos que han sido utilizados eficazmente²⁰⁶, especialmente la ERY y la AZM. La ERY se indica en casos de infecciones endodónticas como alternativa a las penicilinas²²⁷ y la AZM se ha propuesto en los últimos años como coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis^{221,228}. La efectividad de la AZM se debe a su eficacia para penetrar en el biofilm oral y actuar durante largo tiempo debido a su larga vida media, a su capacidad de alcanzar a la zona de inflamación gracias a su transporte mediado por macrófagos y neutrófilos²²⁹ y a su potencial inumomodulador^{221,230}. Esta última habilidad le permite disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias producidas por los macrófagos al provocarles un cambio fenotípico, lo cual se traduce en una disminución de la inflamación en el lugar de infección²³⁰. Los efectos antibacterianos de la AZM se prolongan hasta 14 días después de la toma del antibiótico, pero las propiedades inumomoduladoras pueden alargarse entre 2 y 3 meses y los efectos derivados de esta modulación pueden detectarse hasta 12 meses después²²¹.

Tabla 5. Lista de infecciones tratadas con macrólidos. Adaptada de las referencias 161 y 199.

Tipo de infección	Macrólidos usados
Infecciones del tracto respiratorio superior	
Faringitis bacteriana	Azitromicina, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, rokitamicina, espiramicina, miocamicina, diritromicina
Sinusitis maxilar aguda	Azitromicina, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, espiramicina
Otitis media aguda	Azitromicina, claritromicina (uso pediátrico)
Infecciones del tracto respiratorio inferior	
Exacerbación aguda bacteriana de la enfermedad pulmonar crónica obstructiva	Azitromicina, roxitromicina
Exacerbación aguda bacteriana de la bronquitis crónica	Claritromicina, roxitromicina, miocamicina, diritromicina
Neumonía bacteriana adquirida en la comunidad	Azitromicina, claritromicina, roxitromicina, rokitamicina, espiramicina, miocamicina
Infecciones de la piel y tejidos blandos	
	Azitromicina, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, rokitamicina, espiramicina, miocamicina, diritromicina
Infecciones genitales	
	Azitromicina, eritromicina, roxitromicina, rokitamicina, espiramicina
Infecciones por micobacterias en pacientes con Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	
	Claritromicina

1.4.5 Resistencia a macrólidos

La resistencia a macrólidos puede darse por 3 mecanismos: metilación del ribosoma por un conjunto de metiltransferasas codificadas por los genes *erm* (i), expulsión del antibiótico por bombas de flujo codificadas por los genes *msr*, *mef* y *mre* (ii); e inactivación del antibiótico mediante enzimas codificadas por los genes *ere* y *mph* (iii).

- i. Los genes *erm* codifican para metiltransferasas, las cuales metilan el punto de unión del macrólido con el 23S rRNA. La metilación del ribosoma también confiere resistencia a lincosamidas y a estreptograminas, ya que estos antibióticos comparten puntos de anclaje^{231,232}. Hasta la fecha, se han descrito 42 *erm* metiltransferasas¹⁴⁷, basadas en un criterio de homología en el que para ser consideradas enzimas distintas, deben presentar menos de un 80% de homología en la secuencia aminoacídica respecto a cualquier otra metiltransferasa descrita²³³.
- ii. Las bombas de flujo impiden la acumulación del antibiótico en el interior de la célula. Los genes *mef(A)*, *mef(E)* y *mre(A)* codifican para bombas de flujo impulsadas por gradiente de protones. Estas bombas confieren resistencia a macrólidos de 14 y 15 miembros y, en menor medida, de 16 miembros^{232,234–236}. Los genes *msr* codifican para bombas de flujo dependientes de ATP que confieren resistencia a macrólidos y a estreptogramina B²³⁷. La resistencia que se presenta a través de los genes *msr* puede ser variada, puesto que *msr(A)* confiere resistencia a macrólidos de 14 miembros, mientras que una variante llamada *msr(SA')* añade resistencia a macrólidos de 16 miembros^{236,237}.
- iii. Los genes *ere* codifican para estererasas que degradan la ERY^{238,239}, las cuales son enzimas que degradan macrólidos y son específicas de sustrato. Poseen escasa prevalencia en comparación con las metiltransferasas o las bombas de flujo²³⁶. Por otra parte, los genes *mph* codifican para fosfotransferasas que, en

lugar de degradar el antibiótico, lo modifican a una versión inactiva. Cada gen *mph* da lugar a enzimas con distinta afinidad para macrólidos de 14 o 16 miembros con la excepción de *mph*(B), que puede degradar ambos tipos²⁴⁰⁻²⁴².

Objetivos

2. Objetivos

Las resistencias a antibióticos son un problema global que afecta gravemente la medicina moderna. Su diseminación entre bacterias ocurre a una velocidad mayor a la del diseño de nuevos antibióticos. Si bien la tendencia actual nos lleva a una era llamada “post-antibiótica”, el esfuerzo en la investigación de nuevos antibióticos y la implementación de medidas para el correcto uso de los actuales son acciones claves para el mantenimiento prolongado o incluso reversión de la situación actual.

Entre las medidas propuestas está la monitorización de los genes de resistencia y las bacterias que los contienen, lo cual es clave para entender el alcance de las resistencias a antibióticos en poblaciones concretas. Ésta permite a los facultativos elegir la mejor terapia antibiótica teniendo en cuenta factores de resistencia y la propagación. Además, la monitorización de genes de resistencia permite saber qué antibióticos, dentro de una misma clase, podrían ser ineficaces ante la presencia de dichos genes, proporciona conocimiento acerca de su transferencia y de las especies bacterianas que serán las más proclives a presentarlos.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue ampliar el conocimiento sobre las resistencias a antibióticos en la microbiota bucal. Para ello se hicieron 6 estudios que pretendían:

- Analizar la microbiota resistente a TET en individuos sanos y pacientes con periodontitis y determinar las diferencias de dicha microbiota entre las dos poblaciones (**capítulos 1-4**).
- Analizar la correlación entre la presencia de genes de resistencia a macrólidos y la resistencia a AZM y ERY en bacterias del género *Prevotella* aisladas de pacientes con periodontitis (**capítulo 5**).

- Analizar la resistencia a β -lactámicos en la microbiota subgingival de pacientes con periodontitis (**capítulo 6**).

Capítulo 1

**Genes de resistencia a antibióticos en la microbiota
aislada de muestras subgingivales de sujetos sanos**

3. Genes de resistencia a antibióticos en la microbiota aislada de muestras subgingivales de sujetos sanos

3.1 Resumen

Actualmente, y debido a la aparición de resistencias por el uso extensivo de TETs, éstas están restringidas al tratamiento de ciertas infecciones causadas por microorganismos que todavía son sensibles a su acción. En este estudio se analizó la microbiota subgingival resistente a tetraciclina de individuos sanos sin periodontitis, escasamente estudiada en individuos españoles, con el objetivo de extender el conocimiento sobre la distribución en la microbiota bucal de diferentes genes de resistencia a tetraciclina. Para ello se tomaron 129 muestras subgingivales de las que se obtuvieron 448 aislados de bacterias resistentes a TET. A estas bacterias se les realizó un *screening* de genes de resistencia a TET, así como a genes indicadores de la presencia de elementos genéticos móviles. Finalmente, en los aislados resistentes a TET se analizó la multirresistencia a otros antibióticos.

Los resultados mostraron un elevado porcentaje de muestras con bacterias resistentes a TET, la mayoría de ellas pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Prevotella*, sugiriendo que dichas resistencias se encuentran ampliamente distribuidas entre la población. La mayoría de los aislados resistentes a TET portaron genes de resistencia a este antibiótico, siendo *tet(M)* el gen más frecuentemente encontrado. Por otro lado, la prevalencia de el gen *intTn*, que codifica para una integrasa de transposones conjugativos, se encontró presente en la mayoría de los aislados, indicando la capacidad del ambiente oral de ser un reservorio de genes de resistencia a antibióticos. Finalmente, la multirresistencia a antibióticos fue observada en cerca del 90% de los aislados obtenidos.

3.2 Introducción

El uso y abuso de antimicrobianos ha llevado a las bacterias a mantener un gran número de genes de resistencia a antibióticos en su genoma. Diferentes partes del cuerpo humano, incluyendo la boca, pueden ser consideradas como reservorios de estos genes dado su alto nivel de colonización bacteriana. La microbiota oral humana puede incluir hasta 19.000 filotipos, pertenecientes a una amplia variedad de géneros que habitan distintos nichos de la cavidad bucal y que en su mayoría se consideran comensales³. Una gran parte de los estudios de genes de resistencia en la microbiota oral se han llevado a partir de un *pool* de muestras obtenidas de distintos nichos orales^{243,244}, detectando genes de resistencia a macrólidos como *erm*(F) y *erm*(B), β-lactamasas como *bla*_{CfxA}, y genes de resistencia a TET^{42,245–248}. En España, la presencia de genes de resistencia en el ambiente oral ha sido pobremente estudiada, con solo dos estudios reportando la presencia de *erm*(F) y *tet*(Q) en los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*²⁴⁹. Sin embargo, esta información puede no ser extrapolable a otros países, puesto que se han encontrado diferencias al estudiar resistencias a antibióticos y su prevalencia en el ambiente oral según el origen geográfico de las muestras^{243,250,251}. Organismos como el European Center for Disease Prevention and Control han sugerido que el estudio de las prevalencias de resistencias a antibióticos suponen una herramienta necesaria para combatir las, aportando información acerca de su evolución y sirviendo de indicador sobre la idoneidad de las políticas de control de resistencias a antibióticos que se llevan a cabo²⁵². Además, al realizar *screenings* de genes de resistencia a antibióticos que no se encuentran normalmente en ciertas especies, géneros o incluso ambientes, se podría permitir un mejor entendimiento de como se movilizan estos genes.

En este estudio se realizó un *screening* de 11 genes de resistencia a TET, 1 gen de resistencia a macrólidos y 1 gen relacionado con transposones en un grupo de aislados resistentes a TET obtenidos del área subgingival de 129 sujetos con buena salud oral.

Adicionalmente, la multirresistencia a kanamicina (KAN), ERY, cloramfenicol (CHL), estreptomicina (STR), AMX y CTX fue testada.

3.3 Material y Métodos

3.3.1 Población sujeta a estudio

Se tomaron muestras subgingivales de 129 voluntarios periodontalmente sanos con edades comprendidas entre los 18 y 30 años. Todos eran estudiantes de medicina, enfermería, fisioterapia o de primer o segundo curso de odontología en la Universitat Internacional de Catalunya (Barcelona, España). La toma de muestras se realizó en la Clínica Universitaria Odontológica de la universidad y se vinculó al estudio previamente aprobado por el Comité Ético de la Universitat Internacional de Catalunya (PER-ECL-2011-06-NF). Todos los participantes firmaron un consentimiento informado permitiendo la toma y el análisis de sus muestras.

Los voluntarios debían cumplir los siguientes criterios de inclusión: al menos 6 dientes por cuadrante (excluyendo los terceros molares), sin enfermedades sistémicas tales como diabetes, artritis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, infección por VIH, cáncer, enfermedades cardiovasculares y profundidades de sondaje periodontal de menores de 4 mm. Los voluntarios con las siguientes características no fueron incluidos: mujeres embarazadas, individuos que hubiesen tomado antibióticos 6 meses previos a la toma de la muestra, fumadores de más de 5 cigarrillos al día, individuos con periodontitis moderada o severa (sangrado al sondaje de más del 40%), individuos en tratamiento ortodóntico, con un severo apiñamiento de los dientes o aquellos que portaran implantes en el lugar de muestreo o en el diente adyacente.

3.3.2 Toma de muestra subgingival y cultivo bacteriano

Se tomaron muestras microbiológicas subgingivales de los 4 sitios más profundos de cada cuadrante. La zona fue aislada con rollos de algodón odontológico y se retiraron cuidadosamente los depósitos supragingivales con la ayuda de curetas. Las muestras subgingivales se tomaron insertando una punta de papel absorbente estéril (Absorbent paper point size 30, Denstply, Maillefer, Ballaigues, Suiza) en el surco subgingival durante 20 segundos²⁵³. Una vez tomadas las muestras, las 4 puntas de papel de cada paciente fueron puestas en un vial que contenía 1,5 ml de medio de transporte estéril sin EDTA, que fue reducido previamente y mantenido en frío²⁵⁴. Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su llegada al laboratorio a las pocas horas.

Las muestras subgingivales fueron homogeneizadas mediante vórtex durante 60 segundos. Se hicieron diluciones seriadas y fueron sembradas en agar sangre (Oxoid Nutrient Broth No. 2; Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) con un 5% de sangre de caballo defibrinada, hemina (5 mg/l), menadiona (1 mg/l) y 8 µg/ml de TET (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), y posteriormente incubadas a 37°C en condiciones anaerobias (90% N₂, 5% CO₂ y 5% H₂) durante 72 horas. Para poder obtener el porcentaje de bacterias resistentes a TET respecto al total de microbiota, se incubaron placas con y sin antibiótico bajo las mismas condiciones. De las placas con TET se seleccionaron todas las morfologías coloniales distintas aparecidas. Estas morfologías fueron resemebradas para obtener cultivos líquidos axénicos que se mantuvieron a -80°C en una solución de glicerol al 30%.

3.3.3 Extracción de DNA y secuenciación

Se extrajo el DNA de cada aislado utilizando el kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Las células fueron resuspendidas en 180 µl de una solución de lisozima a 20 mg/ml (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100) e incubadas a

36,5°C durante 30 minutos. Después se añadió 200 µl de Buffer AL (incluido en el kit), 10 µl de RNasa A (20 mg/ml) y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 56°C durante 30 minutos. Los siguientes pasos se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante. Finalmente, el DNA extraído fue resuspendido en 100 µl de Buffer AE (incluido en el kit), visualizado en un gel de agarosa al 0,5% y cuantificado usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000C UV-vis (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

El gen 16S rRNA fue amplificado por PCR usando los primers universales 27F y 1544R (Tabla 6)²⁵⁵. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador T3000 (Biometra, Goettingen, Alemania) bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de: 95°C durante 60 segundos, 57°C durante 60 segundos y 72°C durante 60 segundos; seguido de un ciclo final de 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron usando el kit E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los amplicones se llevó a cabo en Macrogen Inc (Amsterdam, Países Bajos). Las secuencias obtenidas fueron alineadas para formar un solo cóntigo y se identificaron comparándolas con aquellas disponibles en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando el software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 6. Primers y condiciones de PCR utilizadas en este estudio.

Primers	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Tm individual	Tm Multiplex	Grupo de Multiplex	Ref.
27F 1544R	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC	aprox. 1500	57	-	-	255
tetMF tetMR	GCG TAC AAG CAC AGA CTC GT AGC CAT AGC GTA TCC CCT CC	1142	61			253
tetWF tetWR	GAG AGC CTG CTA TAT GCC AGC GGG CGT ATC CAC AAT GTT AAC	168	64	64	1	256
intF intR	GGC TAC AGA CCG AGT ACC AGC GGA ACT TGA CGT TCG CCA CT	684	61			253
ermBF ermBR	GGT AAA GGG CAT TTA ACG AC CGA TAT TCT CGA TTG ACC CA	494	55			257
tetQF tetQR	AGA ATC TGC TGT TTG CCA GTG CGG AGT GTC AAT GAT ATT GCA	167	50			256
tet32F tet32R	GAA CCA GAT GCT GCT CTT CAT AGC CAC GCC CAC ATG AT	620	57	60	2	257
tetLF tetLR	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG	267	55			258
tetOF tetOR	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	515	55			259
tetSF tetSR	GAA AGC TTA CTA TAC AGT AGC AGG AGT ATC TAC AAT ATT TAC	168	50	58	3	256
tet31F tet31R	CAA TCA CGC CCA AAA GAA TGT GCC ATC CCA GTT TGT	564	53			126
tetBF tetBR	AAT AGC CAC TAA ATG GGG CG ATA ACA CCG GTT GCA TTG GT	243	58			253
tetKF tetKR	TCG ATA GGA ACA GCA GTA CAG CAG ATC CTA CTC CTT	169	52,8	56,5	4	258
tet37F tet37R	ATG GTT CGC TAT TAC TCT AAC ATC AGT CTC ATA TTT CGA CA	170	50			253

3.3.4 Análisis *in vitro* de resistencia a antibióticos

Se determinó la resistencia a AMX, CTX, KAN, ERY, CHL y STR en todos los aislados utilizando placas de agar sangre con un 5% de sangre de caballo desfibrinada, hemina (5 mg/ml), menadiona (5 mg/l) y suplementadas con cada antibiótico (todos obtenidos de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a las concentraciones de corte que proporcionan el CLSI y el EUCAST (ver anexo I). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 horas en condiciones anaerobias.

3.3.5 Detección de genes de resistencia a antibióticos

Para la detección de genes de resistencia a antibióticos se empleó la técnica de PCR multiplex tal y como se ha descrito anteriormente²⁵³. Las condiciones y la lista de primers se pueden consultar en la tabla 6. El resultado de las PCRs multiplex se visualizó en geles de agarosa al 2%, tal y como se observa en el ejemplo de la figura 15. El DNA de los aislados positivos para los genes estudiados fue utilizado como control positivo en todas las reacciones de PCR. Los controles positivos fueron confirmados mediante secuenciación (Macrogen Inc, Amsterdam, Países Bajos) y las secuencias fueron analizadas mediante el software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.4 Resultados

Se obtuvieron 448 aislados resistentes a TET a partir de 129 muestras subgingivales provenientes de sujetos periodontalmente sanos, promediando entre 3 i 4 morfologías distintas por individuo (Figura 15). Se pudieron aislar bacterias resistentes a TET en 112 muestras (86,82%), mientras que no se detectó resistencia en 17 muestras (13,18%). El promedio de carga bacteriana fue de 5,64 log₁₀ unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) ($\pm 0,8$) y el promedio de carga bacteriana resistente a TET fue de 3,66 log₁₀ ufc/ml ($\pm 1,63$). Cada aislado fue identificado mediante la secuenciación de su gen 16S rRNA, observando 36 especies pertenecientes a 13 géneros distintos. *Streptococcus* fue el género con el mayor número de aislados (n=340), siendo *S. oralis* (n=66) y *S. intermedius* (n=49) las especies más aisladas (Tabla 7). De los estreptococos identificados a nivel de especie (n=326), un 88.34% (n=288) pertenecían al grupo Viridans. El género *Prevotella*, con 25 aislados, fue el segundo más detectado e incluía las especies *Prevotella intermedia*, *Prevotella bivia*, *Prevotella nigrescens* y *Prevotella denticola*.



Figura 15. Fotografía de distintas morfologías bacterianas crecidas en una placa de agar sangre con TET.

Los cultivos bacterianos fueron resembrados en placas con antibiótico para determinar la susceptibilidad de cada aislado a 6 antibióticos (AMX, CTX, ERY, KAN, CHL y STR). La resistencia a KAN y ERY fue la más prevalente, con un porcentaje de aislados del 77,68% y 69,42%, respectivamente. La resistencia a STR, CHL, AMX y CTX fue menos prevalente, con el 20,09%, 18,75%, 15,85% y 8,04%, respectivamente. La mayoría de los aislados (89,29%) fueron resistentes a otros antibióticos además de a TET. El 40% fueron resistentes a 2 antibióticos más, y el 0,7% fueron resistentes a todos los antibióticos testados. El 31,39% de los estreptococos del grupo viridans fueron resistentes a 3 o más antibióticos (n=86). En el resto de aislados, la resistencia a 3 o más antibióticos se observó en el 22,41% (n=39). Adicionalmente, se analizaron los patrones de multirresistencia de los aislados, pudiendo observar 39 patrones distintos. De éstos, el que confería resistencia a ERY, KAN y TET fue el más observado (29,24%), seguido de la multirresistencia a KAN y TET (10,04%) y a ERY, KAN, CHL y TET (9,38%).

Para la detección de 11 genes de resistencia se utilizó la técnica de PCR multiplex (Tabla 7). Los genes de resistencia más prevalentes fueron *tet(M)* y *erm(B)*, presentes en el 65,85% y 58,26% de los aislados, aunque el gen más detectado fue el gen *intTn* (Figura 16), presente en el 81,92% de los aislados. Los genes *tet(L)*, *tet(31)* y *tet(37)* no fueron detectados (Figura 17). En los estreptococos del grupo viridans, los genes más detectados fueron *tet(M)* (96,61%), *erm(B)* (66,79%) y *tet(W)* (14,23%). Cerca del 60% de estos estreptococos presentaron un solo gen de resistencia a TET, y un 25,18% portaron 2 o más.

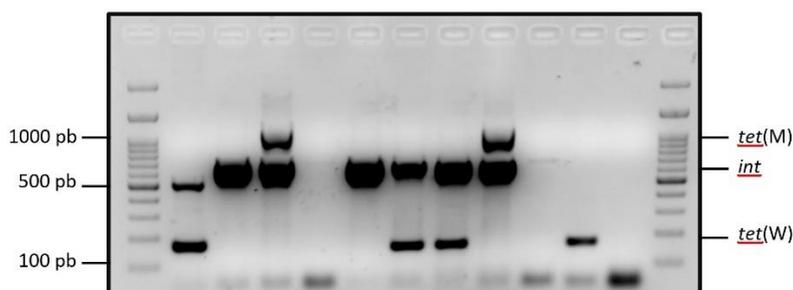


Figura 16. Gel de agarosa al 2% donde se visualizaron los resultados de PCR, concretamente los obtenidos de una multiplex del grupo 1. En los carriles extremos se observa el marcador de tamaño molecular de 100 pb. Se observan los amplicones obtenidos en diferentes aislados correspondientes a los genes *tet(M)* (1142 pb), *tet(W)* (168 pb) e *intTn* (684 pb).

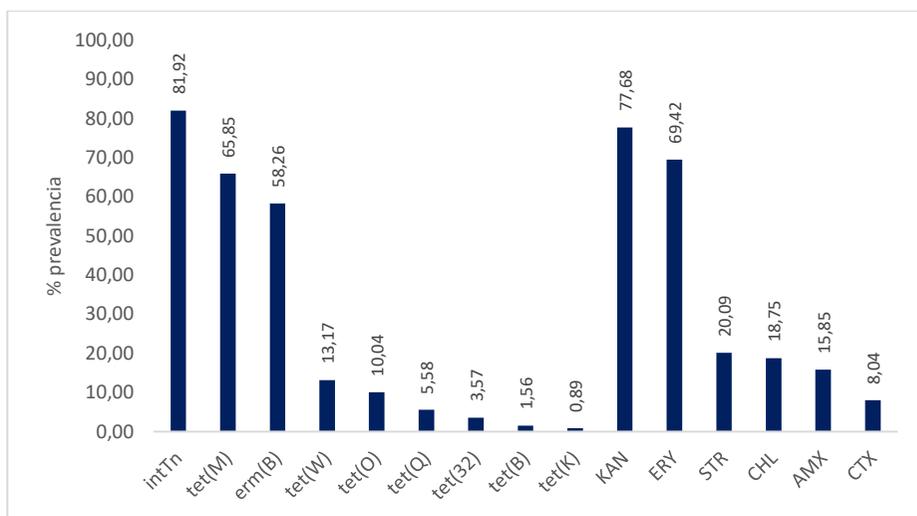


Figura 17. Prevalencias totales de los genes de resistencia y de las resistencias fenotípicas analizadas en este estudio.

Tabla 7. Listado de especies aisladas e identificadas en este estudio, con el número (N) de aislados de cada especie y el número de aislados portadores de cada gen de resistencia y resistentes a los 6 antibióticos testados.

Especies	Genes de resistencia											Número de aislados						Resistencias fenotípicas					
	N	int1n	tet(W)	tet(O)	tet(M)	tet(31)	tet(32)	tet(B)	tet(L)	tet(S)	tet(Q)	tet(37)	tet(K)	erm(B)	AMX	CTX	ERY	KAN	CHL	STR			
																					Resistencias fenotípicas		
<i>A. defeciva</i>	5	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	5	2	1	0			
<i>B. cereus</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0			
<i>Butyrvibrio</i> sp	4	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	4	0	2			
<i>E. saburreum</i>	3	2	1	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	3	0	1			
<i>G. haemolyans</i>	13	13	1	0	8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	5	4	4	0			
<i>G. adiacens</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0			
<i>H. parainfluenzae</i>	4	2	1	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	3	0	0	4	1	0	0			
<i>N. subflava</i>	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	1			
<i>P. bivia</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	2	2	1	1			
<i>P. denticola</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0			
<i>P. intermedia</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1	0	11	9	7	11	1	9	9			
<i>P. nigrescens</i>	9	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	3	6	7	7	0	3			
<i>R. dentocariosa</i>	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0			
<i>R. epidermidis</i>	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4	0	2	0	3			
<i>S. anginosus</i>	17	15	1	4	10	0	3	0	0	0	0	0	0	14	1	14	17	9	6	6			
<i>S. australis</i>	5	3	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	5	4	0	0			
<i>S. constellatus</i>	10	10	0	0	7	0	3	0	0	0	0	0	0	7	0	0	8	6	8	2			
<i>S. cristatus</i>	10	9	0	1	7	0	1	0	0	0	0	0	0	7	1	1	5	5	1	0			
<i>S. gordonii</i>	15	15	4	0	12	0	1	0	0	0	1	0	0	9	1	1	9	12	5	4			
<i>S. infantis</i>	4	3	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	3	0	1			
<i>S. intermedius</i>	49	48	12	10	39	0	1	0	0	0	0	0	0	40	7	0	38	38	13	8			
<i>S. massiliensis</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1			
<i>S. mitis</i>	42	34	7	4	30	0	1	0	0	2	0	0	0	19	6	4	23	32	6	6			
<i>S. oralis</i>	66	61	7	9	54	0	1	2	0	0	0	0	0	41	3	0	40	61	7	17			
<i>S. parasanguinis</i>	5	4	1	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	1	0	0			
<i>S. pneumoniae</i>	34	26	1	4	25	0	1	0	0	0	0	0	0	15	7	0	17	26	3	8			
<i>S. pseudopneumoniae</i>	18	14	4	4	10	0	0	0	0	1	0	0	0	7	3	0	13	18	3	1			
<i>S. salivarius</i>	9	9	2	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	9	2	0	8	9	2	0			
<i>S. sanguinis</i>	35	35	5	0	26	0	0	0	0	0	0	0	0	28	6	4	27	30	9	3			
<i>S. sinensis</i>	5	3	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	3	1	1			
<i>S. tigurinus</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0			
<i>Streptococcus</i> sp	14	14	0	0	13	0	0	0	0	1	0	0	0	13	1	0	12	14	0	1			
<i>V. parvula</i>	4	4	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	4	2	1	1			
<i>V. ratti</i>	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	1			
<i>V. rogosa</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0			
<i>V. sp</i>	5	4	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	5	2	1	2			
No determinado	27	24	3	0	17	0	0	0	0	3	0	0	0	20	7	0	27	20	3	7			
Total	448	367	59	45	295	0	16	7	0	1	25	0	4	261	71	36	311	348	84	90			

3.5 Discusión

Las TETs son antibióticos de amplio espectro recomendadas para el tratamiento de algunas infecciones comunes¹¹¹. En la cavidad oral se han usado como monoterapia o como adyuvante a la terapia de RAR para el tratamiento de la periodontitis, obteniendo distintos grados de éxito⁹⁴.

La literatura que describe los patrones de resistencia en la microbiota subgingival de pacientes sanos es escasa^{251,260}. La mayoría de estudios se han orientado al análisis de la resistencia a uno o más antibióticos en aislados obtenidos principalmente de muestras de endodoncias o subgingivales de pacientes con periodontitis^{250,261}. Sin embargo, este tipo de análisis no proporciona información acerca de los genes de resistencia y de los mecanismos involucrados en su potencial distribución a otras bacterias. En este estudio obtuvimos 448 aislados de bacterias orales resistentes a TET de 129 sujetos periodontalmente sanos con una media de edad de 21,5 años, los cuales no habían tomado antibióticos en los 6 meses previos al inicio del estudio. En estos aislados se estudió la presencia de 11 genes de resistencia a TET, así como el gen *erm(B)* y el gen *intTn*, los cuales pueden encontrarse juntos en transposones conjugativos de la familia Tn916-like⁴². Trescientos noventa y ocho aislados fueron identificados a nivel de especie, 23 a nivel de género y 27 no pudieron ser identificados. Además, se determinó la susceptibilidad a ERY, KAN, CHL, STR, CTX y AMX.

La secuenciación del gen 16S rRNA confirmó que la mayoría de las bacterias aisladas eran comensales, con el 61,16% de estreptococos del grupo viridans. *Veillonella*, *Prevotella* y *Gemella* fueron los principales géneros encontrados por detrás de *Streptococcus*. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que se centra en analizar la microbiota subgingival de sujetos sanos resistente a TET. Si bien es cierto que en un estudio previo²⁴³ se aislaron y analizaron bacterias resistentes a TET obtenidas de la saliva y de la placa supra y subgingival de pacientes sanos, dichas

bacterias fueron aisladas a partir de un pool de muestras, sin poder determinar de qué nicho oral provenía cada aislado. En nuestro estudio, el porcentaje de estreptococos fue 2,15 veces mayor, y el porcentaje de bacterias anaerobias gramnegativas fue 1,61 veces menor que en el estudio anteriormente citado. Con estos resultados, y dado que las bacterias anaerobias gramnegativas tienen relación con la enfermedad periodontal²⁶², se podría inferir que las bacterias resistentes a TET aisladas de la saliva pueden estar más relacionadas con la enfermedad periodontal, que aquellas aisladas de muestras subgingivales en individuos sanos. Sin embargo, dichas comparaciones tienen que ser tomadas con cautela debido a la diferencia metodológica entre ambos estudios y al distinto origen geográfico de las muestras.

La presencia de genes de resistencia a macrólidos ha sido descrita en microorganismos aislados de distintos nichos orales²⁶³⁻²⁶⁵. Sin embargo, la prevalencia de estos genes puede variar, y esta variación parece depender de la población estudiada. Por ejemplo, en muestras de saliva de sujetos británicos sanos no se encontró ningún gen de resistencia a macrólidos, mientras que en individuos italianos y finlandeses tanto *erm(B)* como *erm(F)* fueron encontrados con alta frecuencia²⁶⁶. *erm(B)* se ha encontrado previamente en *S. mutans*, *S. oralis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus anginosus* y *Streptococcus bovis* aislados del ambiente oral²⁶⁷, pero la presencia de *erm(B)* en la microbiota subgingival de sujetos sanos no está bien documentada²⁶⁸. En nuestro estudio, el 88,5% de los voluntarios (n=114) portaba al menos un aislado resistente a ERY y, de éstos, el 78,95% portaban *erm(B)*. El gen *erm(B)* fue detectado en todos los géneros excepto en los géneros *Prevotella*, *Rothia* y *Gemella*. En los estreptococos del grupo viridans, este gen fue frecuentemente detectado en todas las especies, con mayor frecuencia en *S. intermedius*, *S. anginosus*, *Streptococcus sanguinis* y *S. oralis*. El elevado porcentaje de aislados resistentes a ERY es sorprendente teniendo en cuenta que algunos informes señalan una disminución de la resistencia a macrólidos en algunas

poblaciones europeas, particularmente en especies clínicamente importantes del género *Streptococcus*, incluyendo *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*^{269,270}.

En este estudio, los genes *tet* más representados fueron aquellos que codifican para proteínas de protección ribosomal [*tet*(M), *tet*(W), *tet*(O), *tet*(Q) y *tet*(32)], mientras que los genes que codifican para bombas de flujo fueron detectados con menor frecuencia [*tet*(B) y *tet*(K)]. Los genes *tet*(31) y *tet*(L) (que codifican para bombas de flujo) y *tet*(37) (que codifica para una enzima de inactivación) no fueron detectados. En estudios previos, los genes *tet* más prevalentes en la microbiota subgingival han sido *tet*(Q), *tet*(M), *tet*(O) y *tet*(W)^{42,243,253}. Villedieu *et al.* observaron que el gen *tet*(M) fue el más prevalente en aislados obtenidos de una mezcla de saliva y placa supra y subgingival obtenida de individuos sanos²⁴³. En nuestro estudio obtuvimos el mismo resultado partiendo de muestras subgingivales. El gen *tet*(M) se encontró principalmente en especies del género *Streptococcus* pertenecientes al grupo viridans, así como en los géneros *Gemella* y *Veillonella*. Sin embargo, a diferencia de lo descrito previamente, los genes *tet*(W) y *tet*(O) no fueron detectados en una alta frecuencia, con porcentajes del 13,17% y 10,04%, respectivamente. No obstante, la baja presencia de *tet*(Q) (5,58%) es consistente con lo descrito previamente^{264,271}, puesto que este gen fue encontrado repetidamente en bacterias gramnegativas. Al igual que en otros estudios, *tet*(Q) fue principalmente localizado en bacterias del género *Prevotella*²⁴⁵, aunque también se detectó en algunos aislados del género *Streptococcus*. El 21% de los aislados no fueron portadores de ninguno de los genes de resistencia a TET analizados. De estos aislados, *S. intermedius*, *S. oralis* y *S. sanguinis* fueron las especies más comunes, representando cada una aproximadamente un 10% de este grupo. La resistencia a TET en estos aislados podría ser aportada por otros genes de resistencia o por mecanismos que no se han analizado en este estudio, y por lo tanto sería recomendable ampliar la investigación para esclarecer la causa de esta resistencia.

La familia de transposones conjugativos Tn916/1545-like están ampliamente distribuidos entre distintos filos bacterianos y promueven la transferencia de genes de resistencia entre bacterias tanto patógenas como comensales^{272,273}. Pese a que es sabido que los microorganismos aislados de la saliva o de muestras nasofaríngeas poseen elementos Tn916-like²⁷⁴, la presencia de estos elementos en la microbiota subgingival no ha sido ampliamente estudiada. Genes de resistencia a TET, macrólidos y aminoglicósidos suelen ser genes accesorios de algunos elementos de esta familia de transposones²⁷⁵. En nuestros aislados observamos una alta prevalencia de los genes *tet(M)* (65,85%), *erm(B)* (58,26%) e *intTn* (81,92%) así como un alto número de aislados resistentes a KAN y ERY. La presencia de *intTn* puede ser relacionada con la presencia de elementos Tn916-like, y por lo tanto, como otros han sugerido anteriormente, confirmaría al ambiente oral como un reservorio de genes de resistencia a antibióticos⁴².

En resumen, en este estudio realizamos un *screening* de microbiota subgingival resistente a TET en individuos periodontalmente sanos. Observamos un alto porcentaje de bacterias comensales multirresistentes, las cuales eran portadoras de un amplio rango de genes de resistencia a TET. Algunos autores consideran que estas bacterias pueden ser un reservorio de genes de resistencia a antibióticos que además poseen los mecanismos para transferirlos a otras bacterias, entre ellas patógenas^{111,273,276}. De hecho, numerosos estudios han probado que un incremento en la presión selectiva, resultante del uso y abuso de antibióticos, ha causado un incremento en la transferencia horizontal de genes de resistencia^{111,277}. El aumento de cepas multirresistentes, tanto comensales como patógenas, se ha vuelto evidente en algunos nichos como el intestinal²⁷⁸. Por lo tanto, se necesitan más estudios que profundicen en la distribución de resistencias a antibióticos de la microbiota de la cavidad oral, teniendo en cuenta que ésta constituye una puerta de entrada para los microorganismos hacia otros nichos del cuerpo.

Capítulo 2

**Genes de resistencia a antibióticos en la microbiota
aislada de muestras subgingivales de pacientes
con periodontitis crónica**

4. Genes de resistencia a antibióticos en la microbiota aislada de muestras subgingivales de pacientes con periodontitis crónica

4.1 Resumen

El tratamiento de la periodontitis puede requerir de la administración de antibióticos, y las TETs son, junto con los macrólidos y los β -lactámicos, una de las opciones antimicrobianas más utilizadas. Para conocer el nivel de resistencia a TET de la microbiota subgingival presente en pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica, se tomaron 130 muestras subgingivales. Se obtuvieron 365 aislados de bacterias resistentes a TET a las que se les realizó un *screening* de genes de resistencia y genes indicadores de presencia de elementos genéticos móviles. También se analizó la multirresistencia de los aislados obtenidos.

Los resultados mostraron un elevado número de muestras con bacterias resistentes a TET, que además presentaron resistencia a otros antibióticos como la ERY y la KAN. Las bacterias resistentes a TET pertenecían principalmente a los géneros *Streptococcus* y *Prevotella*. Se encontraron genes de resistencia a TET en gran parte de las muestras, pero las prevalencias observadas fueron distintas a las descritas por otros estudios con muestras obtenidas de distintos lugares geográficos, indicando que ésta podría ser una importante variable a la hora de determinar la distribución de genes de resistencia y la microbiota que los presenta.

4.2 Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible de la cavidad bucal causada por desequilibrios en la microbiota oral y la respuesta inmunológica del huésped⁵. Para el tratamiento de esta enfermedad puede ser necesario el uso, como adyuvantes al RAR, de antibióticos tales como los β -lactámicos, nitroimidazoles y TETs⁹⁴. Sin embargo, en los últimos años se ha documentado ampliamente la aparición de bacterias resistentes y multiresistentes ha dado lugar a la aparición de numerosas cepas resistentes que suponen una seria amenaza para la salud pública^{279–281}.

Existen varios mecanismos de resistencia a antibióticos, algunos de ellos codificados en el genoma bacteriano. Algunos de estos genes son transmisibles horizontalmente y el biofilm subgingival es un ambiente idóneo para ello⁴². La diseminación de genes de resistencia puede extenderse más allá de la microbiota oral, puesto que la boca, al ser un lugar de paso hacia otras partes del organismo, se convierte en un reservorio de genes de resistencia listos para ser captados por cualquier bacteria capaz de hacerlo²⁷⁴.

La TET es un antibiótico bacteriostático cuya resistencia apareció pocos años después de su introducción clínica. Dicha resistencia puede darse por tres vías: protección ribosomal, inactivación enzimática y bombas de flujo⁹⁹. Como se ha visto en el capítulo 1, los genes *tet* se encuentran muy distribuidos entre la microbiota subgingival de individuos sanos, así como en la microbiota asociada a periodontitis^{251,253}. Esto es debido, en parte, a su asociación con transposones conjugativos de la familia Tn916/1545²⁸².

En este estudio se analizó la distribución de 11 genes de resistencia a TET de la microbiota oral aislada de 130 muestras subgingivales de pacientes con periodontitis crónica. Adicionalmente, se determinó la susceptibilidad de la microbiota aislada a KAN, ERY, CHL, CTX, AMX y STR.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Población sujeta a estudio

Se obtuvieron 130 muestras subgingivales de pacientes con periodontitis crónica con una media de edad de 52,3 años que atendían a la clínica odontológica universitaria de la Universitat Internacional de Catalunya (Barcelona, España). Los pacientes se presentaron voluntarios previa autorización del estudio por parte del Comité Ético de la Universitat Internacional de Catalunya (ODO-2014-01). Las variables clínicas de periodontitis de los pacientes coincidían con aquellas sugeridas por la American Academy of Periodontology's Periodontal Disease Classification Consensus Report⁷³, las cuales incluyen al menos 5 dientes y una profundidad de sondaje de ≥ 5 mm, nivel clínico de inserción \geq de 3 mm y una pérdida de hueso extensiva y determinada mediante radiografías. Además, ninguno de los pacientes había tomado antibióticos en los 3 meses anteriores a la toma de la muestra.

4.3.2 Toma de muestras subgingivales y cultivo bacteriano

El protocolo para obtener las muestras subgingivales y realizar el cultivo bacteriano fue el mismo que el descrito en el capítulo 1.

4.3.3 Extracción de DNA y secuenciación

El protocolo para obtener DNA de los aislados y para secuenciar el gen 16S rRNA fue el mismo que el usado en el capítulo 1.

4.3.4 Análisis de resistencia a antibióticos *in vitro*

El protocolo para determinar la resistencia de los aislados a los distintos antibióticos testados fue el mismo que el usado en el capítulo 1.

4.3.5 Detección de genes de resistencia a antibióticos

Para la detección de 11 genes de resistencia a TET, el gen *erm(B)* y el gen *intTn* se realizó el mismo protocolo que en el capítulo 1.

4.4 Resultados

Se obtuvieron 365 aislados resistentes a TET a partir de 130 muestras subgingivales provenientes de pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica, aislando 3 morfologías coloniales distintas por muestra en aquellos casos donde fuera posible. Se obtuvieron aislados resistentes a TET en 112 de las 130 muestras subgingivales (86,15%). El promedio de carga bacteriana total fue de 6,54 log₁₀ ufc/ml (± 0.91) y el promedio de carga resistente a TET fue de 4,87 log₁₀ ufc/ml (± 2.09). Los géneros con mayor número de aislados fueron *Streptococcus* (n=276) y *Prevotella* (n=48). Se pudo identificar a nivel de especie el 89,13% (n=246) de los estreptococos aislados, y de éstos el 95,93% (n=236) pertenecían al grupo de estreptococos viridans, siendo el resto (n=10) neumococos. Las especies más frecuentemente aisladas fueron *S. constellatus* (n=48) y *S. mitis* (n=39). Las especies identificadas del género *Prevotella* incluían *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. denticola*, *Prevotella disiens*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella buccae* y *Prevotella baroniae* (Tabla 8).

Se analizó la resistencia de los aislados a 6 antibióticos: AMX, CTX, CHL, STR, KAN y ERY. La resistencia a KAN fue la más prevalente, con el 90,96% (n=332) de los aislados resistentes. También se encontraron elevados porcentajes de resistencia a ERY (64,38% [n=235]). La resistencia al resto de antibióticos testados fue más baja, con el 30,41%, 21,37%, 15,07% y 9,59% de aislados siendo resistentes a CTX, STRP, AMX y CHL respectivamente. El 94,25% (n=344) de los aislados fueron resistentes a al menos otro antibiótico además de TET, y el 2,47% (n=9) fue resistente a todos los antibióticos testados. Estos aislados incluían las especies *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *P.*

intermedia, *S. mitis* y *S. constellatus*. La mayoría de los aislados presentaron resistencia a 2 antibióticos además de la resistencia a TET (38,36%), siendo la resistencia simultánea a ERY, KAN y TET el patrón más observado (29,59%).

Para la detección de 12 genes de resistencia a antibióticos y del gen *intTn* se utilizó la técnica de PCR multiplex. Los genes de resistencia a TET más encontrados fueron *tet(M)* y *tet(32)*, presentes en el 35,07% y 13,97% de los aislados. Los genes más detectados fueron el gen *intTn*, presente en el 76,71% de los aislados y *erm(B)* en el 37,53% (Tabla 8 y Figura 18). Entre los estreptococos del grupo viridans la prevalencia de los genes *intTn*, *erm(B)* y *tet(M)* fue superior, con el 90%, 45,65% y 40,43% de los aislados portando estos genes. Se observó también un ligero descenso en la prevalencia de *tet(32)* (11,74%).

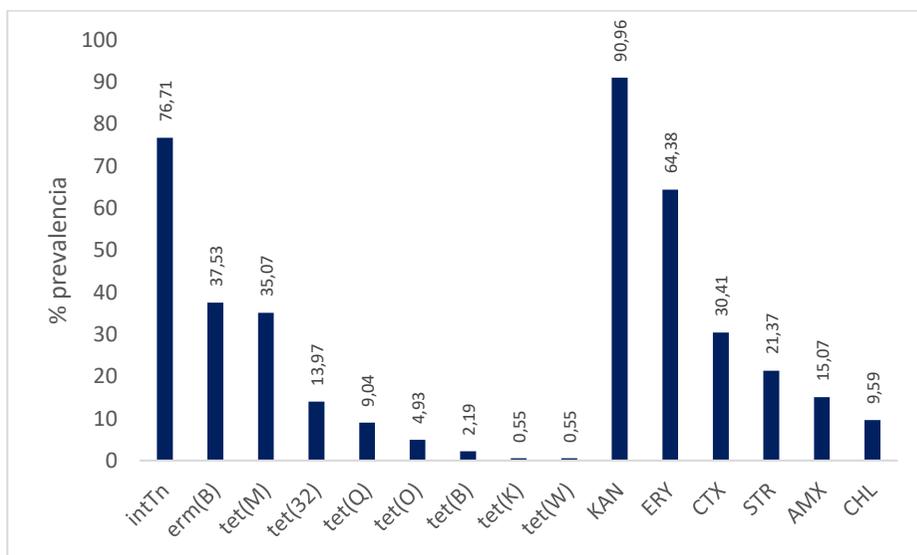


Figura 18. Prevalencias totales de los genes de resistencia y de las resistencias fenotípicas analizadas en este estudio.

Tabla 8. Listado de especies aisladas e identificadas en este estudio, con el número (N) de aislados de cada especie y el número de aislados portadores de cada gen de resistencia y resistentes a los 6 antibióticos testados.

Especies	Genes de resistencia													Resistencias fenotípicas							
	Número de aislados													AMX	CTX	ERY	KAN	CHL	STR		
	N	Int/Tn	ter(W)	ter(O)	ter(M)	ter(β1)	ter(β2)	ter(B)	ter(L)	ter(S)	ter(O)	ter(K)	erm(B)								
<i>A. odontolyticus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
<i>B. pyogenes</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	2
<i>G. haemolysans</i>	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1
<i>G. adiacens</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. saburreum</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	0	2	
<i>Lachnoaerobaculum</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. pumilum</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
<i>N. subflava</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
<i>P. lacrimalis</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. stomatis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. baroniae</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>P. buccae</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
<i>P. denticola</i>	6	3	0	0	2	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	6	6	0	1	0
<i>P. disiens</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	3	1	3	0	0	2	0
<i>P. intermedia</i>	19	7	0	0	0	0	12	2	0	0	7	0	0	0	11	14	8	17	2	9	0
<i>P. melaninogenica</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. nigrescens</i>	16	3	0	0	1	0	5	0	0	9	0	0	0	0	1	9	12	8	13	0	1
<i>P. mirabilis</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2
<i>R. dentocariosa</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
<i>S. exigua</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>S. sanguinis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>S. anginosus</i>	27	24	0	0	13	0	3	0	4	0	0	0	0	0	10	2	13	27	3	12	0
<i>S. australis</i>	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0
<i>S. constellatus</i>	48	44	0	2	15	0	10	0	0	0	0	0	0	27	6	24	28	48	5	6	0
<i>S. cristatus</i>	6	6	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	5	0	0	0
<i>S. dentisani</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>S. gordonii</i>	26	25	0	0	18	0	2	0	3	0	0	0	0	8	0	1	14	26	1	1	0
<i>S. infantis</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	0	0
<i>S. intermedius</i>	30	30	0	0	11	0	3	0	0	0	0	0	0	20	3	4	24	30	3	3	0
<i>S. mitis</i>	39	35	0	3	15	0	2	0	0	2	0	0	0	14	4	2	26	36	6	5	0
<i>S. oligofermentans</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0

Continúa de la página anterior:

Especies	Genes de resistencia													Número de aislados					Resistencias fenotípicas				
	N	int1n	tet(W)	tet(O)	tet(M)	tet(31)	tet(32)	tet(B)	tet(L)	tet(S)	tet(C)	tet(37)	tet(K)	err(B)	AMX	CTX	ERY	KAN	CHL	STR			
<i>S. oralis</i>	17	15	0	0	9	0	5	0	3	0	0	0	0	5	1	7	14	17	1	5			
<i>S. parasanguinis</i>	14	8	0	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1	1	12	14	2	1			
<i>S. pneumoniae</i>	6	4	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	6	1	1			
<i>S. pseudopneumoniae</i>	4	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	4	0	0			
<i>S. rubneri</i>	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	0	1			
<i>S. salivarius</i>	7	7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	0	1	6	6	0	1			
<i>S. sanguinis</i>	7	7	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2	3	7	7	1	1			
<i>Streptococcus</i> sp.	30	27	0	2	18	0	3	0	0	1	0	0	0	16	2	5	23	29	6	11			
<i>S. figurinus</i>	6	6	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	1	4	6	0	0			
<i>V. atypica</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0			
<i>V. caviae</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1			
<i>V. dispar</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1			
<i>V. parvula</i>	3	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	0	2			
No determinado	10	2	0	0	2	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	2	3	4	1	1			
Total	365	280	2	18	128	0	51	8	12	0	33	0	2	137	55	111	235	332	35	78			

4.5 Discusión

Los estudios que analizan la distribución de genes de resistencia en el ambiente oral son escasos, y aún lo son más aquellos que aíslan a los microorganismos que portan dichos genes. En este trabajo se estudió la distribución de genes de resistencia a TET en aislados obtenidos de muestras subgingivales de pacientes con periodontitis crónica o periodontitis generalizada estadio 3 o 4, grado B o C según la nueva clasificación⁷⁵. Además, se determinó la susceptibilidad de estos aislados a ERY, KAN, CHL, STR, CTX y AMX.

De los 365 aislados obtenidos, un 76,62% de los aislados fueron identificados como estreptococos, un género predominante en el ambiente oral²⁸³ en el que la resistencia a TET está extendida²⁴³, mientras que el 13,15% de los aislados fueron identificados como pertenecientes al género *Prevotella*, un género bacteriano relacionado con la periodontitis^{284,285}. En un estudio con individuos noruegos con periodontitis, se obtuvo una alta frecuencia de aislados resistentes a tetraciclina pertenecientes al género *Streptococcus*²⁸⁶, mientras que en un estudio con pacientes de Washington DC (EUA)²⁸⁷ las especies más aisladas pertenecían al género *Fusobacterium*. Por otra parte, en otro estudio llevado a cabo en Florida (EUA), la frecuencia de estreptococos volvió a ser dominante²⁸⁸. En los anteriores estudios, los porcentajes de *Prevotella* resistente a TET fueron inferiores a los encontrados en la presente Tesis. Estos resultados nos permiten vislumbrar las diferencias en la constitución bacteriana de la microbiota bucal resistente a tetraciclina entre las diferentes poblaciones. Esto podría estar determinado por diferentes condiciones tales como una distinta microbiota basal, los distintos hábitos alimenticios o incluso las diferencias en el consumo de antibióticos entre países. No obstante, hacen falta más estudios que permitan comprender estas diferencias.

Los genes más detectados en este estudio no fueron genes de resistencia a TET, sino los genes *intTn* y *erm(B)*. El gen *intTn* codifica para una integrasa presente en los transposones conjugativos de la familia Tn916/1545²⁷⁵ y su alta prevalencia (76,71%) podría ser un indicador de una elevada presencia de transposones conjugativos en este tipo de microbiota. Por otro lado, el gen *erm(B)* codifica para una metilasa²⁸⁹ y ha sido relacionado con transposones conjugativos²⁷⁵. Sin embargo, la detección de *erm(B)* (37,53%) fue menor que el porcentaje de aislados resistentes a ERY (64,38%), por lo que pueden existir otros genes de resistencia a macrólidos, como *erm(F)*, *mef(A)* o *msrA*²⁸⁹, u otros mecanismos que pueden estar confiriendo resistencia en estos aislados.

Al igual que en otros estudios¹¹¹, *tet(M)* fue el gen más prevalente (35,07%). Aparentemente, *tet(M)* es el gen de resistencia a TET más prevalente en el ambiente premisa que se ha cumplido en este estudio. No obstante, sus porcentajes de detección fueron más bajos que los descritos en otros estudios^{243,251,290} y similares a los de Collins *et al.*²⁵³. De estos resultados se podría inferir que las diferencias entre la distribución de la microbiota subgingival pueden implicar cambios en la prevalencia de genes de resistencia a TET. La mayoría de los genes de resistencia a TET detectados codificaron para proteínas de protección ribosomal (*tet(M)*, *tet(O)* y *tet(32)*) y han sido detectados con anterioridad en el ambiente oral^{291,292}. La presencia de genes que codifican para bombas de flujo fue menor, con escasa presencia de *tet(B)*, *tet(L)* y *tet(K)* entre los aislados (8.66% en total). Se ha descrito que estas bombas de flujo se encuentran en una mayor frecuencia en bacterias gramnegativas como las enterobacterias¹¹¹. El bajo número de bacterias gramnegativas aisladas en este estudio, podría ser el causante de la baja prevalencia de genes codificantes para bombas de flujo detectadas.

El fenómeno de multirresistencia fue ampliamente observado entre los aislados de este estudio. El 94,24% fueron resistentes a otro antibiótico además de a TET, y un 75,63%

presentaron resistencia a 2 o más antibióticos, incluyendo β -lactámicos y cloramfenicol. Aunque se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la susceptibilidad a antibióticos de distintas especies claves en el desarrollo de la periodontitis^{250,293–296}, la multiresistencia a antibióticos ha sido pobremente estudiada en las bacterias orales. Teniendo en cuenta el auge de la multiresistencia a antibióticos entre los patógenos clínicos²⁹⁷, se deberían llevar a cabo estudios que relacionaran las susceptibilidades a antibióticos entre ellas, con tal de obtener perfiles de resistencia más detallados.

Recapitulando, en este estudio realizamos un *screening* de microbiota subgingival resistente a TET en pacientes con periodontitis crónica. Observamos un elevado porcentaje de bacterias resistentes a TET con una alta variedad de especies, algunas de ellas periodontopatógenas, aunque con una mayoría de aislados pertenecientes al género *Streptococcus*. La comparación de estos resultados con la literatura, permite destacar la variabilidad de la microbiota bucal en las diferentes poblaciones. Pese a esta variabilidad y, de acuerdo con otros estudios, *tet(M)* y las proteínas de protección ribosomal son el mecanismo de resistencia a TET más detectado. También observamos una alta prevalencia de los genes *intTn* y *erm(B)*, que junto a la alta frecuencia de aislados resistentes a macrólidos y aminoglicósidos, dan un indicio de la importancia de los transposones conjugativos en la resistencia a antibióticos de la microbiota bucal. Por último, la resistencia a múltiples antibióticos fue ampliamente observada, con más del 75% de los aislados siendo resistentes a 3 o más antibióticos, entre ellos macrólidos y β -lactámicos. Esto podría tener un alto interés clínico debido a que estos 3 grupos de antibióticos son los más utilizados, junto con el MZ, como coadyuvantes del RAR.

Capítulo 3

**Comparación de bacterias resistentes a tetraciclina
aisladas de individuos sanos y de individuos con
periodontitis crónica**

5. Comparación de bacterias resistentes a tetraciclina aisladas de individuos sanos y de individuos con periodontitis crónica

5.1 Resumen

La principal causa de la periodontitis es la proliferación de microorganismos periodontopatógenos que conducen a la disbiosis del biofilm oral en el surco gingival. Se ha descrito que la microbiota subgingival de los individuos sanos es distinta de aquellos con diagnóstico de periodontitis, pero poco se sabe de las diferencias entre la microbiota subgingival resistente a TET de ambas poblaciones. Para analizar estas diferencias, se llevaron a cabo comparaciones con los resultados obtenidos en los capítulos 1 y 2.

Aunque el número de bacterias totales y bacterias resistentes a TET fue 10 veces superior en las muestras de pacientes con periodontitis, en ambas poblaciones se encontraron recuentos elevados de bacterias resistentes a TET. Se encontraron diferencias en las especies bacterianas resistentes entre ambos grupos de sujetos. Sin embargo, en ambos casos el género dominante fue *Streptococcus*. La prevalencia de 5 de los genes de resistencia a TET estudiados [*tet(M)*, *tet(W)*, *tet(O)*, *tet(32)* y *tet(L)*] fue significativamente distinta entre los dos grupos. Finalmente, la multiresistencia a antibióticos fue observada en ambos tipos de muestra sin apenas diferencias salvo la resistencia a KAN, significativamente mayor en los aislados provenientes de pacientes con periodontitis. Así, independientemente del origen clínico de la muestra, las bacterias orales resistentes a TET presentan un amplio abanico de resistencias a antibióticos, una gran diversidad de genes *tet* y una elevada presencia de transposones conjugativos, los cuales tienen la capacidad de transferir sus resistencias a otras bacterias del biofilm oral.

5.2 Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria que se inicia por el sobrecrecimiento de patógenos en el biofilm subgingival y que se acompaña de la pérdida de tejido de soporte del diente, pudiendo provocar su pérdida. El tratamiento estándar para la periodontitis consiste en el RAR, pudiendo ser complementado con la administración de antibióticos⁹⁴. No obstante, la aparición de resistencias a los antibióticos administrados pueden convertir el tratamiento en inefectivo y provocar recurrencia²⁹⁸.

Junto al metronidazol, las TETs, los macrólidos y los β -lactámicos son los antimicrobianos más utilizados en la práctica dental⁹⁴. En el ambiente oral se han descrito genes que codifican para proteínas de protección ribosomal tales como *tet(Q)*, *tet(O)*, *tet(S)* y *tet(W)* y genes que codifican para bombas de flujo como *tet(B)*, *tet(32)*, *tet(K)* y *tet(L)*. Varios genes, incluyendo *tet(37)* y *tet(X)* codifican para enzimas de inactivación, aunque en el ambiente oral solo se ha detectado *tet(37)*^{99,111,299}.

La multirresistencia a antibióticos es un problema creciente. Al tratar ciertas infecciones, los facultativos se ven en la obligación de recetar más de un antimicrobiano para acabar con la infección. Es el caso de la periodontitis, en la que el tratamiento con AMX y MZ es la combinación estándar de antibióticos³⁰⁰, puesto que el MZ es efectivo frente a la mayoría de las bacterias anaerobias y la AMX tiene éxito frente a *A. actinomycetemcomitans*, el cual es un anaerobio facultativo asociado a periodontitis de progresión rápida. Entender el perfil de resistencia a antibióticos de cada microbiota parece necesario para administrar un buen tratamiento. Algunos estudios han trabajado en esta dirección, pero pocos han tomado un enfoque molecular.

Es sabido que la microbiota de pacientes con periodontitis es distinta de la microbiota de individuos periodontalmente sanos. Las bacterias periodontopatógenas pueden existir tanto en ambientes sanos como en ambientes periodontopatógenos, pero sus

proporciones pueden variar¹⁴. Por lo tanto, es de esperar que las prevalencias de genes de resistencia a antibióticos, así como que los perfiles de resistencia fenotípica a antibióticos sean diferentes.

En este estudio se comparó la microbiota oral resistente a TET obtenida 129 muestras subgingivales de pacientes periodontalmente sanos con la obtenida de 130 muestras subgingivales de pacientes con periodontitis crónica.

5.3 Material y métodos

5.3.1 Población sujeta a estudio, toma de muestras subgingivales, cultivo bacteriano y métodos moleculares

Las muestras subgingivales usadas en este estudio corresponden a las obtenidas en el capítulo 1 y el capítulo 2. Los protocolos para la extracción de DNA, la secuenciación del gen 16S rRNA, la búsqueda de genes de resistencia a TET y el análisis de la multiresistencia de los aislados se puede consultar en los dos capítulos anteriores.

5.3.2 Análisis estadístico

La búsqueda de genes de resistencia y el análisis de la multiresistencia dio lugar a valores cualitativos. Para comparar los valores de ambas poblaciones se analizaron los resultados mediante la prueba χ^2 y se aceptaron como estadísticamente significativos aquellos valores $p < 0,05$.

5.4 Resultados

Las muestras subgingivales de pacientes con periodontitis (MSPP) crecidas en agar sangre, presentaron una carga bacteriana de $6,54 \log_{10}$ ufc/ml ($\pm 0,91$), mientras que las muestras subgingivales de pacientes sanos (MSSS) presentaron una carga promedio de $5,64 \log_{10}$ ufc/ml ($\pm 0,8$). Al sembrarlas en medio con TET, las MSPP presentaron una carga bacteriana $4,87 \log_{10}$ ufc/ml ($\pm 2,09$) versus $3,66 \log_{10}$ ufc/ml ($\pm 1,63$) de las MSSS. El 86,82% ($n=112$) de MSSS y el 86,15% ($n=112$) de MSPP contenían bacterias resistentes a TET, de las cuales se obtuvieron 813 aislados. De éstos, 448 pertenecían a MSSS y 365 a MSPP.

Streptococcus fue el género más aislado, representando el 75,62% de los aislados de MSPP y el 75,89% de MSSS. En ambos grupos, *S. oralis* fue la especie más frecuentemente aislada ($n=83$), seguida de otras especies de estreptococos como *S. mitis* ($n=81$), *S. intermedius* ($n=79$) y *S. constellatus* ($n=58$). Fuera del género *Streptococcus*, las especies más prevalentes fueron *P. intermedia* ($n=31$), y *P. nigrescens* ($n=25$).

Al comparar la prevalencia de ciertas especies entre los dos grupos de sujetos, se encontraron las siguientes diferencias significativas: *Gemella haemolysans* (5 veces más), *S. oralis* (3 veces más), *S. pneumoniae* (4 veces más) y *S. sanguinis* (4 veces más), fueron más prevalentes en MSSS, mientras que *S. anginosus* (2 veces más), *S. constellatus* (6 veces más), *Streptococcus gordonii* (2 veces más), *Streptococcus parasanguinis* (3 veces más) y *Streptococcus tigurinus* (7 veces más), fueron más prevalentes en MSPP (Tablas 7 y 8).

En la tabla 9 se muestra la lista de los géneros identificados, los genes de resistencia analizados y las resistencias fenotípicas a los 6 antibióticos testados. Los genes *tet(M)* (52,03%), *tet(32)* (8,24%) y *tet(O)* (7,75%), fueron los genes *tet* más detectados. El gen

intTn, el cual codifica para una integrasa localizada en transposones de la familia Tn916/1545, también fue ampliamente detectado (79,58%).

Además, encontramos que el 91% de todos los aislados eran resistentes a otros antibióticos además de a TET (Tabla 10). La resistencia a KAN fue la más observada (83,64%), seguida de la resistencia a ERY (67,16%), STR (20,66%), CTX (18,08%), AMX (15,50%) y CHL (14,64%). Las diferencias significativas en la prevalencia de genes de resistencia y resistencias fenotípicas se muestran en la figura 19.

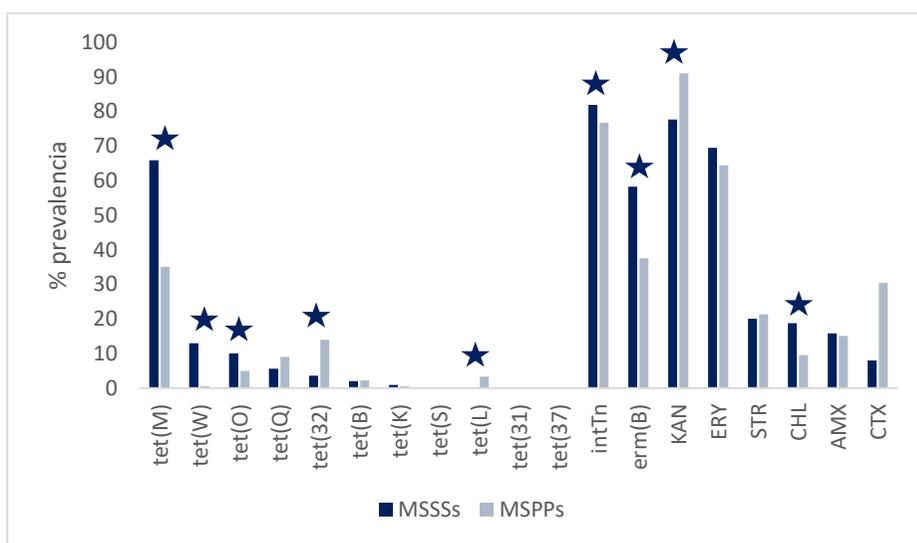


Figura 19. Prevalencia de los genes estudiados y de las resistencias fenotípicas a antibióticos. Las estrellas indican aquellas comparaciones con diferencias significativas entre grupos.

Tabla 9 (1). Géneros aislados de MSSS y MSPP y el número (N) de aislados portadores de los genes estudiados y resistentes a los antibióticos testados.

Géneros	N	Genes de resistencia										
		Número de aislados										
		<i>int</i>	<i>tet(W)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(31)</i>	<i>tet(32)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(S)</i>	<i>tet(Q)</i>	
Aislados de pacientes con periodontitis	<i>Actinomyces</i> sp.	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Bacteroides</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	<i>Gemella</i> sp.	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Granulicatella</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Lachnoanaerobaculum</i> sp.	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Mogibacterium</i> sp.	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	<i>Neisseria</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Peptoniphilus</i> sp.	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Prevotella</i> sp.	48	16	0	0	3	0	18	7	0	0	27
	<i>Proteus</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Pseudomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Rothia</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Slackia</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Staphylococcus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Streptococcus</i> sp.	276	248	0	18	116	0	31	0	12	0	3
<i>Veillonella</i> sp.	6	6	0	0	5	0	0	0	0	0	0	
Not identified	10	2	0	0	2	0	1	1	0	0	1	
Aislados de pacientes sanos	<i>Abiotrophia</i> sp.	5	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Bacillus</i> sp.	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Butyrivibrio</i> sp.	4	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Eubacterium</i> sp.	3	2	1	0	3	0	1	0	0	0	0
	<i>Gemella</i> sp.	13	13	1	0	8	0	0	0	0	0	1
	<i>Granulicatella</i> sp.	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Haemophilus</i> sp.	4	2	1	0	2	0	1	2	0	0	0
	<i>Neisseria</i> sp.	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Prevotella</i> sp.	25	0	0	0	0	0	1	3	0	0	16
	<i>Rothia</i> sp.	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Staphylococcus</i> sp.	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Streptococcus</i> sp.	340	305	44	42	250	0	12	2	0	1	5
	<i>Veillonella</i> sp.	12	11	5	1	9	0	0	0	0	0	0
Not identified	27	24	3	0	17	0	0	0	0	0	3	

Tabla 9 (2). Géneros aislados de MSSS y MSPP y el número (N) de aislados portadores de los genes estudiados y resistentes a los antibióticos testados.

Géneros	Genes de resistencia			Resistencia fenotípica						
	N	Número de aislados			AMX	CTX	CL	STRP	ERM	KN
		<i>tet(37)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>erm(B)</i>						
<i>Actinomyces</i> sp.	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
<i>Bacteroides</i> sp.	2	0	0	0	0	2	0	2	2	2
<i>Gemella</i> sp.	2	0	0	0	1	0	0	1	2	2
<i>Granulicatella</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lachnoanaerobaculum</i> sp.	3	0	0	2	1	2	0	2	2	2
<i>Mogibacterium</i> sp.	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
<i>Neisseria</i> sp.	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0
<i>Peptoniphilus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella</i> sp.	48	0	2	3	28	36	2	15	24	42
<i>Proteus</i> sp.	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pseudomonas</i> sp.	2	0	0	0	2	2	2	2	2	2
<i>Rothia</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	1	2	2
<i>Slackia</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> sp.	276	0	0	128	20	56	29	48	188	271
<i>Veillonella</i> sp.	6	0	0	2	1	4	0	4	5	2
Not identified	10	0	0	1	1	2	1	1	3	4
<i>Abiotrophia</i> sp.	5	0	0	4	0	0	1	0	5	2
<i>Bacillus</i> sp.	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>Butyrivibrio</i> sp.	4	0	0	1	2	0	0	2	1	4
<i>Eubacterium</i> sp.	3	0	0	2	0	0	0	1	3	3
<i>Gemella</i> sp.	13	0	0	0	1	1	4	0	5	4
<i>Granulicatella</i> sp.	3	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Haemophilus</i> sp.	4	0	0	3	0	0	0	0	4	1
<i>Neisseria</i> sp.	2	0	0	2	0	0	0	1	2	0
<i>Prevotella</i> sp.	25	0	1	0	16	15	4	13	18	22
<i>Rothia</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	0	1	2
<i>Staphylococcus</i> sp.	5	0	3	4	3	3	2	3	4	0
<i>Streptococcus</i> sp.	340	0	0	218	39	12	68	59	227	283
<i>Veillonella</i> sp.	12	0	0	5	3	5	2	4	12	6
Not identified	27	0	0	20	7	0	3	7	27	20

Tabla 10. Número de aislados resistentes a TET que además eran resistentes a otros antibióticos, separados según el origen de la muestra. El asterisco indica diferencias significativas entre los grupos.

Número de antibióticos	Aislados MSSS	Aislados MSPP
0*	48	21
1	82	68
2	179	140
3	93	77
4	31	37
5	12	13
6*	3	9

5.5 Discusión

Las TETs son una clase de antibióticos que han ido cayendo en desuso debido al aumento paulatino de bacterias resistentes. Sin embargo, siguen usándose en casos específicos³⁰¹⁻³⁰³, como antibióticos sistémicos en el tratamiento de ciertas enfermedades³⁰⁴⁻³⁰⁶ y en otros usos agrarios^{307,308}. Pese a su administración menguante, es posible aislar, con alta frecuencia, bacterias resistentes a tetraciclina en sujetos que no han recibido terapia antibiótica con este compuesto y que, por lo tanto no han sido sometidos a presión selectiva²⁵¹ (ver capítulo 1). En este estudio se comparó la microbiota resistente a TET aislada de individuos periodontalmente sanos con la aislada de pacientes con periodontitis.

Los recuentos bacterianos fueron mayores en las MSPP, tanto los totales como los de bacterias resistentes a TET, promediando un incremento 10 veces superior al de las MSSS. Esto concuerda con trabajos anteriores^{309,310}, en los que la carga bacteriana de pacientes con periodontitis era mayor que en los sujetos periodontalmente sanos. El mayor porcentaje de bacterias resistentes a TET en las MSPP podría deberse a la mayor carga bacteriana de dichas muestras.

Pese a que los porcentajes de estreptococos fueron similares entre ambos grupos de muestras, a nivel de especie se observaron diferencias significativas (Tablas 7 y 8). *S. sanguinis*, *S. oralis* y *S. pneumoniae*, que en nuestro estudio fueron más prevalentes en MSSS, han sido previamente asociados al biofilm oral comensal^{9,311}, mientras que *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. tigurinus* y *S. parasanguinis*, que en nuestro estudio fueron significativamente más prevalentes en MSPP, han sido relacionados con la microbiota asociada a periodontitis³¹²⁻³¹⁴. Sin embargo, el papel de estas especies en la enfermedad periodontal aún no está claramente dilucidado^{315,316}

La prevalencia de *G. haemolysans* fue significativamente mayor en MSSS. Esta especie ha sido descrita por estudios metagenómicos como una colonizadora temprana del biofilm oral^{317,318} y por lo tanto, como parte de la microbiota comensal. Sin embargo, también ha sido relacionada con infecciones oportunistas³¹⁹.

Los aislados del género *Prevotella* fueron significativamente más prevalentes en MSPP (2 veces más). El incremento de riqueza en las especies de *Prevotella* en MSPP fue el responsable de esto, incrementado el número total de aislados de *Prevotella* en MSPP. No obstante, *P. intermedia* y *P. nigrescens*, las dos especies de *Prevotella* que estaban presentes en ambas poblaciones, no mostraron diferencias significativas en cuanto a su prevalencia. El género *Prevotella* ha sido asociado a la progresión de la periodontitis y, por lo tanto, una mayor prevalencia de este género en las MSPP era esperable. Sin embargo, vale la pena mencionar el incremento en la riqueza de especies de *Prevotella* resistentes a TET observada en MSPP, puesto que la mayoría de estudios han focalizado su atención en *P. intermedia* y *P. nigrescens*^{284,320} y se sabe muy poco acerca de la prevalencia de la resistencia a TET en otras especies orales de este género.

Al analizar la prevalencia de genes de resistencia a TET en los aislados estudiados, se encontró que *tet(M)* fue el más prevalente, seguido de *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(W)*, *tet(32)* y *tet(B)*. Se encontraron diferencias significativas en la distribución de *tet(M)*, *tet(W)*, *tet(O)*, *tet(32)* y *tet(L)* entre las dos poblaciones estudiadas. La detección del gen *tet(B)* en *S. oralis* (capítulo 1 y detallado en el 4), o la descripción de nuevos genes *tet* en el ambiente oral³²¹, muestran que aún queda mucho por descubrir respecto a los genes de resistencia a TETs. Por ejemplo, en los capítulos 1 y 2 encontramos a los genes *tet(W)*, *tet(O)*, *tet(32)*, *tet(B)*, *tet(Q)* y *tet(K)* distribuidos entre los géneros *Eubacterium*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Butyrivibrio* y *Prevotella*, los cuales, de acuerdo a la base de datos de genes de resistencia a TET disponible en <http://faculty.washington.edu/marilynr/>, no habían sido reportados con anterioridad. Sin embargo, serían necesarios más estudios para confirmar estos resultados. En nuestro estudio, la prevalencia en MSSS del gen *tet(M)* (65,85%) fue similar a lo descrito anteriormente^{243,251}. Sin embargo, la prevalencia de este gen en MSPP fue mucho más baja (35,07%) que la detectada en sujetos griegos y estadounidenses con periodontitis^{251,264}, pero similar a los porcentajes encontrados en pacientes dominicanos²⁵³. Estas diferencias podrían explicarse por las limitaciones geográficas de las poblaciones involucradas en los estudios, o debido a las distintas metodologías utilizadas, tales como el agrupamiento de las muestras o DNA, o el distinto criterio de selección de aislados. Tal y como se ha discutido previamente, las especies de estreptococos fueron significativamente diferentes entre MSSS y MSPP, lo cual podría ser la causa de las diferencias en la prevalencia de *tet(M)* entre los dos grupos estudiados. Mientras que el 75,53% de los estreptococos aislados de MSSS presentaron *tet(M)*, éste solo se detectó en el 42,02% de los estreptococos aislados de MSPP, indicando que aquellos estreptococos asociados a un biofilm sano podrían ser más susceptibles de llevar *tet(M)*. En el caso del gen *tet(32)*, su prevalencia fue mayor en MSPP, tal y como se ha descrito previamente²⁵³. Esto podría ser debido a la alta prevalencia de este gen en especies asociadas a periodontitis tales como *S.*

constellatus y *P. intermedia*, aunque otros autores también han detectado este gen en bacterias comensales³²². El gen *tet(W)* puede ser detectado frecuentemente a partir de DNA extraído de muestras de saliva agrupadas y muestras de placa^{243,266,291}, aunque su distribución en el biofilm subgingival únicamente ha sido estudiada por Collins *et al.*²⁵³. En dicho estudio, *tet(W)* fue, de media, el doble de prevalente en MSPP que en MSSS. En nuestro estudio, *tet(W)* fue más ubicuo en MSSS, puesto que *S. intermedius* y *S. oralis*, que eran más prevalentes en MSSS, fueron algunas de las especies que portaban el *tet(W)* más a menudo.

Los transposones de la familia Tn916/1545 se encuentran frecuentemente entre la microbiota oral³²³. Estos transposones normalmente portan genes de resistencia a TETs, macrólidos y/o aminoglicósidos^{324,325}. Para estimar la presencia de estos transposones en los aislados, se detectó mediante PCR el gen *intTn*, que codifica para una integrasa localizada en el extremo 3' de estos transposones²⁷⁵, y el gen *erm(B)*, que confiere resistencia a macrólidos y se encuentra a menudo en transposones de esta familia²⁷⁴. Ambos genes mostraron altas prevalencias en ambos grupos, aunque fueron significativamente superiores en las MSSS. El gen *intTn* fue encontrado en el 81,92% de los aislados obtenidos de MSSS y en el 76,71% de los obtenidos de MSPP. En comparación, la prevalencia de *erm(B)* fue menor, con el 58,26% de aislados de MSSS y el 37,53% de aislados de MSPP presentando este gen. Dado que no todos los transposones de esta familia llevan el gen *erm(B)*, este resultado era de esperar. Las diferentes combinaciones de los genes *intTn*, *erm(B)*, y *tet(M)* junto con las resistencias fenotípicas a KAN y ERY fueron significativamente más prevalentes en MSSS. Excepto por la combinación de los genes *intTn*, *tet(M)* y a ERY, la cual fue más prevalente, aunque no estadísticamente significativa, en MSPP. Las diferencias, previamente discutidas, en la prevalencia de las distintas especies de estreptococos al comparar MSPP y MSSS, podrían ser la causa de estas diferencias, dado que los estreptococos de este estudio mostraron distintos perfiles de genes de resistencia a antibióticos. Estos

resultados sugieren una alta prevalencia de transposones de la familia Tn916/1545 en la microbiota subgingival resistente a TET de sujetos sanos y de pacientes con periodontitis.

La mayoría de los aislados resistentes a TET obtenidos en este estudio mostraron resistencia a otros antibióticos. La resistencia a 2 antimicrobianos, además de a TET, fue el patrón más común, principalmente la multiresistencia a KAN y ERY, lo cual se puede relacionar a los transposones previamente mencionados³²⁴. Al estudiar la resistencia a 6 antibióticos, se encontraron diferencias significativas entre grupos, observándose 3 veces más aislados en MSPP. También se observaron diferencias significativas al analizar la susceptibilidad a todos los antibióticos, donde se observaron 2 veces más aislados de MSSS. Pese a estas diferencias, los niveles de multiresistencia fueron altos y similares en ambas poblaciones, mostrando que la microbiota subgingival resistente a TET es un reservorio importante de resistencias a antibióticos, lo cual es especialmente preocupante en sujetos que han recibido poca o ninguna terapia antibiótica. La alta prevalencia de aislados resistentes a antibióticos que son de uso poco frecuente, y por lo tanto que no han sido expuestos a presión selectiva, podría ser debido al bajo coste energético derivado de la captación y mantenimiento de algunos elementos genéticos móviles que contienen genes de resistencia a antibióticos^{42,326}.

La resistencia a ERY y KAN fue ampliamente observada (Figura 19). Se encontraron diferencias significativas al analizar la resistencia a KAN y CHL entre las dos poblaciones. En el caso de KAN se observaron porcentajes más elevados de aislados de MSPP, mientras que para el CHL fue lo contrario. Los aislados de *Streptococcus* y de *Prevotella* podrían ser responsables de estas diferencias, puesto que el género *Prevotella*, que es conocida por su resistencia a β -lactámicos y a KAN³²⁷, fueron el doble de prevalentes en MSPP respecto a MSSS. Por otro lado, las diferencias en la

resistencia a CHL podrían ser debidas a la desigual distribución de dicha resistencia entre las especies de estreptococos entre ambas poblaciones (Tablas 7 y 8).

Finalmente, las diferencias que se pueden destacar entre ambas poblaciones son i) las especies bacterianas resistentes a TET, ii) la prevalencia de los genes estudiados y iii) los perfiles de multirresistencia. Además, dadas las diferencias observadas al comparar nuestros resultados con estudios previos, parece ser que el origen geográfico de las muestras y probablemente el consumo de antibióticos, son variables a tener en cuenta a la hora de estudiar los genes de resistencia a TET y las bacterias que los presentan. Finalmente, encontramos que, en sujetos españoles, pese a no haber tomado TET desde hace muchos años, las bacterias subgingivales resistentes a TET podrían ser un reservorio de genes de resistencia a TET y de multirresistencias, lo que unido a la alta prevalencia de transposones conjugativos en el ambiente oral, aumenta las probabilidades de la diseminación de las resistencias a antibióticos.

Capítulo 4

Detección y análisis de la expresión de *tet(B)*
en *S. oralis*

6. Detección y análisis de la expresión de *tet(B)* en *S. oralis*

6.1 Resumen

Distintos autores han definido al ambiente oral como un ecosistema idóneo para la transferencia genética al ser un espacio colonizado por centenares de especies distintas que conviven en espacios reducidos, adheridos a una superficie y rodeados de matriz extracelular. Los genes de resistencia a antibióticos pueden ser uno de los elementos cuya transferencia se vea favorecida por estas condiciones de vida, extendiéndose a través de especies y géneros bacterianos. El gen *tet(B)*, que codifica para una bomba de flujo que confiere resistencia a TET, nunca se ha detectado en bacterias grampositivas. En este estudio se detectó dicho gen en dos aislados de *S. oralis*, ambos se secuenciaron y sus niveles de expresión fueron analizados para determinar su actividad en los dos aislados.

El hallazgo del gen fue confirmado mediante la secuenciación completa del mismo, y sus niveles de expresión se determinaron mediante RT-qPCR, observando que solo se expresaba en uno de los dos aislados y de forma constitutiva. La presencia en *S. oralis* de un gen que hasta ahora solo se había encontrado en bacterias gramnegativas, podría ser producto de la transferencia genética horizontal, un ejemplo de la facilidad con la que los genes de resistencia son capaces de transferirse y un refuerzo a la idea del ambiente oral como un espacio propicio al intercambio genético.

6.2 Introducción

Las TETs fueron unos de los primeros antibióticos descubiertos en los años 40 y han sido ampliamente usadas para el tratamiento de un amplio abanico de infecciones. Las resistencias a TETs aparecieron pronto tras su uso y solo el descubrimiento de nuevos derivados permitieron seguir usándolas hasta los años 80, donde fueron gradualmente reemplazadas por otras clases de antibióticos como las fluoroquinolonas⁹⁹.

Pese a que las resistencias a TETs están muy distribuidas, todavía son útiles en algunos casos, como el tratamiento de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, *H. pylori*, acné vulgar o periodontitis^{94,128,328}. La resistencia puede ocurrir a través de bombas de flujo, proteínas de protección ribosomal o por inactivación enzimática. Se han descrito, hasta el momento, 62 genes de resistencia a TET que codifican para estos mecanismos y 11 genes mosaicos que codifican para proteínas de protección ribosomal según <http://faculty.washington.edu/marilynr/> (última actualización el 20 de Febrero de 2020). Algunos de estos genes, como *tet(C)* y *tet(32)* han sido hallados solo en bacterias grampositivas, mientras que otros como *tet(B)* se han encontrado únicamente en bacterias gramnegativas.

Los estreptococos del biofilm oral son un gran reservorio de genes de resistencia a TET^{243,329}, siendo *S. oralis*²⁸³ uno de los estreptococos orales más aislados. *S. oralis* es un miembro del grupo *S. mitis*, conocidos por ser bacterias comensales y patógenos oportunistas³³⁰. *S. oralis* es un colonizador temprano del biofilm oral y juega un papel importante en su establecimiento⁸ y homeostasis, antagonizando a bacterias como *S. mutans* y previniendo la formación de un biofilm disbiótico³³¹. Sin embargo, también es una de las bacterias más aisladas en endocarditis infecciosas³³² y ha sido encontrado en numerosas infecciones^{333–336}.

En 2011, Chander *et al.*, describieron por primera vez el gen *tet(B)* en una especie grampositiva, concretamente en *Streptococcus suis* aislados de cerdos³³⁷. Sin embargo, la falta de la secuencia completa de este gen no permitió la confirmación de este hallazgo. Además, *tet(B)* codifica para una bomba de flujo, la cual podría no funcionar correctamente en bacterias grampositivas. Por lo tanto, estudiar su expresión y determinar la secuencia completa del gen puede ayudar a esclarecer, no solo si el gen *tet(B)* se ha transmitido a bacterias grampositivas, sino si además está siendo expresado en estas bacterias.

La transferencia de genes de resistencia a antibióticos es un fenómeno ampliamente estudiado y los estreptococos son un buen ejemplo de ello. La transformación en este género es un evento común, al exhibir un estado de competencia natural que les permite adquirir fácilmente DNA foráneo³³⁸. Las bacterias del ambiente oral tienden a crecer en una estructura de biofilm, aumentando las posibilidades de transferencia genética horizontal⁴².

En el estudio en el que analizamos la microbiota subgingival resistente a TET de sujetos sanos, se detectó el gen *tet(B)* en dos aislados de *S. oralis* (444.1 y 469.4). Para probar la presencia y la transcripción de este gen en ambos aislados grampositivos, se obtuvo la secuencia completa del gen y se evaluó su expresión.

6.3 Material y métodos

6.3.1 Obtención de los aislados y condiciones de cultivo

Los dos aislados de *S.oralis* fueron obtenidos de dos muestras procesadas en el capítulo 1. Los aislados fueron incubados en medio líquido con y sin TET, usando el medio BHI-2 (ver anexo). La TET (8 µg/ml) fue añadida a los cultivos líquidos para evaluar cambios en la expresión de *tet(B)* debido al antibiótico. Los cultivos crecieron hasta una DO_{600} de 0,8 – 1 (equivalente a 10^8 ufc/ml), momento en el que se realizaron extracciones de DNA y de RNA.

6.3.2 Detección de *tet(B)* e identificación de especies

La extracción de DNA se llevó a cabo tal y como se describe en el capítulo 1. Para la detección de *tet(B)* se emplearon los primers tetBF y tetBR (Tabla 11) con las siguientes condiciones de PCR: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de hibridación a 58°C y 30 segundos de extensión a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. El resultado de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 3%.

Tabla 11. Lista de primers utilizados en este estudio.

Primers	Secuencia 5' – 3'	Tamaño (bp)	T _m (°C)	Referencia
27-F 1544-R	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC	1533	57	255
tetB-F tetB-R	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	242	55	258
tetB-insert-F tetB-insert-R	ACC AAA GCT TAG TTA TTC TAC CAC TCC CTA TCA GT CTT CTT CGA ATG CCC TCT TGG GTT ATC AAG	1319	53	Este estudio
tetB-RT-F tetB-RT-R	TTC AAG TGC GCT TTG GAT GC CGT TGA GAA GCT GAG GTG GT	111	60	Este estudio
16S-So-F 16S-So-R	CGC TCG GGA CCT ACG TAT TA TAC CAG AAA GGG ACG GCT AA	59	60	Este estudio
M1-F M1-NdeI-R	GAT TTT TTA GCA GAA GTA CCG ATA CCA TAT GCC GAT ATT CTA ACC GAA T	629	55	Este estudio
M2-HindIII-F M2-R	CCG ATA CAA GCT TAG TGA CCC GCT TCT GCG A GAC TAT TTG GAC GAC GGG	782	55	Este estudio
ermB-NdeI-F ermB-HindIII-R	GCG TTA GCA TAT GTA CGT TAG ATT AAT TCC TAC CAG CCG ATA CAA GCT TTT ATT TCC TCC CGT TAA ATA	887	55	Este estudio

6.3.3 Secuenciación

Para identificar los aislados a nivel de especie se procedió a amplificar el gen 16S rRNA mediante PCR usando los primers 27F y 1544R tal y como se indica en el capítulo 1 (Tablas 1 y 11). El producto de PCR fue purificado usando el kit E.Z.N.A. Gel extraction kit y se secuenció mediante *primer walking* en el Servei de Genòmica i Bioinformàtica de la Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain), obteniendo una cobertura completa del gen. Los primers tetB-insert-F y tetB-insert-R fueron usados para secuenciar la totalidad del gen *tet(B)*. Estos primers amplificaron el gen 41 pares de bases río arriba del codón de inicio y 72 pares de bases río abajo del codón de terminación. Mediante PCR se obtuvieron amplicones que fueron purificados y secuenciados por *primer walking* tal y como se describe más arriba. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa Blast (disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el servicio Clustal Omega (disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para realizar el alineamiento, se obtuvieron secuencias de referencia de la base de datos disponible en

<http://faculty.washington.edu/marilynr/>, concretamente las siguientes: J01830, AF223162, V00611, AL513383, AJ277653, AF326777 y AP000342. Para asegurar una mayor cobertura en el análisis, se usaron otras secuencias de *tet(B)* disponibles en Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>): CP015434.1, KX458222.1, CP015836.1, NG_048163.1 y LN908249.1.

6.3.4 Extracción de RNA y expresión de *tet(B)*

La extracción de RNA total se realizó utilizando el kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA restante fue eliminado mediante la DNasa TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). La ausencia de DNA en las muestras fue verificada mediante PCR usando los sets de primers tetB-RT-R/tetB-RT-F y 16S-So-F/16S-So-R (Tabla 11), visualizando los resultados en un gel de agarosa al 3%. El RNA fue cuantificado utilizando un Qubit 4 Fluorometer utilizando el kit Qubit RNA XR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA) y su integridad fue verificada en un gel de agarosa al 2%.

La expresión de *tet(B)* fue medida mediante PCR cuantitativa con transcriptasa reversa (RT-qPCR) usando el gen 16S rRNA como control endógeno. Las reacciones se llevaron a cabo en un LightCycler® 480 II utilizando el kit LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron los sets de primers tetB-RT y 16S-So (Tabla 11) junto con las sondas 45 y 66 para los genes *tet(B)* y 16S rRNA respectivamente. Estas sondas fueron elegidas usando el software de Roche Diagnostics Universal ProbeLibrary Assay Design Center (disponible en https://lifescience.roche.com/en_es/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center). Las condiciones de la RT-qPCR fueron las siguientes: i) Se utilizaron 75 ng de RNA en cada reacción para la síntesis de cDNA, la cual se realizó durante 3 minutos a 63°C. ii) La amplificación del

cDNA implicó un primer ciclo de desnaturalización de 30 segundos a 95°C seguido de 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 40 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C. Los datos fueron analizados utilizando el programa LightCycler® 480 Software 1.5. Para evaluar las diferencias en la expresión de *tet(B)* se utilizó la fórmula $2^{\Delta C_p(tet(B))} / 2^{\Delta C_p(16S\ rRNA)}$.

6.3.5 Construcción de mutantes defectivos para *tet(M)*

Para inactivar el gen *tet(M)* se realizó una mutación por inserción en el aislado 469.4. Para ello, se hizo una construcción que consistía en el gen *erm(B)* flanqueado por dos secuencias homólogas a *tet(M)* a las que llamamos M1 (la región 5') y M2 (la región 3'). *erm(B)* se extrajo mediante PCR usando los primers *ermB-NdeI-F* y *ermB-HindIII-R* de una cepa de *S. oralis* resistente a ERY perteneciente al cepario del Dentaïd Research Center (Cerdanyola del Vallès, España). Las secuencias M1 y M2 fueron obtenidas mediante PCR del aislado 469.4 utilizando los primers M1-F y M1-NdeI-R para la secuencia M1, y M2-HindIII-F y M2-R para la secuencia M2 (Tabla 11). Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit E.Z.N.A. Gel Extraction Kit y digeridos con las enzimas *NdeI* y *HindIII* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Los fragmentos digeridos fueron ligados utilizando ligasa T4 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El constructo fue entonces purificado utilizando el kit E.Z.N.A. Gel Extraction Kit y se transformó en el aislado 469.4 mediante electroporación utilizando un electroporador Genepulser Xcell (BioRad, Hercules, CA, EUA). Las células electroporadas fueron sembradas en placas de agar sangre con 5 µg/ml de ERY (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas en condiciones anaerobias durante 24-48 horas. El evento de recombinación fue confirmado mediante PCR.

6.3.6 Test de susceptibilidad antibiótica

Se estudió la susceptibilidad a TET en los dos aislados *wild-type* y en 469.4 $\Delta tet(M)$ mediante tiras E-test (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó *S. pneumoniae* ATCC 49619 como cepa control.

6.4 Resultados

6.4.1 Secuencias de los genes *tet(B)* y 16S rRNA

Se encontró *tet(B)* en 2 aislados de dos muestras distintas. Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA se pudo determinar que ambos aislados eran *S. oralis* y compartían la misma secuencia de este gen. Para asegurar la presencia de *tet(B)* se secuenció la totalidad del gen y se alineó con secuencias de referencia, observando un 99.99-100% de identidad. La secuencia J01830 fue usada como referencia al ser la primera secuencia publicada de *tet(B)*³³⁹. Se observaron mutaciones puntuales en casi todas las secuencias usadas comparándolas con J01830. Las secuencias AF223162, AF326777, AL513383, CP015836.1, KX458222.1, LN908249.1, NG_048163.1 y las secuencias de *tet(B)* de los aislados 444.1 y 469.4 presentaron 5 mutaciones puntuales en las posiciones 463, 794, 854, 940 y 1012. La secuencia CP015434.1 presentó una mutación puntual adicional en la posición 1140, y la secuencia AP000342 tenía 4 mutaciones puntuales en las posiciones 794, 854, 940 y 1012. Las mutaciones puntuales de las posiciones 463, 794, 854, 940 y 102 implicaron sustituciones aminoacídicas (Tabla 12).

Tabla 12. Posiciones de las sustituciones nucleotídicas y aminoacídicas en las secuencias de *tet(B)* utilizadas como comparación. AA indica aminoácido.

Secuencias	Sustituciones nucleotídicas	Sustitución AA
469.4 444.1 AF223162 AF326777 AL513383 CP015836.1 KX458222.1 LN908249.1 NG_048163.1	463A>G 794A>G 854A>T 940G>C 1012A>G	Thr155Ala Glu265Gly Asp285Val Glu314Gln Thr338Ala
CP015434.1	463A>G 794A>G 854A>T 940G>C 1012A>G 1140A>G	Thr155Ala Glu265Gly Asp285Val Glu314Gln Thr338Ala -
AP000342	794A>G 854A>T 940G>C 1012A>G	Glu265Gly Asp285Val Glu314Gln Thr338Ala

Las secuencias obtenidas en este estudio fueron enviadas a Genbank para su publicación y recibieron los siguientes números de acceso: MK611935 y MK611934 para el gen 16S rRNA de 444.1 y 469.4 respectivamente, y MK611936 y MK611937 para el gen *tet(B)* de 444.1 y 469.4 respectivamente.

6.4.2 Expresión de *tet(B)*

Se evaluaron los niveles de expresión de *tet(B)* en los aislados 444.1 y 469.4 comparando cultivos líquidos en fase exponencial de crecimiento con y sin TET. La exposición a TET no disminuyó la cantidad de bacterias recuperadas del cultivo y dio lugar a cantidades similares de mRNA (Figura 20). La transcripción de *tet(B)* fue medida usando RT-qPCR. Se detectó mRNA de *tet(B)* en el aislado 469.4 pero no en el aislado 444.1, pese a que ambos mostraron niveles similares de expresión del gen 16S rRNA (Figura 21). No se observaron diferencias en la expresión de *tet(B)* al añadir TET al medio, obteniendo un valor de expresión genética relativa de 0,06 (\log_2), normalizado con el gen 16S rRNA. Debido al *screening* de genes *tet* que se realizó en muestras

subgingivales de sujetos sanos, se tenía conocimiento de la presencia de *tet(M)* en el aislado 469.4. Para determinar si *tet(M)* era el gen responsable para la resistencia a TET en el aislado 469.4, se realizó un mutante defectivo para este gen.

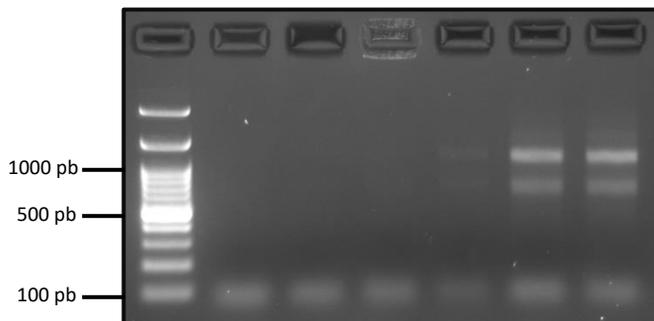


Figura 20. Gel de agarosa al 2% sin RNAsas en el que se comprobó la integridad del RNA extraído tras la eliminación del DNA con DNAsa. Se puede observar que la integridad y cantidad de RNA de los 2 últimos carriles era aceptable.

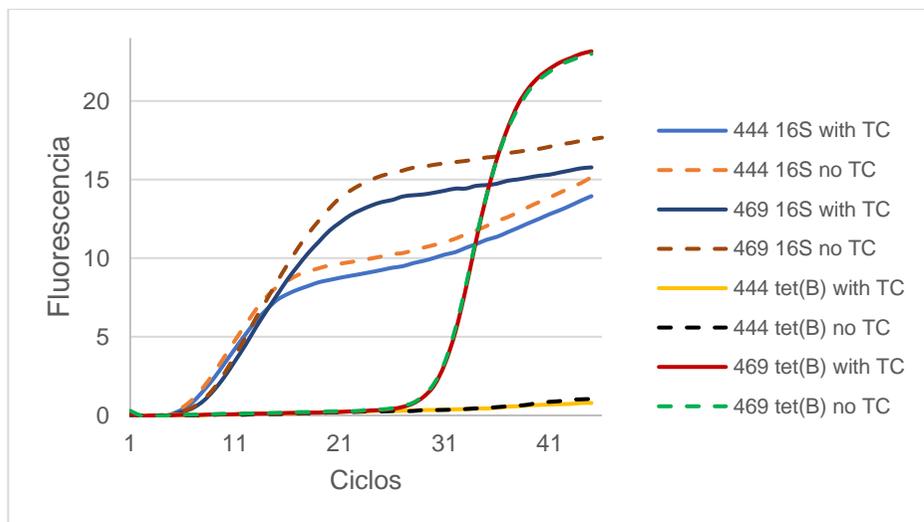


Figura 21. Curvas de amplificación de los genes 16S rRNA y *tet(B)* obtenidas mediante RT-qPCR a partir de RNA de los aislados 444.1 y 469.4.

6.4.3 Susceptibilidad a tetraciclina

Los aislados 444.1 y 469.4 presentaban una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 32 µg/ml para TET. La susceptibilidad a TET también fue analizada en el aislado mutante 469.4Δ*tet*(M) para determinar si la resistencia a TET era mediada por *tet*(M) en lugar de *tet*(B). La CMI para TET de este aislado fue también de 32 µg/ml.

6.5 Discusión

Las resistencias a TETs están extendidas, y aunque éstas son aún útiles en algunos tratamientos, solo sus más recientes diseños están siendo usados para tratar infecciones causadas por bacterias multirresistentes¹²². Sin embargo, una nueva formulación de minociclina, una TET de segunda generación, ha sido probada eficazmente contra infecciones por *A. baumannii* multirresistente, permitiendo de nuevo el uso de un antibiótico de anteriores generaciones^{122,328}. Desafortunadamente, las bombas de flujo como las codificadas por *tet*(B) pueden reconocer distintas TETs como sustrato, incluyendo minociclina, doxiciclina e incluso, mediante mutaciones puntuales, gliciciclinas³⁴⁰. *tet*(B) es el gen de resistencia a TET más distribuido entre bacterias gramnegativas¹¹¹ y hasta ahora no se había encontrado en grampositivas. Sin embargo, un estudio reciente³³⁷ reportó haber encontrado *tet*(B) en *S. suis*, siendo la primera vez que se encontraba este gen en bacterias grampositivas. No obstante, y pese a que en dicho estudio emplearon la técnica de secuenciación con unos resultados del 100% de identidad, solo cubrieron el 54,55% del gen, generando dudas acerca de si ese gen podría ser o no *tet*(B). Según Levy *et al.*, las proteínas que confieren resistencia a TET deben compartir menos del 80% de su secuencia aminoacídica con otras proteínas para ser consideradas como distintas³⁴¹, lo cual hace imposible para el estudio anterior determinar que el gen estudiado era *tet*(B).

En nuestro estudio encontramos 2 aislados de *S. oralis* susceptibles de portar *tet(B)*, y para confirmarlo llevamos a cabo una secuenciación completa del gen obteniendo un 100% de cobertura. Al comparar las secuencias obtenidas con aquellas previamente publicadas encontramos un alto nivel de homología, con unas ligeras diferencias que involucraban entre 1 y 6 nucleótidos como máximo en una secuencia de 1206 pares de bases, y entre 1 y 5 sustituciones aminoacídicas en una secuencia de 401 aminoácidos (99,75-98,75% de identidad). La mayoría de los polimorfismos en la secuencia fueron compartidos por las secuencias publicadas utilizadas en este estudio, con la excepción de V00611 y AJ277653, las cuales eran idénticas a la secuencia referencia J01830. Estas tres secuencias fueron obtenidas de *Escherichia coli*, al igual que la secuencia CP015836.1, la cual presentaba 5 mutaciones puntuales, indicando que quizás estas mutaciones ocurrieron en algún punto durante la replicación o la transferencia de *tet(B)* y fueron mantenidas en ciertas cepas.

La expresión de *tet(B)* fue estudiada para determinar si este gen era capaz de expresarse en los dos aislados de *S. oralis*. Se ha descrito que en presencia de TET, la transcripción de genes de resistencia a este antibiótico puede verse aumentada^{342,343}. Por esta razón se hicieron cultivos con y sin TET a los cuales se les extrajo RNA y se cuantificó la expresión del gen. Solo se pudo detectar mRNA de *tet(B)* en el aislado 469.4, indicando que en esas condiciones el gen permanecía silenciado en el aislado 444.1. Además, la expresión de 469.4 parecía ser constitutiva ya que su transcripción no dependía de la adición de TET, tal y como se pudo observar al normalizar los valores de expresión con los del gen 16S rRNA. Ambos aislados portaban *tet(M)*, el cual podía ser el causante de la resistencia a TET en lugar de *tet(B)*. Para comprobarlo, inhabilitamos el gen *tet(M)* en el aislado 469.4 mediante recombinación homóloga y no observamos ningún cambio en el nivel de susceptibilidad, indicando que *tet(B)* podría ser el responsable de la resistencia a TET del aislado 469.4. Sin embargo, no puede descartarse la presencia de otro gen o mecanismo de resistencia a TET en este aislado.

La confirmación de *tet(B)* en bacterias grampositivas es un capítulo más en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. Pese a que *tet(B)* no parecía estar activo en ambos aislados, la capacidad de éstos de llegar a ser reservorios de un gen de resistencia a TET nunca antes detectado en grampositivos abre las puertas para transmitir este gen a otros grampositivos y gramnegativos de la cavidad oral. Para complementar este estudio y corroborar estos conceptos, sería necesario la caracterización completa de los entornos genéticos de *tet(B)* y realizar un análisis de la capacidad de dicho gen de transferirse a otras bacterias del género *Streptococcus*.

Capítulo 5

Susceptibilidad a Azitromicina y a Eritromicina y genes de resistencia a macrólidos en aislados del género *Prevotella* de pacientes con periodontitis

7. Susceptibilidad a Azitromicina y a Eritromicina y genes de resistencia a macrólidos en aislados del género *Prevotella* de pacientes con periodontitis

7.1 Resumen

La AZM ha sido propuesta recientemente como una opción útil en el tratamiento de la periodontitis debido a sus efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios y a su sencilla posología. Sin embargo, la presencia de resistencias a macrólidos podría debilitar los efectos antimicrobianos de este antibiótico, reduciendo en gran medida su efectividad. Los genes *erm* y los genes *mef* pueden conferir resistencia a macrólidos a las bacterias que los presentan. La presencia de los primeros en bacterias orales y la diseminación cada vez mayor de los últimos, los hace objetivos interesantes para su monitorización en el ambiente oral. El estudio de estos genes de resistencia en periodontopatógenos como *Prevotella* puede ayudar a determinar el alcance de las resistencias a macrólidos en las bacterias a las cuales va dirigido el antibiótico. En este estudio se analizaron 100 aislados orales del género *Prevotella* elegidos aleatoriamente. Los aislados pertenecieron a 11 especies distintas, a los que se les estudió la susceptibilidad a ERY y AZM.

La susceptibilidad a AZM y ERY de los aislados de este estudio fue mayor de lo observado en otros estudios anteriores, incluso en muestras tomadas del mismo país. El 31% de los aislados fueron resistentes a AZM, y se pudo observar que la presencia del gen *erm*(F) en aislados de *Prevotella* puede inducir a mayores niveles de resistencia a AZM y a ERY, pudiendo ser la propagación de este gen entre periodontopatógenos una amenaza al tratamiento con AZM.

7.2 Introducción

El género *Prevotella* consiste en bacterias gramnegativas que, siendo frecuentemente encontradas en la microbiota oral de individuos sanos, han sido consideradas bacterias comensales durante largo tiempo^{2,315}. Sin embargo, estudios recientes han relacionado la presencia o el incremento relativo de algunas especies de *Prevotella* a desórdenes inflamatorios y a infecciones endógenas, como por ejemplo la artritis reumatoide, disbiosis intestinal, vaginosis bacteriana, asma y periodontitis²⁸⁴. En la enfermedad periodontal han sido categorizadas dentro del complejo naranja de la pirámide de Socransky y Haffajee, el cual contiene principalmente bacterias gramnegativas anaerobias y colonizadoras tardías del biofilm oral, las cuales podrían tener un papel en el desarrollo de la periodontitis^{5,285}. Además, no ha sido hasta hace poco que a especies como *P. intermedia* y *P. nigrescens* se les ha descrito un potencial proinflamatorio similar al de *P. gingivalis*, uno de los principales patógenos relacionados con la periodontitis³²⁰.

El RAR es la base del tratamiento periodontal. No obstante, algunos casos requieren el uso de terapia coadyuvante con antimicrobianos como los β -lactámicos o el MZ³⁰⁰. Aunque la combinación de AMX y MZ ha sido ampliamente estudiada y prescrita³⁴⁴, se ha demostrado que ciertos macrólidos como la AZM son efectivos frente a bacterias tanto aeróbicas como anaeróbicas, sin importar la resistencia intrínseca a macrólidos que tienen las bacterias gramnegativas^{345,346}. Este antibiótico ha sido recientemente propuesto como un coadyuvante efectivo en el tratamiento de la periodontitis, reduciendo la profundidad de sondaje y el nivel clínico de inserción^{228,347,348}.

Los macrólidos son bacteriostáticos que se unen al 23S rRNA, impidiendo la síntesis proteica. La resistencia a AZM ha sido observada principalmente en forma de metilasas, bombas de flujo y enzimas de inactivación²³³. Las metilasas, que son el mecanismo de resistencia más extendido y están codificadas por genes *erm*, previenen la unión del

macrólido mediante la adición de uno o dos grupos metilo al ribosoma, confiriendo resistencia a macrólidos, estreptograminas y lincosamidas. Por otro lado, las bombas de flujo Mef, como la codificada por *mef(A)*, expulsan el macrólido a cambio de un protón y confieren resistencia a un espectro menos amplio de antibióticos^{232,349}. Recientemente, *mef(A)* y *erm(B)* han sido relacionados con altos niveles de resistencia en bacterias gramnegativas como *H. influenzae*^{350,351}, lo cual los hace un objetivo interesante a monitorizar al analizar genes de resistencia a macrólidos. Además, *erm(F)* ha sido relacionado con altos niveles de resistencia a ERY y clindamicina en los géneros *Bacteroides* y *Parabacteroides*^{351,352}, y se encuentra comúnmente en bacterias del género *Prevotella*^{245,353}.

Según la literatura, no hay artículos que relacionen la resistencia a AZM o ERY con los genes de resistencia a macrólidos en aislados del ambiente oral. Estos genes pueden ser transferidos a otras bacterias a través de transposones conjugativos, los cuales pueden ser activados en presencia de antibióticos³⁵⁴. Dado el aumento en el uso de la AZM en la práctica clínica y la presión selectiva ejercida como resultado de este aumento, existe la necesidad de monitorizar la resistencia a AZM en las bacterias periodontales como *Prevotella* spp., lo cual también podría ayudar a determinar la efectividad de este antibiótico en la práctica clínica²⁵². Además, la resistencia a ERY también tiene relevancia clínica, puesto que se usa en el tratamiento de infecciones endodónticas en caso de pacientes alérgicos a β -lactámicos³⁵⁵.

El objetivo de este estudio fue el de determinar la presencia de 7 genes de resistencia a macrólidos y la susceptibilidad a AZM y ERY en 100 aislados orales de *Prevotella* spp. procedentes de pacientes con periodontitis.

7.3 Material y métodos

7.3.1 Población sujeta a estudio, toma de muestra subgingival y cultivo bacteriano

Los aislados de *Prevotella* spp. fueron obtenidos de pacientes con periodontitis crónica (ver capítulo 2). El protocolo de obtención de las muestras subgingivales se describe en los capítulos 1 y 2. Los aislados estaban preservados en una solución de glicerol al 30%, de la que fueron resembrados en placas de agar sangre e incubados en condiciones de anaerobiosis durante 48-72 horas a 37°C.

7.3.2 Extracción de DNA, Secuenciación del gen 16S rRNA y screening de genes de resistencia a macrólidos

Para la extracción de DNA y la secuenciación del gen 16S rRNA se siguió el mismo protocolo que el descrito en el capítulo 1.

El *screening* de 7 genes de resistencia a macrólidos se llevó a cabo mediante PCR. En la tabla 13 se muestran los primers utilizados, así como la temperatura de fusión de los primers para cada reacción, las cuales se llevaron a cabo según se indica en cada referencia. Para la amplificación de *erm*(G) se usaron de 30 a 100 ng de DNA, 1X tampón de PCR, 1X solución con dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer y 1 unidad de Taq polimerasa (Takara, Tokyo, Japón) en la mezcla de PCR. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, finalizado con una elongación final de 10 minutos a 72°C. Las extracciones de DNA de los aislados portadores de genes de resistencia a macrólidos fueron utilizadas como controles positivos. Para validar estos controles, se secuenciaron sus productos de PCR y las secuencias fueron alineadas con secuencias publicadas en GenBank. Los controles negativos se realizaron añadiendo agua estéril de grado Milli-Q a la mezcla

en lugar de DNA. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2%.

Tabla 13. Primers y temperaturas de alineamiento para la identificación de genes de resistencia a macrólidos.

Primers	Secuencia 5' – 3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Referencia
erm(B) F erm(B) R	GGT AAA GGG CAT TTA ACG AC CGA TAT TCT CGA TTG ACC CA	494	55	356
erm(F) F erm(F) R	CGG GTC AGC ACT TTA CTA TTG GGA CCT ACC TCA TAG ACA AG	466	50	357
erm(A) F erm(A) R	TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT	640	48	357
erm(C) F erm(C) R	TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT	640	43	357
erm(Q) F erm(Q) R	AAG TTA TTG GGT TAC AGC TA CAC CTC CTA ATT TAA ATC TAC TA	624	53	358
erm(G) F erm(G) R	GCA AGT TCT GCG CAA TAG CA TAG CGG CAA TAA TCG CAC CA	240	57	Este estudio
mef(A) F mef(A) R	ACC GAT TCT ATC AGC AAA G GGA CCT GCC ATT GGT GTG	942	55	349

7.3.3 Test de susceptibilidad antibiótica

Los aislados de *Prevotella* spp. fueron resembrados en agar sangre para llevar a cabo un test de susceptibilidad antibiótica utilizando tiras E-test, las cuales contenían un gradiente de concentración de AZM o ERY. Tras incubar las placas de agar en condiciones anaeróbicas y 37°C, se midieron las CMI para ambos antibióticos siguiendo las indicaciones del fabricante. *S. pneumoniae* ATCC 49619 fue utilizado como cepa control.

7.3.4 Análisis estadístico

Se usó la prueba *t* de Student como prueba estadística pareada para variables continuas para encontrar diferencias significativas entre los valores de CMI para ambos antibióticos en cada aislado. Antes de la prueba, los valores de CMI fueron normalizados mediante el logaritmo neperiano. Se aceptaron valores $p < 0,05$ como significativos.

Para comparar los grupos de aislados que portaban cada gen con los valores de CMI que presentaban se hizo una prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon. Valores $p < 0.0083$ fueron aceptados como significativos después de aplicar las correcciones de Bonferroni.

7.4 Resultados

Los aislados seleccionados para este estudio fueron parte de la microbiota subgingival de 52 pacientes con periodontitis crónica, con una media de edad de 49,8 años. Estos pacientes presentaban una media de profundidad de sondaje de $6,63 \pm 1,72$ mm, un nivel clínico de inserción de $7,49 \pm 2,07$ mm y un 94,29% de puntos gingivales con sangrado al sondar. Se seleccionaron 100 aislados de *Prevotella* spp., promediando 1,92 aislados por paciente (con un rango de entre 1 y 5), con 28 pacientes presentando más de un aislado. *P. intermedia* y *P. nigrescens* fueron las especies más identificadas (33% cada una), seguida de *P. buccae* y *P. denticola* (Tabla 14).

Tabla 14. Número de aislados de cada una de las especies de *Prevotella*, rangos de CMI y valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para los dos antibióticos testados. Los valores de CMI están expresados en µg/mL.

Especies	N de aislados	Resistencia a ERY			Resistencia a AZM		
		Rango CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>P. intermedia</i>	33	0,016 - ≥ 256	0,38	16	0,032 - ≥ 256	0,5	≥ 256
<i>P. nigrescens</i>	33	0,023 - ≥ 256	0,125	≥ 256	0,023 - ≥ 256	1	≥ 256
<i>P. buccae</i>	14	1 - ≥ 256	8	≥ 256	0,75 - ≥ 256	2	≥ 256
<i>P. denticola</i>	6	0,25 - ≥ 256	≥ 256	≥ 256	0,75 - ≥ 256	≥ 256	≥ 256
<i>P. disiens</i>	3	0,023 - ≥ 256	0,094	≥ 256	0,064 - ≥ 256	0,38	≥ 256
<i>P. maculosa</i>	3	2 - ≥ 256	≥ 256	≥ 256	2 - ≥ 256	≥ 256	≥ 256
<i>P. oralis</i>	3	1,5 - 4	2	4	1 - 3	2	3
<i>P. melaninogenica</i>	2	1 ≥ 256	0,75	1	0,75 - 1	0,5	0,75
<i>P. baroniae</i>	1	0,064	ND	ND	0,25	ND	ND
<i>P. oris</i>	1	1	ND	ND	0,75	ND	ND
<i>P. pallens</i>	1	≥ 256	ND	ND	128	ND	ND
<i>Prevotella</i> spp.	100	0,016 - ≥ 256	1	≥ 256	0,023 - ≥ 256	1,5	≥ 256

Las CMIs para ERY y AZM oscilaron de 0,016 µg/ml a ≥ 256 µg/ml y de 0,023 µg/ml a ≥ 256 µg/ml respectivamente, con grandes diferencias entre aislados de la misma especie. Veintitrés de los 28 pacientes con más de un aislado presentaron rangos de CMIs muy amplios entre sus aislados. Además, se observaron diferencias significativas al comparar las CMIs entre los 100 aislados ($p = 0,001$). El conjunto de los aislados de *Prevotella* mostraron una CMI₅₀ de 1 µg/ml para ERY y una CMI₅₀ de 1,5 µg/ml para AZM. La CMI₉₀ para ambos antibióticos fue de ≥ 256 µg/ml para todas las especies excepto para *P. melaninogenica* y *Prevotella oralis* en el caso de ambos antibióticos, y para *P. intermedia* en el caso de ERY. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para *P. baroniae*, *Prevotella pallens* y *Prevotella oris* no pudieron ser determinados ya que solo se obtuvo un aislado de cada especie (Tabla 14).

No se han determinado concentraciones de corte para determinar la resistencia a macrólidos en anaerobios gramnegativos^{359,360}. No obstante, la concentración de AZM en el fluido crevicular gingival ha sido estimado en 7-8 µg/ml después de una dosis oral de 500 mg^{361,362}. Bajo esta premisa, al menos el 31% de los aislados de este estudio

serían resistentes a AZM (CMI ≥ 12 $\mu\text{g/ml}$), con *P. denticola*, *P. buccae*, *P. nigrescens* y *P. intermedia* siendo las especies con un mayor número de aislados resistentes: 66,67%, 42,86%, 33,33% y 18,18% respectivamente.

Los genes *erm(B)* y *erm(F)* fueron detectados por PCR en 58 de los 100 aislados de *Prevotella*. El gen *erm(B)* fue detectado en 19 aislados, mientras que *erm(F)* se encontró en 51 aislados. En 12 aislados se encontraron ambos genes, viéndose esta combinación principalmente en las especies *P. intermedia* y *P. nigrescens*, aunque también se encontró en un aislado de *P. melaninogenica* (Tabla 15). Diecisiete de los 28 pacientes con más de un aislado presentaron distintos genes. No se encontró ninguno de los otros 5 genes estudiados.

Al comparar las CMIs de cada aislado de *Prevotella* con la presencia de los genes estudiados, se pudo observar que los valores de CMI₅₀ para ERY aumentaron 15,62 veces en presencia de *erm(B)* y 23,44 veces en presencia de *erm(F)*. Los valores de CMI₅₀ para AZM también aumentaron en presencia de genes de resistencia a macrólidos, siendo 5,26 veces mayores en el caso de *erm(B)* y 31,58 veces mayores en el caso de *erm(F)*. Los valores de CMI fueron significativamente mayores para ERY ($p = 0,001$) y AZM ($p = 0,0002$) al comparar las CMIs de aquellos aislados portadores de *erm(F)* y aquellos aislados que no portaban ninguno de los genes estudiados. Diez aislados mostraron CMIs elevadas (≥ 12 $\mu\text{g/ml}$) para AZM o ERY y no portaban ninguno de los genes estudiados.

Tabla 15. Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de eritromicina y AZM relacionadas con la presencia de los genes de resistencia a macrólidos detectados. Los valores de CMI están expresados en µg/mL. ND indica aquellas CMI₅₀ y CMI₉₀ que no pudieron ser calculadas debido a un número de aislados inferior a 2. ND: ningún gen detectado.

Especies	Número de aislados				Resistencia a eritromicina				Resistencia a AZM												
	erm(B) + erm(F)		ND		erm(B) + erm(F)		ND		erm(B) + erm(F)		ND		erm(B) + erm(F)								
	erm(B)	erm(F)	erm(B)	erm(F)	erm(B)	erm(F)	erm(B)	erm(F)	erm(B)	erm(F)	erm(B)	erm(F)	erm(B)	erm(F)							
<i>P. intermedia</i>	1	19	5	8	ND	0,75	0,25	0,032	ND	16	1	≥ 256	ND	1,5	1	0,064	ND	≥ 256	1,5	≥ 256	
<i>P. nigrescens</i>	1	8	6	18	ND	1	8	0,032	ND	≥ 256	≥ 256	≥ 256	3	ND	2	32	0,094	ND	≥ 256	≥ 256	24
<i>P. buccae</i>	2	4	0	8	≥ 256	≥ 256	ND	2	≥ 256	≥ 256	ND	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	ND	1,5	≥ 256	≥ 256	ND	≥ 256
<i>P. denticola</i>	1	5	0	0	ND	≥ 256	ND	ND	ND	≥ 256	ND	ND	ND	ND	≥ 256	ND	ND	ND	≥ 256	ND	ND
<i>P. maculosa</i>	0	1	0	2	ND	ND	ND	≥ 256	ND	ND	ND	≥ 256	ND	ND	ND	ND	≥ 256	ND	ND	ND	≥ 256
<i>P. oralis</i>	0	0	0	3	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	4	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	3
<i>Prevotella spp.</i>	7	39	12	42	1	1,5	1	0,064	≥ 256	≥ 256	≥ 256	64	1	6	1,5	0,19	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	48

7.5 Discusión

En este estudio se analizó la susceptibilidad a AZM y a ERY de 100 aislados subgingivales de *Prevotella* spp. obtenidos de pacientes españoles con periodontitis. Identificamos 11 especies distintas y buscamos la presencia de 7 genes de resistencia a macrólidos. De acuerdo a la literatura consultada, la resistencia a AZM y a ERY en prevotellas orales no ha sido estudiada en profundidad, y solo la presencia de *erm(F)* ha sido reportada en aislados de *P. intermedia* y *P. nigrescens*^{245,353}. Ambos antibióticos han sido ampliamente utilizados en la clínica dental: la ERY se utiliza frecuentemente en pacientes bajo tratamiento endodóntico y alérgicos a penicilinas³⁵⁵, y recientemente se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos para evaluar la efectividad de la AZM como coadyuvante al RAR. Estos ensayos han demostrado la validez de usar AZM frente a los principales periodontopatógenos. Propiedades como su rápida absorción por fibroblastos, su larga vida media, sus efectos inmunomodulatorios y antiinflamatorios, su sencilla posología y sus bajos efectos secundarios, han hecho de la AZM una alternativa atractiva al tratamiento con AMX y MZ^{94,221,228,363}.

En este estudio, los rangos de CMI y las CMI₅₀ y CMI₉₀ de ERY fueron muy similares a las de AZM; de hecho, fueron ligeramente inferiores en la mayoría de las especies estudiadas, indicando que la ERY puede tener propiedades antibacterianas parecidas a las de AZM para *Prevotella* spp. No obstante, la ERY no tiene las mismas propiedades antiinflamatorias e inmunomodulatorias que hacen de la AZM una opción más atractiva^{221,228}.

La monitorización de las resistencias a antibióticos a nivel global es esencial para establecer tratamientos efectivos frente a las infecciones³⁶⁴. Los investigadores se enfrentan a distintas CMI para el mismo antibiótico y especie bacteriana en distintos países. Por ejemplo, van Winkelhoff encontró en 2005 valores de CMI más altos en aislados de *Prevotella* spp. de pacientes españoles que en aislados de Países Bajos,

probablemente debido a un mayor uso y prescripción de antibióticos en España²⁵⁰. Este país es uno de los estados europeos con el mayor consumo de antibióticos^{252,365,366}, y numerosos estudios han relacionado estos hábitos con mayores niveles de resistencias, lo cual podría explicar las diferencias entre países³⁶⁷. Estas variaciones en la susceptibilidad a antibióticos podrían marcar la diferencia entre un tratamiento efectivo y uno fallido. Así, un mayor conocimiento acerca de la susceptibilidad a antibióticos en diferentes áreas geográficas puede ayudar a superar este problema. Los rangos de CMI para AZM presentados por los aislados de nuestro estudio fueron similares a los obtenidos en estudios anteriores (0,016 - \geq 256 $\mu\text{g/ml}$)^{250,293}, pero los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron superiores. La CMI₉₀ excedió los 256 $\mu\text{g/ml}$ en la mayoría de las especies, incluyendo *P. nigrescens* y *P. intermedia*. Los valores de CMI₅₀ también fueron altos; por ejemplo, para *P. intermedia* fueron 5 veces superiores a los descritos previamente^{250,293}. No obstante, se han observado niveles de resistencia superiores en aislados de *Prevotella* obtenidos de las vías respiratorias de sujetos con fibrosis quística³⁶⁸, indicando que algunas bacterias del género *Prevotella* pueden llegar a niveles de resistencia a AZM superiores a las observadas en este estudio. Los rangos de CMI y los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para ERY fueron similares a los encontrados en un estudio reciente³⁶⁹. Sin embargo, los aislados de *Prevotella* spp. obtenidos por Toprak *et al.*, no estuvieron limitados al ambiente oral como origen puesto que también incluyeron aislados obtenidos de abscesos y heridas de pacientes hospitalizados, lo cual podría haber aumentado sus valores de CMI₅₀ y CMI₉₀.

Los genes *erm* codifican para metilasas de la molécula 23S rRNA, las cuales evitan la unión del macrólido al ribosoma²³². En el género *Prevotella* spp. solo se han observado los genes *erm(A)*, *erm(C)*, *erm(F)* y *erm(G)*³⁵⁸. En este estudio se buscaron estos genes junto con *erm(B)* y *mef(A)*, pero solo se detectaron *erm(B)* y *erm(F)*. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se detecta *erm(B)* en bacterias del género *Prevotella*.

La presencia de *erm(F)* era de esperar puesto que parece ser que este gen se encuentra distribuido ampliamente entre bacterias anaerobias negro pigmentadas, integrado normalmente en transposones conjugativos junto con *tet(Q)*, un gen de resistencia a TET^{245,353}. Por otro lado, *erm(B)* ha sido ampliamente encontrado en estreptococos del ambiente oral, ubicado en transposones de la familia Tn916/1545^{42,289}. El gen *intTn* codifica para la proteína Int, involucrada en la transposición de estos elementos genéticos móviles. En este estudio, 4 aislados portadores de *erm(B)* y 19 aislados portadores de *erm(F)* también presentaban el gen *intTn*. Esto podría ser una indicación de la presencia de transposones en estos aislados, aunque se deberían llevar a cabo más estudios para confirmarlo. La presencia de estos genes de resistencia en elementos transferibles podría otorgarles la habilidad de transferirse tanto dentro del género *Prevotella* como a otras bacterias orales, alimentando un reservorio de genes de resistencia en el ambiente oral^{243,370}.

Se observaron diferencias al comparar los valores de CMI₅₀ de AZM y ERY con la presencia o ausencia de genes de resistencia a macrólidos. En el caso de *erm(B)*, se observaron incrementos del valor de CMI₅₀ de 15,63 y 5,26 veces para ERY y AZM respectivamente. Sin embargo, el número de aislados que portaban *erm(B)* era demasiado bajo como para extrapolar conclusiones. En el caso de *erm(F)*, los valores de CMI₅₀ también aumentaron 23,44 y 31,58 veces para ERY y AZM respectivamente. Además, se observaron valores de CMI para ambos antibióticos significativamente más altos en aquellos aislados que portaban *erm(F)*. Puesto que *erm(F)* se detecta a menudo en bacterias anaerobias negro pigmentadas^{353,357}, cierto nivel de resistencia era de esperar en *Prevotella*. Dado el incremento en el nivel de resistencia a AZM conferido por *erm(F)*, y la presencia de este gen entre bacterias anaerobias negro pigmentadas, el uso de la AZM como una opción terapéutica podría estar en riesgo si estos genes se diseminan.

En este estudio se usó una concentración de corte de $\geq 12 \mu\text{g/ml}$ para determinar la resistencia a AZM, dado que ni el EUCAST ni el CLSI proporcionan concentraciones de corte de macrólidos para bacterias anaerobias gramnegativas. El porcentaje de susceptibilidad $\geq 12 \mu\text{g/ml}$ en los aislados obtenidos de pacientes con periodontitis fue alta (31%), con valores de CMI_{50} y CMI_{90} más elevados que los previamente reportados, incluso en España. Estos valores fueron muy similares para los dos antibióticos, indicando una susceptibilidad similar de *Prevotella* spp. a ERY y AZM. De los 7 genes buscados, se detectó *erm*(B) y *erm*(F), y ambos parecían estar asociados con un mayor nivel de resistencia a ERY y AZM al compararlos con aislados en los que no se detectó ningún gen. Puesto que había aislados que presentaban altos niveles de resistencia y a su vez no eran portadores de ninguno de los genes buscados, sería interesante realizar estudios futuros orientados a entender qué mecanismos usan esos aislados de *Prevotella* spp. para resistir a los macrólidos.

Finalmente, la monitorización de resistencias a antibióticos debería ser efectuada regularmente para ayudar a los clínicos a elegir el mejor régimen antibiótico para sus pacientes, puesto que parece que la resistencia a AZM está incrementando en *Prevotella* spp., y que algunos genes con una alta capacidad de transferencia podrían ser responsables de ello.

Capítulo 6

**Prevalencia de bacterias resistentes a β -lactámicos
aisladas de pacientes con periodontitis**

8. Prevalencia de bacterias resistentes a β -lactámicos aisladas de pacientes con periodontitis

8.1 Resumen

Los β -lactámicos son los antibióticos más utilizados en la práctica clínica. En el ambiente oral, la combinación de AMX y MZ es una de las más usadas para el tratamiento de la periodontitis. Por este motivo, es importante monitorizar las resistencias a β -lactámicos en la microbiota bucal, así como los genes que puedan conferir esta resistencia. Además, analizar la resistencia a otros antibióticos de aquellas bacterias resistentes puede ayudar a definir un tratamiento alternativo para aquellos pacientes en los que el tratamiento con β -lactámicos no dé resultados debido a las resistencias. En este estudio se analizó la microbiota resistente a AMX y CTX, obtenida de 130 muestras subgingivales de pacientes con periodontitis. A los aislados obtenidos se los identificó a nivel de especie y se les hizo un *screening* de 7 genes que codifican para β -lactamasas. Además, la resistencia fenotípica a otros 6 antibióticos fue estudiada.

Los resultados mostraron una gran presencia de aislados resistentes a β -lactámicos entre las muestras analizadas. Los aislados identificados más frecuentemente pertenecían a los géneros *Streptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella*, y los genes *bla_{CTXA}* y *bla_{TEM}* fueron los más detectados. En cuanto a la multiresistencia a antibióticos de los aislados, la resistencia a ERY y KAN fue la más observada. Estos resultados podrían poner en duda el uso de β -lactámicos para el tratamiento del ambiente oral, del cual hoy en día se pueden beneficiar los pacientes con periodontitis.

8.2 Introducción

La periodontitis es una enfermedad infecciosa compleja causada por una disbiosis del biofilm subgingival y una respuesta desproporcionada del sistema inmune del huésped³⁷¹. El desbridamiento supra y subgingival, junto con la motivación e instrucciones de higiene oral son los tratamientos estándar de la periodontitis, y los antimicrobianos pueden ser utilizados como terapia adyuvante en determinadas condiciones^{95,372,373}. La etiología microbiana de las enfermedades periodontales inflamatorias justifica el uso de medicación antimicrobiana en la terapia periodontal. Los antibióticos pueden estar especialmente indicados en pacientes de 36 años o menos, con periodontitis estadio II o para pacientes con pérdida de nivel clínico de inserción de hueso radiografiado en más de 2 sitios no adyacentes³⁷⁴. Los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de la periodontitis son los β -lactámicos, especialmente la AMX, la cual puede administrarse junto con MZ⁹⁵. Se ha descrito que aquellas bacterias resistentes a β -lactámicos también pueden ser resistentes a otros antibióticos como las TETs, aminoglicósidos y CHL³⁷⁵⁻³⁷⁷. El mecanismo más importante de resistencia a β -lactámicos son las β -lactamasas, enzimas que rompen el anillo β -lactámico e inactivan al antimicrobiano³⁷⁸. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) pueden hidrolizar un amplio rango de β -lactámicos tales como las penicilinas, cefalosporinas y monobactams, siendo inhibidas por inhibidores de β -lactamasas tales como el ácido clavulánico^{377,379,380}. Las BLEEs fueron detectadas en los años 80 en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* y hoy en día se han observado tanto en enterobacterias como en otros filos bacterianos colonizadores de humanos. Se han descrito más de 230 BLEEs, incluyendo las de tipo TEM, CTX-M, OXA y KPC³⁸⁰. *bla*_{TEM} ha sido descrita como la BLEE más prevalente del ambiente oral, aunque los estudios que han buscado estos genes en la microbiota oral son escasos^{264,381-383}. Otras β -lactamasas encontradas en el biofilm oral incluyen *bla*_{CfxA}, *bla*_{CepA/CblA} y *bla*_{ampC}, sugiriendo que la boca puede ser un reservorio de genes de β -lactamasas. De hecho, el ambiente oral, al ser un lugar de tránsito para bacterias que entran al sistema digestivo y albergando

más de 700 especies distintas que crecen formando un biofilm, ofrece oportunidades excelentes para que se produzca transferencia genética horizontal^{42,384}.

España es uno de los países de europeos con un mayor consumo de antibióticos, lo cual se ha relacionado con el aumento de la resistencia a los mismos²⁵². Se conoce muy poco acerca de la distribución de genes de β -lactamasas presentes en la microbiota subgingival de pacientes españoles con periodontitis. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue investigar los genes de β -lactamasas en la microbiota subgingival resistente a AMX y CTX aislada de 130 pacientes con periodontitis. Adicionalmente, se evaluó la multiresistencia de estos aislados a CHL, TET, KAN, ERY y STR.

8.3 Material y métodos

8.3.1 Población sujeta a estudio, muestreo de bacterias subgingivales y cultivo bacteriano

Los aislados resistentes a β -lactámicos fueron obtenidos de las muestras del capítulo 2. Las condiciones clínicas de los pacientes vienen detalladas en el capítulo 2, y el protocolo de obtención de las muestras se puede consultar en el capítulo 1.

Las muestras subgingivales se dispersaron en vórtex durante 60 segundos. Se hicieron diluciones seriadas que fueron sembradas por duplicado en agar sangre, agar sangre con CTX a 2 $\mu\text{g/ml}$ y agar sangre con AMX a 8 $\mu\text{g/ml}$ (ambos antibióticos de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), siguiendo las concentraciones de corte para bacterias anaerobias recomendadas por el CLSI³⁵⁹ y el EUCAST. Dado que la microbiota oral contiene diferentes géneros bacterianos, y que muchos de estos no son mencionados en las guías del CLSI o del EUCAST^{359,360}, las concentraciones fueron elegidas basándonos en los parecidos taxonómicos de las bacterias del ambiente oral, usando las concentraciones más elevadas en caso de duda. Por lo tanto, aquellas bacterias

que crecieron en placas con antibióticos fueron consideradas resistentes. Con el objetivo de obtener un mayor rango de microbiota subgingival, la mitad de las placas fueron incubadas en condiciones anaerobias y la otra mitad en condiciones microaerófilas (5% CO₂) a 37°C durante 48-72 horas. Todas las morfologías distintas fueron seleccionadas, resembradas para obtener cultivos axénicos y preservadas a -80°C en una solución de glicerol al 30%.

8.3.2 Extracción de DNA y secuenciación

El protocolo para obtener DNA de los aislados y para secuenciar el gen 16S rRNA fue el mismo que el usado en el capítulo 1.

8.3.3 Detección de genes β -lactamasas

Para la detección de 7 genes de resistencia a β -lactámicos se utilizaron los primers descritos en la tabla 17. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con entre 30 y 100 ng de DNA, 1X tampón de PCR, 1X solución de nucleótidos, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de cada primer y 1 unidad de Taq polimerasa (Talara, Tokio, Japón). Todas las PCR se iniciaron con 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C y se finalizaron con 10 minutos de elongación final a 72°C. El número de ciclos y condiciones para cada set de primers fueron los siguientes: i) para la detección de *bla*_{CfxA}: 26 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 72°C. ii) para la detección de *bla*_{CepA/CblA}: 29 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C. iii) para la detección de *bla*_{ampC}: 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C. iv) para la detección de *bla*_{OXA}: 30 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 55°C y 40 segundos a 72°C. v) para la detección de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} se llevó a cabo una PCR multiplex³⁸⁵ con el siguiente programa: 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. DNA de los aislados portando los genes investigados fue utilizado como control positivo. Para confirmar la presencia de los genes en los controles, los

amplicones de PCR del tamaño esperado fueron secuenciados y alineados con secuencias de referencia publicadas en Genbank mediante el software BLAST. Los controles negativos incluyeron agua estéril grado Milli-Q en lugar de DNA en la mezcla de PCR.

Tabla 17. Lista de primers utilizados en este estudio

Primers	Secuencia 5' – 3'	T _m (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
CFXA F CFXA R	GCA AGT GCA GTT TAA GAT T GCT TTA GTT TGC ATT TTC ATC	58	934	264
CepA/CbIA F CepA/CbIA R	CAA AGY GAC AAY AAT GCC TGC G TSA CGA AGR CGG CWA T	58	426	382
AMPC F AMPC R	TAA ACA CCA CAT ATG TTC CG ACT TAC TTC AAC TCG CGA CG	50	769	382
OXA F OXA R	TAT CGC GTG TCT TTC GAG TA TTA GCC ACC AAT GAT GCC	55	700	382
TEM F TEM R	TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA GAA TGA ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT	60	445	385
SHV F SHV R	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG TGC TTT GTT ATT CGG GCC AA	60	747	385
CTX-M F CTX-M R	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG	60	593	386

8.3.4 Análisis de resistencia a antibióticos *in vitro*

El protocolo para determinar la resistencia de los aislados a los distintos antibióticos testados fue el mismo que el usado en el capítulo 1 con dos modificaciones: todos los aislados fueron testados para TET a 8 µg/ml, y aquellos aislados crecidos en AMX fueron testados para CTX a 2 µg/ml, mientras que los aislados crecidos en CTX fueron testados para AMX a 8 µg/ml. Los aislados crecidos en condiciones microaerofílicas fueron incubados nuevamente en microaerofilia durante el test de susceptibilidad a antibióticos.

8.3.5 Análisis estadístico

La prueba χ^2 fue utilizada como test estadístico para encontrar diferencias entre la prevalencia de los genes analizados y la resistencia fenotípica a los antibióticos testados entre las especies identificadas en este estudio. Los p valores inferiores a 0,05 fueron aceptados para indicar diferencias estadísticas.

8.4 Resultados

Se obtuvieron 130 muestras de pacientes con periodontitis generalizada y estadios III o IV. Los pacientes presentaban edades comprendidas entre los 24 y 82 años (media de 51,3), una profundidad de sondaje de $6,6 \pm 1,8$ mm, nivel clínico de inserción de $7,6 \pm 2,1$ mm y un 92,1% de sangrado al sondear en los sitios gingivales. De las 130 muestras, 63 (48,5%) y 33 (25,4%) presentaron aislados resistentes a AMX en condiciones de anaerobiosis (ARIA) y microaerofilia (ARIM), respectivamente, mientras que 98 (75,4%) y 70 (53,6%) presentaron aislados resistentes a CTX en condiciones de anaerobiosis (CRIA) y microaerofilia (CRIM) respectivamente. Veintiocho muestras (21,5%) crecidas en anaerobiosis y 53 (40,8%) crecidas en condiciones microaerofílicas no presentaron ningún aislado resistente a β -lactámicos. Veintidós muestras (16,9%) no presentaron aislados resistentes a β -lactámicos ni en condiciones anaeróbicas ni microaerofílicas. Las muestras crecidas en agar sangre sin antibióticos presentaron una carga bacteriana de $7,3 \log_{10}$ ufc/ml ($\pm 1,3$) en condiciones anaerobias y $7,1 \log_{10}$ ufc/ml ($\pm 0,9$) en condiciones microaerofílicas. De promedio, el número de ufc/ml de bacterias resistentes a β -lactámicos implicó una reducción de 1 logaritmo (tabla 18).

Tabla 18. Recuentos bacterianos expresados en ufc/ml.

	Anaerobiosis			Microaerofilia		
	Resistentes AMX	Resistentes CTX	Bacterias totales	Resistentes AMX	Resistentes CTX	Bacterias totales
Contaje bacteriano	1,3 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁷
Resistencia %	6.5	11.6	-	9.6	8.8	-

De las muestras subgingivales se obtuvieron 181 ARIAs, 84 ARIMs, 293 CRIAs y 179 CRIMs, sumando un total de 737 aislados. Las bacterias aisladas fueron identificadas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA y la presencia de genes de resistencia a β -lactámicos fue evaluada mediante PCR. Adicionalmente, se testó la resistencia fenotípica a CHL, STR, ERY, TET y KAN. Además, la resistencia a AMX y CTX fue testada dependiendo de que antibiótico fuera utilizado para su selección inicial (Tablas 20 y 21). Bacterias del género *Prevotella* fueron las más aisladas (n=213), principalmente las especies *P. nigrescens* (n=70) y *P. intermedia* (n=65), seguido del género *Streptococcus* (n=153), con una amplia variedad de especies dentro de este género (Tabla 21). El género *Prevotella* fue significativamente ($p < 0,01$) más prevalente en ARIAs, mientras que el género *Veillonella* fue más prevalente en CRIAs ($p < 0,01$). Respecto a las bacterias crecidas en condiciones microaerofílicas, el género *Neisseria* fue significativamente más prevalente en ARIMs ($p < 0,05$), mientras que el género *Micrococcus* fue más prevalente en CRIMs ($p < 0,01$). Más del 12 por ciento (12,1%) de los aislados fueron identificados a nivel de género y un 8% de los aislados no pudieron ser identificados (Tablas 20 y 21).

Respecto a los genes *bla*, *bla*_{CfXA} fue el más prevalente (24,8%), seguido de *bla*_{TEM} (12,9%), *bla*_{CepA/CblA} (1,1%) y *bla*_{SHV} (0,8%). Los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} y *bla*_{ampC} no fueron detectados. *bla*_{CfXA} fue significativamente ($p < 0,01$) más frecuente en aquellos aislados crecidos en condiciones anaerobias que en condiciones microaerofílicas.

La resistencia fenotípica a otros antibióticos fue detectada en 599 aislados (81,3%). Estos aislados fueron resistentes, como mínimo, a un antimicrobiano aparte del β -lactámico para el que fueron seleccionados previamente. 56,9% de los aislados presentaron resistencia a KAN, 54,6% a ERY, 29,4% a TET, 27,7% a STR y 9,9% a CHL. Los aislados seleccionados por AMX mostraron resistencia a CTX más frecuentemente (53,6%) que a la inversa (32,2%). La mayoría de los aislados multirresistentes lo fueron a 1-3 antimicrobianos (22,2%, 26,4% y 25,7% respectivamente) y 15 aislados (2,5%) fueron resistentes a los 6 antimicrobianos testados (Tabla 22). Se observaron diferencias estadísticas entre el porcentaje ARIAs y ARIMs resistentes a CHL y KAN, y entre el porcentaje de CRIAs y CRIMs resistentes a AMX y KAN.

Tabla 20(3). Número de bacterias resistentes a β-lactámicos organizadas por géneros identificados, β-lactámico al que fueron resistentes y condiciones de cultivo.

Géneros	Genes de resistencia					Número de aislados										Resistencia fenotípica				
	Total	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-A}	<i>bla</i> _{cepA/CblA}	<i>bla</i> _{oxA}	<i>bla</i> _{ampC}	TET	CTX/AMX	CHL	STR	ERY	KAN						
CRIA																				
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
<i>Bifidobacterium</i> sp.	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3						
<i>Campylobacter</i> sp.	9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	7	1						
<i>Capnocytophaga</i> sp.	3	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	3						
<i>Dialister</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1						
<i>Klebsiella</i> sp.	2	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	1	2	0						
<i>Morganella</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1						
<i>Olsenella</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0						
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	6	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	3	4						
<i>Prevotella</i> sp.	107	11	0	0	70	3	0	0	33	75	5	28	42	81						
<i>Pseudomonas</i> sp.	6	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	0	3	4						
<i>Rothia</i> sp.	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1						
<i>Serratia</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	0	3	3	1	2	3	1						
<i>Staphylococcus</i> sp.	11	3	0	0	4	0	0	0	4	5	4	3	9	5						
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
<i>Streptococcus</i> sp.	47	2	1	0	5	0	0	0	22	8	5	11	27	43						
<i>Veillonella</i> sp.	74	19	0	0	7	1	0	0	12	16	4	39	69	43						
No determinado	11	2	0	0	0	0	0	0	3	1	0	4	3	3						

Tabla 20(4). Número de bacterias resistentes a β-lactámicos organizadas por géneros identificados, β-lactámico al que fueron resistentes y condiciones de cultivo.

Géneros	Total	Genes de resistencia							Número de aislados							Resistencia fenotípica						
		<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{CTX-A}</i>	<i>bla_{CepA/CbIA}</i>	<i>bla_{OXA}</i>	<i>bla_{ampC}</i>	TET	CTX/AMX	CHL	STR	ERY	KAN	TET	CTX/AMX	CHL	STR	ERY	KAN		
GRIM																						
<i>Acinetobacter</i> sp.	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	3	5	5	5	3		
<i>Capnocytophaga</i> sp.	10	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	10		
<i>Corynebacterium</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	2		
<i>Dermaococcus</i> sp.	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	2	3	2	2		
<i>Haemophilus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1		
<i>Janibacter</i> sp.	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Micrococcus</i> sp.	27	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	9	7	4	4		
<i>Neisseria</i> sp.	13	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	1	11	1	1		
<i>Paenibacillus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0		
<i>Pseudomonas</i> sp.	11	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5	8	7	3	10	2	2		
<i>Roseomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
<i>Rothia</i> sp.	8	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Sphingomonas</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0		
<i>Staphylococcus</i> sp.	8	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	2	1	1		
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	2	2	2		
<i>Streptococcus</i> sp.	55	7	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	18	1	1	9	28	32	2		
<i>Veillonella</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2		
No determinado	19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	5	5	11	7	7		

Tabla 21. Número de bacterias resistentes a β-lactámicos organizadas por especies identificadas, β-lactámico al que fueron resistentes y condiciones de cultivo. C/A: Cefotaxima/Amoxicilina

Especies	Genes de resistencia						Resistencias						Resistencia fenotípica					
	Total	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-A}	<i>bla</i> _{CapA/CBlA}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{ampC}	TET	CIA	CHL	STR	ERY	KAN				
ARIA																		
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4				
<i>Alloprevotella rava</i>	4	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1				
<i>Anaerococcus nagyae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0				
<i>Eikenella corrodens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1				
<i>Escherichia coli</i>	4	2	2	0	0	0	0	0	2	2	1	1	3	3				
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	1				
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2				
<i>Leptotrichia trevisani</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1				
<i>Prevotella baroniae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>Prevotella buccae</i>	17	3	0	0	12	0	0	0	7	15	0	3	10	15				
<i>Prevotella dentalis</i>	7	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>Prevotella denticola</i>	5	0	0	0	4	0	0	0	4	2	0	1	2	4				
<i>Prevotella disiens</i>	2	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	1	1	2				
<i>Prevotella intermedia</i>	24	6	0	0	17	1	0	0	12	15	0	9	9	18				
<i>Prevotella maculosa</i>	3	0	0	0	1	0	0	0	2	3	0	0	3	3				
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5	1	0	0	1	0	0	0	4	5	0	4	5	5				
<i>Prevotella nigrescens</i>	35	4	0	0	19	0	0	0	12	23	1	6	11	27				
<i>Prevotella oralis</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	1	2	2				
<i>Prevotella oris</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	2	2				
<i>Prevotella pallens</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	2	2				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1				

Continúa de ARIA

Especies	Genes de resistencia											Resistencias							Resistencia fenotípica				
	Total	<i>bla</i> _{TEM}		<i>bla</i> _{SHV}		<i>bla</i> _{CTX-M}		<i>bla</i> _{CTX-A}		<i>bla</i> _{CepA/CblA}		<i>bla</i> _{OXA}		<i>bla</i> _{ampC}		TET	C/A	CHL	STR	ERY	KAN		
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-A}	<i>bla</i> _{CepA/CblA}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{ampC}															
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	2	2	1		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0		
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	1		
<i>Streptococcus australis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
<i>Streptococcus cristatus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	2			
<i>Streptococcus mitis</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	5	6			
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	1	4	3			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2			
<i>Streptococcus rubneri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0			
<i>Streptococcus salivarius</i>	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5	4			
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0			
<i>Streptococcus</i> sp.	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	1	3	5			
<i>Veillonella dispar</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0			
<i>Veillonella parvula</i>	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0			
<i>Veillonella</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
No determinado	15	3	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0	3	5	5			
ARIM																							
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0			
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0			
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
<i>Actinomyces oris</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Bacillus cereus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
<i>Capnocytophaga leadbetteri</i>	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2			

Continúa de ARIM

Especies	Genes de resistencia											Resistencias							Resistencia fenotípica				
	Total	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CRX-A}	<i>bla</i> _{CepA/CblA}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{ampC}	TET	C/A	CHL	STR	ERY	KAN								
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	3	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	1	0	3			
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0			
<i>Haemophilus pittmaniae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Micrococcus luteus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0			
<i>Neisseria flavescens</i>	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0			
<i>Neisseria meningitidis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0			
<i>Neisseria perflava</i>	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0			
<i>Neisseria sp.</i>	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
<i>Neisseria subflava</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0			
<i>Paenibacillus sp.</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0			
<i>Pantoea sp.</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0			
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0			
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	5	1	5	0	0			
<i>Pseudomonas oryzae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0			
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0			
<i>Pseudomonas putida</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	2	0	0			
<i>Roseomonas sp.</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0			
<i>Sphingomonas desiccabilis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0			
<i>Sphingomonas sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	1	3	3	3	0			
<i>Streptococcus anginosus</i>	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5	0			
<i>Streptococcus constellatus</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0			
<i>Streptococcus cristatus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0			
<i>Streptococcus mitis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0			
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0			

Continúa de ARIM

Especies	Genes de resistencia										Resistencias						Resistencia fenotípica					
	Total	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-A}	<i>bla</i> _{CepA/CbIA}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{ampC}	TET	C/A	CHL	STR	ERY	KAN								
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1								
<i>Streptococcus sanguinis</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3								
<i>Streptococcus</i> sp.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2								
No determinado	13	1	0	0	0	0	0	0	0	5	9	5	6	5								
CRIA																						
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
<i>Bifidobacterium longum</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3								
<i>Campylobacter gracilis</i>	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	7								
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2								
<i>Capnocytophaga granulosa</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1								
<i>Dialister pneumosintes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1								
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	2								
<i>Morganella morganii</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1								
<i>Olisella uli</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0								
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	6	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	4								
<i>Prevotella buccae</i>	11	3	0	0	7	0	0	0	0	5	10	1	4	6								
<i>Prevotella dentalis</i>	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
<i>Prevotella denticola</i>	6	0	0	0	3	0	0	0	0	3	6	0	0	6								
<i>Prevotella disiens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1								
<i>Prevotella intermedia</i>	41	3	0	0	25	1	0	0	0	13	30	1	18	36								
<i>Prevotella maculosa</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0								
<i>Prevotella multiformis</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
<i>Prevotella nigrescens</i>	35	4	0	0	26	0	0	0	0	10	23	1	1	15								
<i>Prevotella oralis</i>	4	0	0	0	3	2	0	0	0	1	4	2	2	4								

Continúa de CRIA

Especies	Genes de resistencia											Resistencia fenotípica									
	Resistencias											TET	C/A	CHL	STR	ERY	KAN				
	Total	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CEC}	<i>bla</i> _{CEC}	<i>bla</i> _{CEC}	<i>bla</i> _{CEC}							<i>bla</i> _{ampC}			
<i>Prevotella oris</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Prevotella</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas japonica</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas luteola</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas montelii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rothia dentocariosa</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia proteamaculans</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus anginosus</i>	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus australis</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus constellatus</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus dentisani</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus infantis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus massiliensis</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus mitis</i>	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus oralis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus peroris</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continúa de CRIA

Especies	Genes de resistencia										Resistencia fenotípica					
	Total	Resistencias					TET	C/A	CHL	STR	ERY	KAN				
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CrA}	<i>bla</i> _{CepA/CblA}							<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{AmpC}		
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	2	4	4
<i>Streptococcus</i> sp.	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	2	2	7
<i>Veillonella dispar</i>	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	3
<i>Veillonella parvula</i>	57	15	0	0	7	1	0	0	0	0	11	15	3	31	54	33
<i>Veillonella</i> sp.	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	10	7
No determinado	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	4	3	3
CRIM																
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	3	5	5	3
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	6
<i>Capnocytophaga granulosa</i>	4	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Corynebacterium</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2
<i>Demacoccus nishinomiyaensis</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	2	3	2
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
<i>Janibacter sanguinis</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	25	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	8	6	4
<i>Micrococcus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>Neisseria bacilliformis</i>	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	4	1
<i>Neisseria flavescens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Neisseria oralis</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Neisseria perflava</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Neisseria</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	4	0

Continúa de CRIM

Especies	Genes de resistencia											Resistencia fenotípica						
	Total	Resistencias										TET	C/A	CHL	STR	ERY	KAN	
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-A}	<i>bla</i> _{CepA/CblA}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{ampC}										
<i>Paenibacillus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	
<i>Pseudomonas luteola</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	
<i>Pseudomonas</i> sp.	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	3	1	
<i>Roseomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
<i>Rothia dentocariosa</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Rothia mucilaginosa</i>	6	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Sphingomonas</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	
<i>Streptococcus anginosus</i>	9	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0	3	
<i>Streptococcus constellatus</i>	9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	
<i>Streptococcus cristatus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Streptococcus</i> sp.	30	6	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	8	0	0	6	
<i>Streptococcus tigurinus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
<i>Veillonella parvula</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
<i>Veillonella</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
No determinado	19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	4	5	11	

Tabla 22. Número de aislados resistentes a otros antibióticos.

Nº de antibióticos	Aislados multirresistentes				Total
	CRIA	CRIM	ARIA	ARIM	
0	47	46	37	8	138
1	37	56	16	24	133
2	70	29	33	26	158
3	73	23	49	9	154
4	39	11	28	9	87
5	26	6	18	2	52
6	1	8	0	6	15
Total	293	179	181	84	737

8.5 Discusión

En este estudio se analizó la microbiota subgingival resistente a β -lactámicos aislada de pacientes con formas graves de periodontitis. Las bacterias fueron aisladas en base a su resistencia a AMX o CTX. La AMX fue elegida por ser el β -lactámico de primera elección en varias infecciones bacterianas, incluyendo la periodontitis^{95,227,300}. El uso de CTX, una cefalosporina de tercera generación, es mucho más restringido y, por lo tanto, la resistencia a este antibiótico debería ser más escasa. Sin embargo, BLEEs como CTX-M, las cuales son efectivas frente a CTX, son prevalentes en todo el mundo^{387,388}, convirtiéndolas en objetivos de estudio interesantes al analizar la resistencia a β -lactámicos.

Un promedio del 7,8% de la microbiota cultivable aislada en este estudio fue resistente a AMX, lo cual fue ligeramente superior a lo encontrado en un estudio previo de muestras españolas en las que se comparó la microbiota subgingival de sujetos españoles y neerlandeses²⁹⁴. En la población de este estudio, la resistencia a CTX resultó ser más prevalente, con el 82,3% de los pacientes presentando al menos un aislado resistente, que la resistencia a AMX (55,4%). Se detectó una gran cantidad de

aislados de *Veillonella* resistentes a CTX (n=76), y muy pocos a AMX (n=5), lo cual podría ser una explicación para la alta prevalencia de resistencia a CTX. Estudios previos han descrito que el género *Veillonella* tiene poca susceptibilidad a los β -lactámicos, probablemente debido a la presencia de PBPs con poca afinidad a estos antibióticos³⁸⁹⁻³⁹². Además, algunos estudios analizaron aislados de *Veillonella* y encontraron CMI's más altas para cefoxitina que para AMX y ampicilina^{390,391}, sugiriendo que *Veillonella* spp. podría ser más resistente a cefalosporinas que a aminopenicilinas. En el presente estudio, *P. nigrescens* (n=70), *P. intermedia* (n=65) y *V. parvula* (n=60) fueron las especies más aisladas. Esto concuerda con reportes previos que indican que *Prevotella* es el principal género bacteriano oral que expresa resistencia a β -lactámicos^{250,261,393}. La mayoría de los estudios que analizan la resistencia a β -lactámicos han basado su selección de aislados en la producción de β -lactamasas y, por lo tanto, y a pesar de ser resistentes a β -lactámicos, el género *Veillonella* ha sido descartado al no producir β -lactamasas^{389,391,394}.

En este estudio, la multiresistencia a antibióticos fue analizada en cada aislado mediante concentraciones de corte sugeridas por el EUCAST y el CLSI. Todos los aislados que crecieron en placas con antibióticos fueron consideradas resistentes. De los 737 aislados resistentes a β -lactámicos, 81,3% fueron multiresistentes. De éstos, el 63,3% fueron seleccionados por resistencia a CTX y el 36,7% por resistencia a AMX, siendo estos valores muy similares al porcentaje de aislados totales resistentes a CTX y a AMX (64% y 35% respectivamente), con escasa diferencia respecto a si fueron cultivadas en condiciones anaerobias o microaerófilas. Esto sugeriría que la multiresistencia no depende de la selección inicial por AMX o CTX. Se observaron pocas diferencias entre los 4 grupos de aislados excepto por la resistencia a KAN, CHL y AMX. La resistencia a KAN fue más prevalente en aislados anaerobios debido principalmente a la resistencia inherente de las bacterias anaerobias a este antibiótico³⁹⁵ y a la presencia de aislados de *Prevotella*, los cuales son conocidos por

presentar una mayor tolerancia a KAN que otras bacterias orales³⁹⁶. La resistencia a CHL fue observada en altos porcentajes en aislados microaerófilos debido a los aislados de *Pseudomonas*, los cuales son capaces de exhibir niveles altos de resistencia gracias a sus bombas de flujo^{397,398}. Por otro lado, la resistencia a AMX fue menos observada en CRIMs, probablemente debido a la falta de aislados de *Prevotella*, los cuales incrementaron la prevalencia de resistencia a AMX en CRIAs.

Quince aislados presentaron resistencia a los 7 antibióticos testados en este estudio, procedentes todos de distintos pacientes. Los aislados fueron identificados como *V. parvula* (n=3), *P. aeruginosa* (n=2), *Acinetobacter guillouiae* (n=3) y *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1). De los 15 aislados, 6 no pudieron ser identificados mediante secuenciación del gen 16S rRNA. Se ha descrito que los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas* son ricos en bombas de flujo, lo cual les confiere resistencia a múltiples antibióticos¹⁶⁴. Además, la resistencia a TET, KAN y ERY se puede ligar a la presencia de transposones de la familia Tn916/1545, los cuales son comunes en la microbiota oral y portan genes que confieren resistencia a estos antibióticos^{274,325}. Estos transposones se han descrito en *Veillonella*^{399,400}, lo cual podría ser la causa de la multiresistencia observada.

El gen *bla*_{CfxA} fue detectado en el 24,8% de los aislados, de los cuales el 71% (n=136) fueron bacterias del género *Prevotella*. Este género ha sido previamente asociado al gen *bla*_{CfxA}, obteniendo resistencia a varias penicilinas y cefalosporinas⁴⁰¹. Tal y como describieron estudios previos^{260,381,382}, se observó una alta prevalencia de *bla*_{CfxA} en aislados del género *Capnocytophaga* (83,3%). Hasta donde nosotros sabemos, esta es la primera vez que se detecta el gen *bla*_{CfxA} en los géneros *Staphylococcus*, *Alloprevotella*, *Streptococcus* y *Veillonella*. Puesto que el biofilm oral es un entorno favorable para la transferencia genética horizontal^{402,403}, es posible que el gen *bla*_{CfxA} se transfiriera desde los géneros *Prevotella* y *Capnocytophaga*, los cuales son

portadores habituales³⁸². El gen *bla*_{TEM} fue encontrado en el 23,1% de las muestras y el 12,9% de los aislados, principalmente en *Veillonella* spp. y *Prevotella* spp. La prevalencia de este gen fue baja en comparación con el estudio llevado a cabo por Ioannidis *et al.*, en el que se observó una prevalencia de entre 46,2% y 72,7% de *bla*_{TEM} en muestras subgingivales y linguales de sujetos griegos²⁵¹. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el mayor consumo de antibióticos por parte de la población griega de acuerdo al European Centre for Disease Prevention and Control⁴⁰⁴, o a la metodología empleada, puesto que la detección de *bla*_{TEM} se realizó a partir de un conjunto de bacterias subgingivales en cada muestra, independientemente de sus patrones de resistencia o de su habilidad de crecer aisladas. Hay que destacar la detección de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CfXA} en estreptococos, puesto que existe cierta controversia acerca de la presencia de genes *bla* en este género. Pese a que se ha sugerido que los estreptococos son incapaces de adquirir genes *bla* foráneos⁴⁰⁵, al menos dos estudios han descrito la presencia de estos genes en *S. pneumoniae*⁴⁰⁶. La detección de *bla*_{TEM} por Ding *et al.*, fue cuestionada debido a una posible contaminación de la Taq polimerasa utilizada en la reacción⁴⁰⁷, sin embargo, en nuestro estudio los controles negativos no sugieren la presencia de contaminación. Por lo tanto, sería interesante realizar futuros estudios para analizar la presencia de genes *bla* entre estreptococos orales. Tanto *bla*_{CepA/CblA} como *bla*_{SHV} fueron detectados en bajas proporciones tal y como se ha descrito en estudios previos^{382,393,408}, sugiriendo que probablemente no juegan un rol crítico en la resistencia a β -lactámicos en el ambiente oral.

Con los datos obtenidos en este estudio, se puede concluir que la resistencia a β -lactámicos está ampliamente distribuida en la microbiota subgingival de pacientes españoles con periodontitis. *Prevotella*, *Veillonella* y *Streptococcus* fueron los géneros con un mayor número de aislados resistentes a β -lactámicos, sugiriendo que, en esta población, la microbiota oral comensal puede ser un reservorio de resistencia a

β -lactámicos. De especial importancia es la presencia de β -lactamasas codificadas en genes transferibles como *bla*_{TEM} y *bla*_{ClxA}, los cuales podrían transferir a otras bacterias orales o bacterias en tránsito a otras partes del cuerpo. Además, una alta prevalencia de bacterias multirresistentes fue observada, limitando el número de antibióticos disponibles, de ser necesarios, frente a infecciones bacterianas. Pese a los informes avisando del aumento de la resistencia a antimicrobianos, éstos son normalmente recetados en la práctica clínica sin un estudio previo de los perfiles microbianos y sin realizar antibiogramas; prácticas, éstas, que favorecen la diseminación de la resistencia a antimicrobianos. Lo anterior, junto con los altos porcentajes de resistencia a β -lactámicos observados en este estudio, subraya el riesgo de que un tratamiento antibiótico que hoy en día es efectivo, se convierta en ineficaz.

Discusión general

9. Discusión general

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue analizar las resistencias que presenta la microbiota subgingival a las clases de antibióticos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones bacterianas de la boca y especialmente en el tratamiento de la periodontitis⁹⁸. Para ello, en los **capítulos 1, 2, 3 y 4**, se hizo un análisis de la resistencia a TET, en el **capítulo 5** un estudio de resistencia a macrólidos y en el **capítulo 6** una investigación acerca de la resistencia a β -lactámicos. El ambiente oral ha sido definido como un ambiente idóneo para la transferencia genética horizontal^{42,338}, y aunque en todos los capítulos se ha hecho énfasis en esta idea, en el **capítulo 4** se estudió particularmente un gen de resistencia a TET nunca antes descrito en bacterias grampositivas, remarcando aún más la proclividad a la transferencia genética horizontal que proporciona el ambiente oral.

Las resistencias a antibióticos en el biofilm oral han sido estudiadas de distintas formas. Algunos investigadores han analizado los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de microorganismos concretos^{250,293,295}, mientras que otros han realizado estudios basados en la presencia de genes de resistencia^{243,251,253,291}. Sin embargo, ningún trabajo ha estudiado la distribución de genes de resistencia a antibióticos en la microbiota subgingival de sujetos sanos y con periodontitis y ha identificado a las especies portadoras de dichos genes. La mayoría de los estudios que investigaron la prevalencia de genes de resistencia lo hicieron a partir de extracciones de DNA metagenómico, o bien a partir de bacterias aisladas de múltiples nichos del ambiente oral y sin definir su origen. La aproximación tomada en esta tesis permite relacionar los genes de resistencia a antibiótico con las especies que los portan, y concretamente, con las especies que habitan en el surco subgingival, las cuales son la principal causa de la periodontitis^{59,61}. Esta relación permite entender qué bacterias pueden ser susceptibles a determinados antibióticos y predecir cual puede ser el patrón de

propagación de dichas resistencias, puesto que la transferencia genética horizontal ocurre con más facilidad entre aquellas especies taxonómicamente afines^{409,410}.

Las resistencias a las TETs han llegado a convertir a este grupo de antibióticos, ampliamente usado en sus orígenes debido a su amplio espectro, en una opción muy restringida a ciertos tratamientos para los cuales aún son útiles. En el ambiente oral las TETs se utilizan principalmente como antibióticos de aplicación localizada, con fibras impregnadas o con pomadas¹³⁴⁻¹³⁶ con buenos resultados, evitando así los efectos secundarios de la administración sistémica de antibióticos. Sin embargo, los genes de resistencia a TET, ampliamente distribuidos entre estreptococos y otros géneros bacterianos²⁴³ pueden reducir o incluso acabar con la efectividad de este tratamiento. Por otro lado, el limitado uso de las TETs en la medicina actual implica que pocos individuos se han visto expuestos a esta clase de antibióticos, y por lo tanto no ha existido una presión selectiva sobre su microbiota subgingival que justifique su mantenimiento en el genoma bacteriano^{111,122}. Sin embargo, tal y como describen otros estudios y como se ha visto en los capítulos 1 y 2, éste no ha sido el caso. Aunque se observaron diferencias entre la prevalencia de esta resistencia en muestras obtenidas de pacientes con periodontitis y de pacientes sin periodontitis, se pudo constatar que la resistencia a TET sigue vigente en ambos tipos de muestra pese a su baja exposición. Esta elevada prevalencia puede, como han señalado algunos estudios, deberse a la adaptación al coste que supone mantener los genes de resistencia en el genoma⁴¹¹⁻⁴¹³, o bien a la elevada presencia de transposones conjugativos de la familia Tn916/1545 en el ambiente oral. Estas premisas, unidas a las facilidades que ofrece dicho ambiente para la transferencia genética y a que dichos elementos genéticos móviles suelen transportar genes de resistencia a TET, generan las condiciones para que la resistencia a TET permanezca en el ambiente oral. Los genes de resistencia a TET más observados en el presente estudio codifican para proteínas de protección ribosomal, lo cual coincide con lo descrito previamente^{111,243,251}. No obstante, se observaron

diferencias entre las prevalencias de los genes detectados según el origen clínico de las muestras (Figura 19). Por ejemplo, el número de aislados que no portaban ninguno de los genes de resistencia analizados y, sin embargo, eran resistentes a TET, fue notablemente superior en los obtenidos de muestras de pacientes con periodontitis. Estos aislados fueron principalmente estreptococos, género que pese a ser predominante en ambos tipos de muestras, presentó prevalencias muy distintas respecto a las especies identificadas (ver capítulo 3). Esta diferencia de especies podría ser la causa de las distintas prevalencias de genes de resistencia a TET observadas. Sin embargo, no solo el origen clínico puede influenciar la microbiota obtenida y los genes de resistencia observados. El origen geográfico de las muestras también parece influenciar en este aspecto, puesto que Ioannidis *et al.* encontró un porcentaje más elevado de *tet(M)* en muestras de pacientes griegos con periodontitis que los encontrados por Collins *et al.* en pacientes dominicanos o en este estudio en pacientes españoles^{251,253}. Al comparar las prevalencias de genes *tet* en microbiota aislada de muestras orales también se pueden ver diferencias, con Villedieu *et al.* describiendo *tet(M)* en el 79% de los aislados obtenidos de sujetos sanos y *tet(W)* en cerca del 20%²⁴³, prevalencias superiores a las encontradas en los aislados analizados en el capítulo 1.

La multirresistencia a antibióticos fue un fenómeno ampliamente observado entre los aislados, independientemente de su origen. Las resistencias más observadas fueron a KAN y a ERY, ambas relacionadas con los transposones conjugativos de la familia Tn916/1545^{414,415} los cuales pueden transportar genes como *erm(B)* o *aphA-3*, que confieren resistencia para macrólidos y aminoglicósidos respectivamente. El elevado número de aislados resistentes a TET que también lo fueron a ERY puede ser un problema para el tratamiento con macrólidos, puesto que el gen *erm(B)* también puede conferir resistencia a AZM, como se vio en el capítulo 5³⁵¹. Sin embargo, no todos los casos de resistencia a ERY pueden relacionarse con la presencia de *erm(B)*, y por lo

tanto otros genes de resistencia a macrólidos u otros mecanismos deben estar presentes entre los aislados obtenidos que puedan conferir resistencia a ERY. De esta manera, parece que la microbiota subgingival resistente a TET también es un reservorio de resistencias a ERY y KAN. Además, esta microbiota es principalmente de tipo comensal, siendo los estreptococos mayoritarios, por lo que se incrementan las posibilidades de la transferencia de estas resistencias a otros microorganismos por mecanismos como la transformación³³⁸. La resistencia a β -lactámicos fue menos observada, aunque la resistencia a CTX entre los aislados de pacientes con periodontitis fue 3 veces superior a la de los aislados de sujetos sanos. Si bien parte de este incremento se puede entender por el mayor número de aislados de *Prevotella*, género en el que la resistencia a β -lactámicos está descrita^{261,393}, una gran parte de esta diferencia es debida al gran número de estreptococos, aislados de pacientes con periodontitis, resistentes a este antibiótico. Por lo tanto, es importante manifestar que existe microbiota comensal capaz de resistir las 3 clases de antibióticos más utilizadas para el tratamiento periodontal y que existe la probabilidad de que estos fenotipos se vayan extendiendo.

Como se ha dicho más arriba, la transferencia genética horizontal ha sido mencionada en todos los capítulos de esta Tesis Doctoral, puesto que es un elemento clave a tener en cuenta al hacer estudios de monitorización. En el capítulo 4 se estudió la presencia del gen *tet(B)*, nunca antes descrito en bacterias grampositivas, en dos aislados de *S. oralis*. La presencia de este gen en bacterias grampositivas se debe con mucha probabilidad a un fenómeno de transferencia genética horizontal y su análisis nos mostró que, aunque su presencia está confirmada, su rol en la resistencia a TET en bacterias grampositivas no está definido. La presencia de *tet(B)* había sido reportada anteriormente en *S. suis* aislado de muestras veterinarias. Sin embargo, poco más de la mitad del gen fue secuenciado, y aunque el fragmento de la secuencia obtenida encajaba con *tet(B)*, la secuenciación completa del gen sería necesaria para confirmar

un hallazgo de este tipo. En nuestro estudio encontramos el gen *tet(B)* en dos aislados de *S. oralis* obtenidos de pacientes sanos y secuenciamos la totalidad del gen para confirmar su presencia. Además, estudiamos sus niveles de expresión para determinar la funcionalidad del gen en los aislados. Para obtener la secuenciación completa del gen usamos la técnica de *primer walking*, que permite una buena resolución para fragmentos de DNA de más de 600 pares de bases. La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia publicada en GenBank con el código J01830, la cual consta como la primera secuencia de *tet(B)* publicada. Las secuencias de *tet(B)* obtenidas en este estudio fueron idénticas entre sí y difirieron de la secuencia J01830 en 5 nucleótidos que dieron lugar a 5 sustituciones aminoacídicas, observando un 95,75% de identidad, por lo que pudimos confirmar la presencia del gen³⁴¹. Sin embargo, la presencia del gen en el genoma de *S. oralis* no implicaba su expresión ni correcto funcionamiento de la proteína, por lo que se realizó un análisis de la expresión del gen mediante RT-qPCR. Los resultados mostraron que el gen tan solo se expresaba en uno de los aislados, el cual también era portador de *tet(M)*. Para descartar que la resistencia a TET estuviese siendo aportada por *tet(M)* en lugar de *tet(B)*, se hizo un mutante defectivo para *tet(M)* y se analizó su susceptibilidad a TET, siendo la misma que la del aislado salvaje. Por ello, y a no ser que hubiese otros mecanismos aportando resistencia a TET en el aislado, se hipotetizó que *tet(B)* se encontraba presente y estaba aportando resistencia a TET en *S. oralis*. En la discusión del capítulo 4 se propuso un estudio más profundo de los entornos genéticos del gen *tet(B)* para entender cómo se transfirió a *S. oralis*, y porqué se observó expresión en solo uno de los aislados. Teniendo en cuenta la capacidad de los estreptococos de captar DNA mediante transformación^{272,338}, y la idoneidad del ambiente oral para la transferencia genética horizontal⁴², el origen de la captación del gen *tet(B)* puede ser muy variado, y solo un estudio más en detalle podría arrojar luz sobre esta cuestión.

Debido al uso cada vez mayor de la AZM en el tratamiento periodontal, la monitorización de las resistencias a macrólidos en la microbiota oral es muy importante. En los capítulos 1 y 2 se testó la resistencia a macrólidos como la ERY en los aislados obtenidos y en el capítulo 5 se estudió la susceptibilidad de 100 aislados de *Prevotella* a ERY y AZM, y se analizó la relación de esta susceptibilidad con la presencia o ausencia de 7 genes de resistencia a macrólidos. Los genes elegidos fueron los previamente descritos en *Prevotella*: *erm(F)*, *erm(A)*, *erm(C)*, *erm(Q)* y *erm(G)*, el gen *erm(B)* debido a su alta prevalencia en el ambiente oral (ver capítulos 1 y 2) y el gen *mef(A)*, debido a su capacidad de propagación⁴¹⁶.

La mayoría de los aislados resistentes a AZM y ERY pertenecían a las especies *P. intermedia* y *P. nigrescens*, lo cual permitió comparar los resultados de susceptibilidad con estudios anteriores, que se focalizan principalmente en estas especies. Estos resultados indicaron una disminución en la susceptibilidad de estas especies de *Prevotella* frente a AZM en los últimos años, llegándose a quintuplicar en algunos casos los valores de CM_{I50} ^{250,293}.

La resistencia a macrólidos en bacterias anaerobias gramnegativas no puede ser determinada mediante las guías del CLSI o el EUCAST, puesto que estas instituciones no facilitan las concentraciones de corte. No obstante, algunos estudios han determinado que la concentración de AZM que se alcanza en el fluido gingival crevicular tras la toma de 500 mg es entre 7 y 8 $\mu\text{g/ml}$ ^{361,362}. En este estudio se utilizó la concentración de 12 $\mu\text{g/ml}$ como punto de corte debido a las limitaciones de resolución que ofrece la técnica de tiras E-test. A partir de este punto de corte se pudo determinar que el 31% de los aislados obtenidos eran resistentes a AZM, y un tercio de éstos no portaba ninguno de los genes analizados, debiendo su resistencia a otros genes o mecanismos.

Finalmente, de los 7 genes analizados en este estudio, tan solo se detectaron dos: *erm(F)* y *erm(B)* en cerca del 60% de los aislados. Analizando los valores de CMI₅₀ se pudo observar que ambos genes parecían aumentar el nivel de resistencia de los aislados que los portaban. Sin embargo, el bajo número de aislados con *erm(B)*, primera vez detectado en bacterias del género *Prevotella*, no permitió validar estos resultados en el análisis estadístico. No obstante, dicho análisis confirmó la relación de *erm(F)* con una menor susceptibilidad a AZM y ERY.

Los resultados obtenidos en este estudio arrojan dudas acerca del futuro de la AZM como antibiótico de elección para el tratamiento periodontal. El 31% de los aislados de *Prevotella* toleraban concentraciones de más de 12 µg/ml y la mayoría de los aislados portaban genes de resistencia a macrólidos, los cuales parecían disminuir la susceptibilidad tanto a ERY como a AZM. Estos genes se encuentran distribuidos entre la microbiota oral en el caso de *erm(B)* (ver capítulos 1 y 2), y dentro del género *Prevotella* en el caso de *erm(F)*^{245,353}, por lo que su diseminación al resto de microbiota e incluso a otros periodontopatógenos no puede ser descartada. Teniendo en cuenta el aumento de la resistencia a AZM observada y la potencial diseminación de los genes *erm* entre la microbiota oral, el tratamiento con AZM puede verse seriamente comprometido en un futuro.

Los β-lactámicos son la clase de antibióticos más utilizados en la práctica dental, por lo que la monitorización de la resistencia a estos antibióticos es esencial. En el capítulo 6 se analizó la microbiota subgingival resistente a AMX y a CTX de pacientes con periodontitis. En esta microbiota se estudió la presencia de genes productores de β-lactamasas, y la resistencia a otros antibióticos. Los genes analizados incluyeron algunos previamente descritos en el ambiente oral como *bla_{CfxA}* y *bla_{TEM}*^{251,264}, y otros genes de más rara detección en la cavidad bucal como *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{CepA/CblA}*,

bla_{ampC} y *bla_{OXA}*. Adicionalmente, se testó la resistencia de los aislados a otros antibióticos para evaluar la multirresistencia de la microbiota resistente a β -lactámicos.

La resistencia a β -lactámicos fue observada en un elevado número de muestras (82,31% de muestras con aislados resistentes a CTX y 55,38% de aislados resistentes a AMX). La CTX es una cefalosporina de tercera generación de uso hospitalario, mientras que la exposición a AMX entre la población es mucho más elevada, siendo uno de los antibióticos más recetados para el tratamiento de múltiples infecciones. Pese a esto, en este estudio se obtuvo un mayor número de aislados resistentes a CTX que a AMX, observando un 30% más de pacientes con aislados resistentes a CTX. Una de las posibles causas de la resistencia a CTX puede ser la alta prevalencia de bacterias del género *Veillonella* en el ambiente oral, las cuales han sido relacionadas con resistencias a cefalosporinas superiores a las mostradas para aminopenicilinas³⁹⁰. Junto con bacterias del género *Veillonella*, el género *Prevotella* fue el más representado entre los aislados recuperados. La relación de este último género con la resistencia a β -lactámicos y con la presencia del gen *bla_{CfxA}* ya ha sido descrita con anterioridad. De hecho, el gen *bla_{CfxA}* fue el más detectado en los aislados, principalmente en aislados de *Prevotella*, como era de esperar. El gen *bla_{TEM}* fue el siguiente más observado, presente en el 12,89% de los aislados y el 23,07% de las muestras. Esta prevalencia puede considerarse baja al compararse con un estudio anterior llevado a cabo en Grecia, donde el gen *bla_{TEM}* fue encontrado en el 46,2% de las muestras subgingivales de pacientes con periodontitis²⁵¹. El mayor consumo de β -lactámicos por parte de la población griega puede ser una de las causas de la mayor prevalencia de este gen entre las muestras subgingivales de ese estudio.

El 81,28% de los aislados presentó resistencia a más de un antibiótico, y 7 aislados fueron resistentes a todos los antibióticos testados. Algunos de estos aislados pertenecían a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*, los

cuales pueden exhibir multirresistencia debido a las bombas de flujo que pueden presentar¹⁶⁴. Además, también se encontró un aislado de *Veillonella parvula* multirresistente a todos los antibióticos testados. La resistencia intrínseca a β -lactámicos de algunos aislados de *Veillonella*, unido a la presencia de elementos genéticos móviles que confieren resistencia a multitud de antibióticos pueden ser las causas de esta multirresistencia. Este tipo de multirresistencias en microbiota comensal no hacen sino reforzar la idea del biofilm oral como reservorio de resistencias a antibióticos y su potencialidad para transmitir las a bacterias patógenas.

En resumen, en esta Tesis Doctoral se profundizó en el conocimiento de las resistencias a antibióticos de la microbiota subgingival. En la gran mayoría de las muestras observadas, se encontraron resistencias a las 3 principales clases de antibióticos utilizadas en el tratamiento periodontal. Si bien no pudo determinarse el origen de las resistencias en todos los casos, sí pudo deducirse que, en buena parte de ellos, los genes de resistencia detectados en los aislados podían ser la causa de dichas resistencias. Estos genes fueron encontrados en una diversidad de géneros bacterianos, tanto en bacterias comensales como en bacterias periodontopatógenas, confirmando que el biofilm oral es un ambiente propicio para el intercambio genético. Por lo tanto, la gran presencia de genes de resistencia en la microbiota comensal puede ser el primer paso hacia una microbiota periodontopatógena resistente a los antibióticos utilizados en el tratamiento periodontal. La monitorización de resistencias permite estudiar la evolución de la efectividad de los antibióticos entre las poblaciones bacterianas y ayuda a seleccionar el mejor tratamiento antimicrobiano. Si bien quizás sea tarde para revertir la expansión de las resistencias a antibióticos, si consideramos necesario establecer estrategias de vigilancia que retrasen su diseminación lo suficiente como para permitir la aparición de alternativas antimicrobianas funcionales que eviten la llegada de la era “post-antibiótica”.

Conclusiones

10. Conclusiones

1. La mayoría de muestras subgingivales estudiadas en este trabajo presentaron aislados resistentes a tres de las clases de antibióticos más utilizadas en el tratamiento periodontal.
2. La resistencia a TET está muy extendida en el biofilm subgingival, tanto en pacientes con periodontitis como en sujetos sin periodontitis. Sin embargo, la microbiota y la distribución de genes de resistencia fue distinta.
3. Se describe por primera vez la presencia de varios genes *tet* en distintos géneros de bacterias que habitan la región subgingival.
4. Entre los aislados resistentes a TET, se observó una amplia distribución del gen *intTn*, el cual codifica para la integrasa de los transposones Tn916/1545-like. Este hecho sugiere una elevada presencia de transposones conjugativos entre este tipo de microbiota.
5. El ambiente oral es un gran reservorio de genes de resistencia a antibióticos y se confirma la potencialidad de transferir dichos genes al describir por primera vez la presencia del gen *tet(B)* a bacterias grampositivas.
6. Los genes *erm(B)* y *erm(F)*, ampliamente distribuidos en bacterias comensales y periodontopatógenas, confirieron resistencias a altas concentraciones de AZM y ERY.
7. Se encontraron aislados resistentes a β -lactámicos en un alto porcentaje de las muestras tomadas. Sin embargo, la mayoría de éstos no presentaron genes codificantes para β -lactamasas.
8. El fenómeno de multirresistencia a distintas clases de antibióticos se observó en gran parte de los aislados, independientemente del antibiótico utilizado para su selección inicial.
9. La comparación de nuestros resultados con la literatura, sugiere que el consumo desigual de antibióticos, en distintas regiones geográficas, podría definir la microbiota subgingival.

Bibliografía

11. Bibliografía

1. Manna, A. *et al.*. Supragingival plaque microbial analysis in reflection to caries experience. *BMC Oral Health* **13**, 5 (2013).
2. Zaura, E. *et al.*. Defining the healthy 'core microbiome' of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* **9**, 259 (2009).
3. Keijser, B. J. F. J. F. *et al.* Pyrosequencing analysis of the Oral Microflora of healthy adults. *J. Dent. Res.* **87**, 1016–1020 (2008).
4. Kolenbrander, P. E. *et al.*. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 471–480 (2010).
5. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol. 2000* **28**, 12–55 (2002).
6. Hannig, M. & Joiner, A. *The Structure, Function and Properties of the Acquired Pellicle*, en *The Teeth and Their Environment*, páginas 29–64. Karger, (2005).
7. Zijng, V. *et al.* Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One* **5**, e9321 (2010).
8. Kolenbrander, P. E. & London, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* **175**, 3247–3252 (1993).
9. Kolenbrander, P. E. *et al.* Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol. 2000* **42**, 47–79 (2006).
10. Nyvad, B. & Mogens, K. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand. J. Dent. Res.* **95**, 369–380 (1987).
11. Kolenbrander, P. E. *et al.* Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect. Immun.* **57**, 3194–203 (1989).
12. Mark Welch, J. L. *et al.* Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E791–E800 (2016).
13. Socransky, S. S. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**, 134–144 (1998).
14. Jakubovics, N. S. & Kolenbrander, P. E. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral. Dis.* **16**, 729–739 (2010).
15. Flemming, H.C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010).
16. Diaz, P. I. *et al.* Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2837–2848 (2006).
17. Haffajee, A. D. *et al.* Factors affecting human supragingival biofilm composition. I. Plaque mass. *J. Periodontal Res.* **44**, 511–519 (2009).

18. Haffajee, A. D. *et al.* Factors affecting human supragingival biofilm composition. II. Tooth position. *J. Periodontal Res.* **44**, 520–528 (2009).
19. Kaplan, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* **89**, 205–218 (2010).
20. Wilson, S. *et al.* Statistical Quantification of Detachment Rates and Size Distributions of Cell Clumps from Wild-Type (PAO1) and Cell Signaling Mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5847–5852 (2004).
21. Stoodley, P. *et al.* Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5608–5613 (2001).
22. Karatan, E. & Watnick, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 310–347 (2009).
23. Izano, E. A. *et al.* Detachment and Killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Biofilms by Dispersin B and SDS. *J. Dent. Res.* **86**, 618–622 (2007).
24. Pecharki, D. *et al.* Role of hyaluronidase in *Streptococcus intermedius* biofilm. *Microbiology* **154**, 932–938 (2008).
25. Lee, S. F. *et al.* Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect. Immun.* **64**, 1035–1038 (1996).
26. Marsh, P. D. & Zaura, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J. Clin. Periodontol.* **44**, S12–S22 (2017).
27. Jakubovics, N. S. Saliva as the Sole Nutritional Source in the Development of Multispecies Communities in Dental Plaque. *Microbiol. Spectr.* **3**, 263–277 (2015).
28. Mazumdar, V. *et al.* Metabolic Proximity in the Order of Colonization of a Microbial Community. *PLoS One* **8**, e77617 (2013).
29. Hall-Stoodley, L. *et al.* Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004).
30. Lawrence, J. R. *et al.* Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **173**, 6558–6567 (1991).
31. de Beer, D. *et al.* Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1131–1138 (1994).
32. Zaura-Arite, E. *et al.* Confocal Microscopy Study of Undisturbed and Chlorhexidine-treated Dental Biofilm. *J. Dent. Res.* **80**, 1436–1440 (2001).
33. Venkatesan, N. *et al.* Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* **10**, 1743–1750 (2015).
34. Valen, H. & Scheie, A. A. Biofilms and their properties. *Eur. J. Oral Sci.* **126 Suppl**, 13–18 (2018).
35. Stoodley, P. *et al.* Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 361–367 (2002).

36. Klapper, I. *et al.* Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 289–296 (2002).
37. Towler, B. W. *et al.* Properties of a Mixed Culture Biofilm from Rheometer Creep Analysis. *Biofouling* **19**, 279–285 (2003).
38. Mah, T. F. & O'Toole, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**, 34–39 (2001).
39. Costerton, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* **284**, 1318–1322 (1999).
40. Anderl, J. N. *et al.* Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1251–1256 (2003).
41. Walters, M. C., *et al.* Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 317–323 (2003).
42. Roberts, A. P. & Mullany, P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **8**, 1441–1450 (2010).
43. Chang, Y.M. *et al.* Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 8617–8622 (2010).
44. Yamanaka, T. *et al.* Gene expression profile and pathogenicity of biofilm-forming *Prevotella intermedia* strain 17. *BMC Microbiol.* **9**, 11 (2009).
45. Tanzer, J. M. *et al.* The microbiology of primary dental caries in humans. *J. Dent. Educ.* **65**, 1028–1037 (2001).
46. Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol. 2000* **5**, 78–111 (1994).
47. Bowen, W. H. The Stephan Curve revisited. *Odontology* **101**, 2–8 (2013).
48. Emilson, C. G. *et al.* Carbohydrate composition of dental plaque from primates with irradiation caries. *J. Oral Pathol.* **13**, 213–220 (1984).
49. Marsh, P. D. Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. *Adv. Dent. Res.* **8**, 263–271 (1994).
50. Enright, J. J. & Friesell, H. E. Studies of the Cause and Nature of Dental Caries. *J. Am. Dent. Assoc.* **20**, 897–910 (1933).
51. Jenkins, G. N. Theories on the mode of action of fluoride in reducing dental decay. *Proc. Nutr. Soc.* **22**, 97–104 (1963).
52. Mandel, I. D. Relation of Saliva and Plaque to Caries. *J. Dent. Res.* **53**, 246–266 (1974).
53. Xiao, Y. *et al.* Hydroxyapatite Growth Inhibition Effect of Pellicle Statherin Peptides. *J. Dent. Res.* **94**, 1106–1112 (2015).
54. Loesche, W. J. Role of *Streptococcus* in Human Dental Decay. *Microbiol. Rev.* **50**, 353–380 (1986).

55. Kassebaum, N. J. *et al.* Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010. *J. Dent. Res.* **93**, 1045–1053 (2014).
56. Chace, R. & Low, S. B. Survival Characteristics of Periodontally-Involved Teeth: A 40-Year Study. *J. Periodontol.* **64**, 701–705 (1993).
57. McLeod, D. E. *et al.* Tooth loss due to periodontal abscess: a retrospective study. *J. Periodontol.* **68**, 963–966 (1997).
58. Albandar, J. M. & Rams, T. E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol. 2000* **29**, 7–10 (2002).
59. Løe, H., *et al.* Experimental Gingivitis in Man. *J. Periodontol.* **36**, 177–187 (1965).
60. Armitage, G. C. Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontol. 2000* **7**, 39–53 (1995).
61. Axelsson, P. *et al.* Prevention and control of periodontal diseases in developing and industrialized nations. *Periodontol. 2000* **29**, 235–246 (2002).
62. Kornman, K. S. *et al.* The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol. 2000* **14**, 33–53 (1997).
63. Ishikawa, I. *et al.* Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol. 2000* **14**, 79–111 (1997).
64. Albandar, J. M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol. 2000* **29**, 177–206 (2002).
65. Saxén, L. & Nevanlinna, H. R. Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. *Clin. Genet.* **25**, 332–5 (1984).
66. Beaty, T. H. *et al.* Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband. *Am. J. Hum. Genet.* **40**, 443–452 (1987).
67. Long, J. C. *et al.* Early onset periodontitis: A comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. *Genet. Epidemiol.* **4**, 13–24 (1987).
68. Schenkein, H. A. *et al.* Smoking and its effects on early-onset periodontitis. *J. Am. Dent. Assoc.* **126**, 1107–1113 (1995).
69. Armitage, G. C. *et al.* Position Paper: Diagnosis of Periodontal Diseases. *J. Periodontol.* **74**, 1237–1247 (2003).
70. Lang, N. P. *et al.* Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol. 2000* **12**, 44–48 (1996).
71. Greenstein, G. Contemporary Interpretation of Probing Depth Assessments: Diagnostic and Therapeutic Implications. A Literature Review. *J. Periodontol.* **68**, 1194–1205 (1997).
72. Armitage, G. C. Manual periodontal probing in supportive periodontal treatment. *Periodontol. 2000* **12**, 33–39 (1996).
73. Armitage, G. C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann. Periodontol.* **4**, 1–6 (1999).

74. Picolos, D. K. *et al.* Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **32**, 1055–1061 (2005).
75. Caton, J. G. *et al.* A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Periodontol.* **89**, S1–S8 (2018).
76. Haffajee, A. D. *et al.* The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J. Clin. Periodontol.* **19**, 84–91 (1992).
77. Tay, F. *et al.* Evaluation of a non-radioactive DNA probe for detecting *Porphyromonas gingivalis* in subgingival specimens. *Oral Microbiol. Immunol.* **7**, 344–348 (1992).
78. Söder, P. O. *et al.* DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.* **101**, 363–370 (1993).
79. Riviere, G. R. *et al.* Relative Proportions of Pathogen-Related Oral Spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in Supragingival and Subgingival Plaque From Patients With Periodontitis. *J. Periodontol.* **63**, 131–136 (1992).
80. Nisengard, R. J. *et al.* Development of a Rapid Latex Agglutination Test for Periodontal Pathogens. *J. Periodontol.* **63**, 611–617 (1992).
81. Snyder, B. *et al.* Analytical Performance of an Immunologic-Based Periodontal Bacterial Test for Simultaneous Detection and Differentiation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia*. *J. Periodontol.* **67**, 497–505 (1996).
82. Bretz, W. A. *et al.* The use of a rapid enzymatic assay in the field for the detection of infections associated with adult periodontitis. *J. Public Health Dent.* **53**, 235–240 (1993).
83. Hemmings, K. W. *et al.* Detection of neutral protease (Periocheck) and BANA hydrolase (Perioscan) compared with traditional clinical methods of diagnosis and monitoring of chronic inflammatory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **24**, 110–114 (1997).
84. Álvarez, G. *et al.* Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express* **3** (2013).
85. Walker, C. B. *et al.* Antibiotic susceptibility testing of subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.* **10**, 422–432 (1983).
86. Fine, D. H. *et al.* Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Periodontol.* **28**, 697–700 (2001).
87. Dahlén, G. *et al.* The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **19**, 802–809 (1992).
88. Katsanoulas, T. *et al.* The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival flora in periodontal pockets. *J. Clin. Periodontol.* **19**, 760–765 (1992).

89. McNabb, H. *et al.* Supragingival cleaning 3 times a week. The microbiological effects in moderately deep pockets. *J. Clin. Periodontol.* **19**, 348–356 (1992).
90. Glossary of Periodontal Terms. <https://members.perio.org/libraries/glossary>.
91. Deas, D. E. *et al.* Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol. 2000* **71**, 128–139 (2016).
92. American Academy of Periodontology. Comprehensive Periodontal Therapy: A Statement by the American Academy of Periodontology. *J. Periodontol.* **82**, 943–949 (2011).
93. Hung, H.-C. & Douglass, C. W. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J. Clin. Periodontol.* **29**, 975–986 (2002).
94. Herrera, D. *et al.* Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J. Clin. Periodontol.* **35**, 45–66 (2008).
95. Herrera, D. *et al.* A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* **29**, 136–159 (2002).
96. Jepsen, S. *et al.* Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontol. 2000* **55**, 167–188 (2011).
97. Walker, C. & Karpinia, K. Rationale for Use of Antibiotics in Periodontics. *J. Periodontol.* **73**, 1188–1196 (2002).
98. Jepsen, K. & Jepsen, S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol. 2000* **71**, 82–112 (2016).
99. Thaker, M. *et al.* The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 419–431 (2010).
100. Nelson, M. L. & Levy, S. B. The history of the tetracyclines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1241**, 17–32 (2011).
101. King, E. Q. *et al.* Clinical observations on the use of Terramycin hydrochloride. *J. Am. Med. Assoc.* **143**, 1–4 (1950).
102. Stephens, C. R. *et al.* Terramycin. VIII. Structure Of Aureomycin And Terramycin. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 4976–4977 (1952).
103. Conover, L. H. *et al.* J. Terramycin. XI. Tetracycline. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4622–4623 (1953).
104. Stephens, C. R. *et al.* 6-Deoxytetracyclines. IV. 1,2 Preparation, C-6 Stereochemistry, and Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2643–2652 (1963).
105. Blackwood, R. K. *et al.* 6-Methylenetetracyclines. 1 I. A New Class Of Tetracycline Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 2773–2775 (1961).

106. McCormick, J. R. D. *et al.* A New Family Of Antibiotics: The Demethyltetracyclines. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4561–4563 (1957).
107. Church, R. F. R. *et al.* Synthesis of 7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline (minocycline) via 9-nitro-6-demethyl-6-deoxytetracycline. *J. Org. Chem.* **36**, 723–725 (1971).
108. Sum, P. E. & Petersen, P. Synthesis and structure-activity relationship of novel glycylicycline derivatives leading to the discovery of GAR-936. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1459–1462 (1999).
109. Draper, M. P. *et al.* Mechanism of action of the novel aminomethylcycline antibiotic omadacycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 1279–1283 (2014).
110. Sutcliffe, J. A. *et al.* Antibacterial activity of eravacycline (TP-434), a novel fluorocycline, against hospital and community pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5548–5558 (2013).
111. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001).
112. Garner, S. E. *et al.* Minocycline for acne vulgaris: efficacy and safety. *Cochrane Database Syst. Rev.* **8** (2012).
113. Chopra, I. *et al.* Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**, 245–77 (1992).
114. Fluit, A. C. *et al.* Presence of Tetracycline Resistance Determinants and Susceptibility to Tigecycline and Minocycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1636–1638 (2005).
115. Abdallah, M. *et al.* Activity of Eravacycline against Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*, Including Multidrug-Resistant Isolates, from New York City. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 1802–1805 (2015).
116. Snyderman, D. R. *et al.* Evaluation of the *In Vitro* Activity of Eravacycline against a Broad Spectrum of Recent Clinical Anaerobic Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
117. Morrissey, I. *et al.* Assessment of eravacycline against 3,467 recent gram-positive bacteria, including multidrug-resistant isolates collected from 2013-2014, en Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother/Internat Cong Chemother Infect Abstract C-563 (2015).
118. Morrissey, I. *et al.* Assessment of Eravacycline against a recent global collection of 4,462 Enterobacteriaceae clinical isolates (2013-2014), en Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother/Internat Cong Chemother Infect Abstract C-095 (2015).
119. Morrissey, I. *et al.* Assessment of eravacycline against non-germinating gram-negative clinical isolates isolated in 2013-2014, en Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother/Internat Cong Chemother Infect Abstract C-095 (2015).
120. Brodersen, D. E. *et al.* The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. *Cell* **103**, 1143–1154 (2000).

121. Schnappinger, D. & Hillen, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* **165**, 359–369 (1996).
122. Nguyen, F. *et al.* Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.* **395**, a025387 (2014).
123. Schedlbauer, A. *et al.* Structural Characterization of an Alternative Mode of Tigecycline Binding to the Bacterial Ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2849–2854 (2015).
124. Stokstad, E. L. R. & Jukes, T. H. The multiple nature of the animal protein factor. *J. Biol. Chem.* **180**, 647–654 (1949).
125. Emborg, H. *et al.* The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prev. Vet. Med.* **50**, 53–70 (2001).
126. Bojesen, A. M. *et al.* The rarely reported *tet(31)* tetracycline resistance determinant is common in *Gallibacterium anatis*. *Vet. Microbiol.* **149**, 497–499 (2011).
127. Aarestrup, F. M. *et al.* Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. *Am. J. Vet. Res.* **71**, 726–733 (2010).
128. Smilack, J. D. The tetracyclines. *Mayo Clin. Proc.* **74**, 727–729 (1999).
129. van der Hulst, R. W. *et al.* Treatment of *Helicobacter pylori* infection: a review of the world literature. *Helicobacter* **1**, 6–19 (1996).
130. MacGregor, R. R. & Graziani, A. L. Oral administration of antibiotics: a rational alternative to the parenteral route. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **24**, 457–467 (1997).
131. Pascale, D. *et al.* Concentration of doxycycline in human gingival fluid. *J. Clin. Periodontol.* **13**, 841–844 (1986).
132. Larsen, T. Occurrence of doxycycline resistant bacteria in the oral cavity after local administration of doxycycline in patients with periodontal disease. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**, 89–95 (1991).
133. Vandekerckhove, B. N. *et al.* The use of locally delivered minocycline in the treatment of chronic periodontitis. A review of the literature. *J. Clin. Periodontol.* **25**, 964–979 (1998).
134. Obaidat, R. M. *et al.* Preparation of mucoadhesive oral patches containing tetracycline hydrochloride and carvacrol for treatment of local mouth bacterial infections and candidiasis. *Sci. Pharm.* **79**, 197–212 (2011).
135. Sakellari, D. *et al.* Tetracycline fibers as an adjunct in the treatment of nifedipine-induced gingival enlargement. *J. Periodontol.* **76**, 1034–1039 (2005).
136. Nakao, R. *et al.* Impact of minocycline ointment for periodontal treatment of oral bacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.* **64**, 156–160 (2011).
137. Goodson, J. M. *et al.* Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy: II. Clinical response. *J. Periodontal Res.* **26**, 371–9 (1991).

138. Sadaf, N. *et al.* Evaluation of efficacy of tetracycline fibers in conjunction with scaling and root planing in patients with chronic periodontitis. *J. Indian Soc. Periodontol.* **16**, 392 (2012).
139. Sachdeva, S. & Agarwal, V. Evaluation of commercially available biodegradable tetracycline fiber therapy in chronic periodontitis. *J. Indian Soc. Periodontol.* **15**, 130–134 (2011).
140. Eckles, T. A. *et al.* Intracrevicular application of tetracycline in white petrolatum for the treatment of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **17**, 454–462 (1990).
141. van Steenberghe, D. *et al.* Subgingival minocycline hydrochloride ointment in moderate to severe chronic adult periodontitis: a randomized, double-blind, vehicle-controlled, multicenter study. *J. Periodontol.* **64**, 637–644 (1993).
142. Gallardo, F. *et al.* Efectos de un gel de tetraciclina al 5% sobre los niveles de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*. *Av Periodon. Implant.* **14**, 21–28 (2002).
143. Tamura, N. *et al.* Mechanisms of drug/H⁺ antiport: complete cysteine-scanning mutagenesis and the protein engineering approach. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 570–579 (2003).
144. Testa, R. T. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of the glycylicylines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2270–2277 (1993).
145. Sakaguchi, R. & Shishido, K. Molecular cloning of a tetracycline-resistance determinant from *Bacillus subtilis* chromosomal DNA and its expression in *Escherichia coli* and *B. subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **949**, 49–57 (1988).
146. Gillespie, M. T. *et al.* Detection of an integrated tetracycline resistance plasmid in the chromosome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1723–1728 (1986).
147. Roberts, M. C. <http://faculty.washington.edu/marilynr/>.
148. Connell, S. R. *et al.* Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3675–3681 (2003).
149. Taylor, D. E. & Chau, A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1–5 (1996).
150. Sanchez-Pescador, R. *et al.* Homology of the *TetM* with translational elongation factors: implications for potential modes of *tetM*-conferred tetracycline resistance. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1218 (1988).
151. LeBlanc, D. J. *et al.* Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene *tetO* from *Streptococcus mutans* DL5. *J. Bacteriol.* **170**, 3618–3626 (1988).
152. Levy, S. B. *et al.* Tet Protein Hybrids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3099–3099 (2005).

153. Patterson, A. J. *et al.* Mosaic Tetracycline Resistance Genes Are Widespread in Human and Animal Fecal Samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1115–1118 (2007).
154. Yang, W. *et al.* *TetX* Is a Flavin-dependent Monooxygenase Conferring Resistance to Tetracycline Antibiotics. *J. Biol. Chem.* **279**, 52346–52352 (2004).
155. Moore, I. F. *et al.* Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase *TetX*. *Biochemistry* **44**, 11829–11835 (2005).
156. Bickel, L. *Rise Up to Life*. Sun Books (1972).
157. Kavalier, L. *Mushrooms, Moulds and Miracles: the Strange Realm of Fungi*. George Harrap (1967).
158. Ebbell, B. & Banov, L. *The Papyrus Ebers: the greatest Egyptian medical document*. Levin and Munskgaard (1937.)
159. Sanderson, J.B. Appendix 5 - Further report of researches concerning the intimate pathology of contagion. The origin and distribution of microzymes (bacteria) in water, and the circumstances which determine their existence in the tissue and liquids of the living body. *Q. J. Microsc. Sci.* **11**, 323-352 (1871).
160. Lister, J. XVI.- A contribution to the germ theory of putrefaction and other fermentative changes, and to the natural history of Torulae and Bacteria . *Trans. R. Soc. Edinb.* **27**, 313-344 (1875).
161. Robinson, F. A. *The Chemistry Of Penicillin*. edited by Hans T. Clarke, John R. Johnson and Sir Robert Robinson. Pp. 1042 and Appendix. Princeton University Press, New Jersey (London: Geoffrey Cumberlege) 1949, £9 9s. 0d. *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 634–635 (1949).
162. Bowden, J. P. & P, W. H. The role of corn steep liquor in the production of penicillin. *Arch. Biochem.* **9**, 387–399 (1946).
163. Hillenga, D. J. *et al.* *Penicillium chrysogenum* Takes up the Penicillin G Precursor Phenylacetic Acid by Passive Diffusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2589–2595 (1995).
164. Dougherty, T. J. & Pucci, M.J. *Antibiotic Discovery and Development*. Springer (2012).
165. Brandl, E. *et al.* Studies on the acid stable, orally efficacious phenoxymethylpenicillin (penicillin V). *Wien. Med. Wochenschr.* **103**, 602–607 (1953).
166. Newton, G. G. & Abraham, E. P. Degradation, structure and some derivatives of cephalosporin N. *Biochem. J.* **58**, 103–111 (1954).
167. Nayler, J. H. Semi-synthetic approaches to novel penicillins. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 234–237 (1991).
168. Garrod, L. P. Choice among penicillins and cephalosporins. *Br. Med. J.* **3**, 96–100 (1974).
169. Hamilton-Miller, J. M. T. Chemical Manipulations of the Penicillin Nucleus: A Review. *Chemotherapy* **12**, 73–88 (1967).

170. Slocombe, B. *et al.* BRL 17421, a novel beta-lactam antibiotic, highly resistant to beta-lactamases, giving high and prolonged serum levels in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**, 38–46 (1981).
171. Livermore, D. M. & Tulkens, P. M. Temocillin revived. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 243–245 (2008).
172. Lund, F. & Tybring, L. 6 -amidinopenicillanic acids--a new group of antibiotics. *Nat. New Biol.* **236**, 135–137 (1972).
173. Murray, B. E. & Moellering, R. C. Cephalosporins. *Annu. Rev. Med.* **32**, 559–581 (1981).
174. Page, M. G. P. Extended-spectrum β -lactamases: structure and kinetic mechanism. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 63–74 (2008).
175. Prescott, L. *et al.* *Microbiology*. McGraw-Hill (2007).
176. Tomasz, A. The Mechanism of the Irreversible Antimicrobial Effects of Penicillins: How the Beta-Lactam Antibiotics Kill and Lyse Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**, 113–137 (1979).
177. Campos, J. *et al.* Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales data and reimbursement data. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 698–701 (2007).
178. Watkins, R. & Bonomo, R. *Beta-Lactam Antibiotics*, en *Infectious diseases*, páginas 1203–1216. Elsevier Ltd (2017).
179. British National Formulary. Drugs used in the treatment of infections. (2003).
180. Sollecito, T. P. *et al.* The use of prophylactic antibiotics prior to dental procedures in patients with prosthetic joints. *J. Am. Dent. Assoc.* **146**, 11-16.e8 (2015).
181. van Winkelhoff, A. J. Antibiotics in periodontics: are we getting somewhere? *J. Clin. Periodontol.* **32**, 1094–1095 (2005).
182. Walker, C. & Sedlacek, M. J. An *in vitro* biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol.* **22**, 152–161 (2007).
183. Soares, G. M. S. *et al.* Effects of Azithromycin, Metronidazole, Amoxicillin, and Metronidazole plus Amoxicillin on an *In Vitro* Polymicrobial Subgingival Biofilm Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2791–2798 (2015).
184. Purucker, P. *et al.* Local versus systemic adjunctive antibiotic therapy in 28 patients with generalized aggressive periodontitis. *J. Periodontol.* **72**, 1241–1245 (2001).
185. Guerrero, A. *et al.* Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* **41**, 1080–1089 (2014).
186. Flemmig, T. F. *et al.* Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Periodontol.* **25**, 380–387 (1998).
187. Ford, P. *et al.* Prescribing patterns of dental practitioners in Australia from 2001 to 2012. *Antimicrobials. Aust. Dent. J.* **62**, 52–57 (2017).
188. Cercenado, E. *et al.* Characterization of clinical isolates of beta-lactamase-negative, highly ampicillin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2420–2422 (1996).
189. Ono, S. *et al.* Mechanisms of Resistance to Imipenem and Ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2954–2958 (2005).
190. Rossolini, G. M. *et al.* Epidemiology of infections caused by multiresistant gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. *New Microbiol.* **30**, 332–339 (2007).
191. Richmond, M. H. & Sykes, R. B. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* **9**, 31–88 (1973).
192. Ambler, R. P. The Structure of β -Lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **289**, 321–331 (1980).
193. Bush, K. Recent developments in beta-lactamase research and their implications for the future. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 681–690 (1988).
194. Bush, K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 271–276 (1989).
195. Bush, K. *et al.* A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211–1233 (1995).
196. Bradford, P. A. *et al.* Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 563–569 (1997).
197. Jacoby, G. A. *et al.* Role of β -Lactamases and Porins in Resistance to Ertapenem and Other β -Lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3203–3206 (2004).
198. Alonso, R. *et al.* TEM-103/IRT-28 beta-lactamase, a new TEM variant produced by *Escherichia coli* BM4511. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3627–3629 (2002).
199. Queenan, A. M. & Bush, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440–458 (2007).
200. Walther-Rasmussen, J. & Høiby, N. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 373–383 (2006).
201. Roll, D. M. *et al.* Inhibition of metallo- β -lactamases by pyridine monothiocarboxylic acid analogs. *J. Antibiot. (Tokyo)* **63**, 255–257 (2010).
202. Watanabe, M. *et al.* Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 147–151 (1991).

203. Bush, K. & Jacoby, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 969–976 (2010).
204. McGuire, J. M. *et al.* Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiot. Chemother. (Northfield)* **2**, 281–283 (1952).
205. Kirst, H. A. *Introduction to the macrolide antibiotics*, en *Macrolide Antibiotics*, páginas 1–13. Birkhäuser Basel (2002).
206. Nakayama, I. *Macrolides in clinical practice*, en *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*, páginas 261–300. Academic Press (1984).
207. Kirst, H. A. *Antibiotics (macrolides)*, en *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, páginas 169–213. John Wiley & Sons (1992).
208. Kirst, H. A. Semi-synthetic derivatives of 16-membered macrolide antibiotics. *Prog. Med. Chem.* **31**, 265–295 (1994).
209. Rubinstein, E. Spiramycin renaissance. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 572–576 (1998).
210. Carbon, C. Clinical Efficacy and Place of Spiramycin in the Treatment of Acute Respiratory Tract Infections. *Drug Investig.* **6**, 35–42 (1993).
211. Prescott, J. F. & Baggot J. D. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Iowa State University Press (1993).
212. Jelić, D. & Antolović, R. From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials. *Antibiotics* **5**, 29 (2016).
213. Kirst, H. A. Semi-synthetic derivatives of erythromycin. *Prog. Med. Chem.* **30**, 57–88 (1993).
214. Bojarska-Dahlig, H. *et al.* Chemical modifications in the erythromycin group leading to an increase of the antibacterial activity. *Mater. Med. Pol.* **14**, 79–84.
215. Puri, S. K. & Lassman, H. B. Roxithromycin: a pharmacokinetic review of a macrolide. *J. Antimicrob. Chemother.* **20 Suppl B**, 89–100 (1987).
216. Fernandes, P. B. & Hardy, D. J. Comparative *in vitro* potencies of nine new macrolides. *Drugs Exp. Clin. Res.* **14**, 445–451 (1988).
217. Watanabe, Y. *et al.* Chemical modification of erythromycins. IX. Selective methylation at the C-6 hydroxyl group of erythromycin A oxime derivatives and preparation of clarithromycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **46**, 647–660 (1993).
218. Holliday, S. M. & Faulds, D. Miocamycin. *Drugs* **46**, 720–745 (1993).
219. Zhao, X. J. *et al.* An *in vitro* study on the metabolism and possible drug interactions of rokitamycin, a macrolide antibiotic, using human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 776–785 (1999).
220. Sunazuka, T. *et al.* *Chemical Modification of Macrolides*, en *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*, páginas 99–180. Academic Press (2002).
221. Hirsch, R. *et al.* Azithromycin in periodontal treatment: More than an antibiotic. *J. Periodontal Res.* **47**, 137–148 (2012).

222. Hoepelman, I. M. & Schneider, M. M. Azithromycin: the first of the tissue-selective azalides. *Int. J. Antimicrob. Agents* **5**, 145–167 (1995).
223. Foulds, G. *et al.* The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**, 73–82 (1990).
224. Douthwaite, S. & Champney, W. S. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 1–8 (2001).
225. Nissen, P. *et al.* The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920–930 (2000).
226. Tu, D. *et al.* Structures of MLSBK Antibiotics Bound to Mutated Large Ribosomal Subunits Provide a Structural Explanation for Resistance. *Cell* **121**, 257–270 (2005).
227. Segura-Egea, J. J. *et al.* Pattern of antibiotic prescription in the management of endodontic infections amongst Spanish oral surgeons. *Int. Endod. J.* **43**, 342–350 (2010).
228. O'Rourke, V. Azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *Aust. Dent. J.* **62**, 14–22 (2017).
229. Bosnar, M. *et al.* Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2372–2377 (2005).
230. Murphy, B. S. *et al.* Azithromycin alters macrophage phenotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 554–560 (2008).
231. Weisblum, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 577–585 (1995).
232. Roberts, M. C. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* **20**, 261–283 (2002).
233. Roberts, M. C. *et al.* Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2823–2830 (1999).
234. Clancy, J. *et al.* Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **22**, 867–879 (1996).
235. Tait-Kamradt, A. *et al.* *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2251–5 (1997).
236. Nakajima, Y. *Mode of Action and Resistance Mechanisms of Antimicrobial Macrolides*, en *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*, páginas 453–500. Academic Press (2002).
237. Ross, J. I. *et al.* Characterisation and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **24**, 851–862 (1989).

238. Ounissi, H. & Courvalin, P. Nucleotide sequence of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*. *Gene* **35**, 271–278 (1985).
239. Arthur, M. *et al.* Analysis of the nucleotide sequence of the *ereB* gene encoding the erythromycin esterase type II. *Nucleic Acids Res.* **14**, 4987–4999 (1986).
240. O'Hara, K. *et al.* Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1354–1357 (1989).
241. Kim, S. K. *et al.* Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Escherichia coli mphK* gene encoding macrolide-phosphotransferase K. *Mol. Cells* **6**, 153–160 (1996).
242. Noguchi, N. *et al.* Cloning and nucleotide sequence of the *mphB* gene for macrolide 2'-phosphotransferase II in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 197–202 (1996).
243. Villedieu, A. *et al.* Prevalence of Tetracycline Resistance Genes in Oral Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 878–882 (2003).
244. Kirchner, M. *et al.* Antibiotic resistance gene profiling of faecal and oral Anaerobes collected during an antibiotic challenge trial. *Anaerobe* **23**, 20–22 (2013).
245. Chung, W. O. *et al.* Distribution of *erm(F)* and *tet(Q)* genes in 4 oral bacterial species and genotypic variation between resistant and susceptible isolates. *J. Clin. Periodontol.* **29**, 152–158 (2002).
246. Xie, Y. *et al.* Antimicrobial Resistance and Prevalence of Resistance Genes of Obligate Anaerobes Isolated From Periodontal Abscesses. *J. Periodontol.* **85**, 327–334 (2014).
247. Lismond, A. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from vaccinated and non-vaccinated patients with a clinically confirmed diagnosis of community-acquired pneumonia in Belgium. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**, 208–216 (2012).
248. Dupin, C. *et al.* Oral Gram-negative anaerobic bacilli as a reservoir of β -lactam resistance genes facilitating infections with multiresistant bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **45**, 99–105 (2015).
249. Tomas, I. *et al.* *In vitro* activity of telithromycin against *mefA* and *ermB* erythromycin-resistant viridans streptococci isolated from bacteremia of oral origin in Spain. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**, 35–38 (2005).
250. van Winkelhoff, A. J. *et al.* Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J. Clin. Periodontol.* **32**, 893–898 (2005).
251. Ioannidis, I. *et al.* Prevalence of *tetM*, *tetQ*, *nim* and *bla_{TEM}* genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *J. Clin. Periodontol.* **36**, 569–574 (2009).
252. ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial

- resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA J.* **15**, (2017).
253. Collins, J. R. *et al.* Periodontal pathogens and tetracycline resistance genes in subgingival biofilm of periodontally healthy and diseased Dominican adults. *Clin. Oral Investig.* **20**, 349–356 (2016).
254. Syed, S. A. & Loesche, W. J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl. Microbiol.* **24**, 638–644 (1972).
255. Shigematsu, T. *et al.* A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**, 240–247 (2009).
256. Aminov, R. I. *et al.* Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 22–32 (2001).
257. Warburton, P. J. *et al.* Demonstration of *in vivo* transfer of doxycycline resistance mediated by a novel transposon. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 973–980 (2007).
258. Ng, L. K. *et al.* Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes* **15**, 209–215 (2001).
259. Manch-Citron, J. N. *et al.* PCR monitoring for tetracycline resistance genes in subgingival plaque following site-specific periodontal therapy. A preliminary report. *J. Clin. Periodontol.* **27**, 437–446 (2000).
260. Ehrmann, E. *et al.* High prevalence of β -lactam and macrolide resistance genes in human oral Capnocytophaga species. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 381–384 (2014).
261. Kuriyama, T. *et al.* Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol. Immunol.* **22**, 285–288 (2007).
262. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. Periodontal microbial ecology. *Periodontol. 2000* **38**, 135–187 (2005).
263. Card, R. M. *et al.* Application of Microarray and Functional-Based Screening Methods for the Detection of Antimicrobial Resistance Genes in the Microbiomes of Healthy Humans. *PLoS One* **9**, e86428 (2014).
264. Kim, S.-M. *et al.* Characterization of antibiotic resistance determinants in oral biofilms. *J. Microbiol.* **49**, 595–602 (2011).
265. Penas, P. P. *et al.* Analysis of Genetic Lineages and Their Correlation with Virulence Genes in *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates from Root Canal and Systemic Infections. *J. Endod.* **39**, 858–864 (2013).
266. Seville, L. A. *et al.* Distribution of tetracycline and erythromycin resistance genes among human oral and fecal metagenomic DNA. *Microb. Drug Resist.* **15**, 159–166 (2009).
267. Kouidhi, B. *et al.* Molecular investigation of macrolide and Tetracycline resistances in oral bacteria isolated from Tunisian children. *Arch. Oral Biol.* **56**, 127–135 (2011).

268. Moraes, L. C. *et al.* Distribution of Genes Related to Antimicrobial Resistance in Different Oral Environments: A Systematic Review. *J. Endod.* **41**, 434–441 (2015).
269. Perez-Trallero, E. *et al.* Antimicrobial Resistance among Respiratory Pathogens in Spain: Latest Data and Changes over 11 Years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 2953–2959 (2010).
270. Gherardi, G. *et al.* Decline in macrolide resistance rates among *Streptococcus pyogenes* causing pharyngitis in children isolated in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1797–1802 (2015).
271. Okamoto, M. *et al.* Distribution of the tetracycline resistance determinant *tetQ* gene in oral isolates of black-pigmented Anaerobes in Japan. *Oral Microbiol. Immunol.* **16**, 224–228 (2001).
272. Hannan, S. *et al.* Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 345–349 (2010).
273. Boguslawska, J. *et al.* Intra- and Interspecies Conjugal Transfer of Tn916-Like Elements from *Lactococcus lactis* *In Vitro* and *In Vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 6352–6360 (2009).
274. Santoro, F. *et al.* Variation on a theme; an overview of the Tn916/Tn1545 family of mobile genetic elements in the oral and nasopharyngeal streptococci. *Front. Microbiol.* **5** (2014).
275. Roberts, A. P. & Mullany, P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol.* **17**, 251–258 (2009).
276. von Wintersdorff, C. J. H. *et al.* Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
277. Aminov, R. I. & Mackie, R. I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **271**, 147–161 (2007).
278. van Schaik, W. The human gut resistome. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **370**, 20140087 (2015).
279. Boyce, J. M. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Cause of Health Care--Associated Infection. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 795–798 (2008).
280. Landers, T. F. *et al.* A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Rep.* **127**, 4–22 (2012).
281. Levy, S. B. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Found. Symp.* **207**, 1-14 (1997).
282. Ciric, L. *et al.* Tn916-like elements from human, oral, commensal streptococci possess a variety of antibiotic and antiseptic resistance genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**, 360–361 (2012).
283. Li, J. *et al.* Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 1311–1318 (2004).
284. Larsen, J. M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* **151**, 363–374 (2017).

285. Zambon, J. J. *et al.* Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infect. Immun.* **32**, 198–203 (1981).
286. Olsvik, B. *et al.* Tetracycline-resistant micro-organisms recovered from patients with refractory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **22**, 391–396 (1995).
287. Roberts, M. C. & Moncla, B. J. Tetracycline resistance and *TetM* in oral anaerobic bacteria and *Neisseria perflava-N. sicca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1271–1273 (1988).
288. Lacroix, J.-M. & Walker, C. B. Detection and Incidence of the Tetracycline Resistance Determinant *tet(M)* in the Microflora Associated with Adult Periodontitis. *J. Periodontol.* **66**, 102–108 (1995).
289. Villedieu, A. *et al.* Genetic basis of erythromycin resistance in oral bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2298–2301 (2004).
290. Olsvik, B. *et al.* Detection of *tet(M)* and *tet(Q)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**, 87–92 (1995).
291. Diaz-Torres, M. L. *et al.* Determining the antibiotic resistance potential of the indigenous oral microbiota of humans using a metagenomic approach. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**, 257–262 (2006).
292. Warburton, P. *et al.* Characterization of *tet(32)* genes from the oral metagenome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 273–276 (2009).
293. Veloo, A. C. M. M. *et al.* Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40**, 450–454 (2012).
294. Van Winkelhoff, A. J. *et al.* Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis: A comparison between the Netherlands and Spain. *J. Clin. Periodontol.* **27**, 79–86 (2000).
295. Rams, T. E. *et al.* Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. *Clin. Oral Implants Res.* **25**, 82–90 (2014).
296. Rodrigues, R. M. J. *et al.* Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J. Clin. Periodontol.* **31**, 420–427 (2004).
297. Aslam, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* **11**, 1645–1658 (2018).
298. Magnusson, I. & Walker, C. B. Refractory periodontitis or recurrence of disease. *J. Clin. Periodontol.* **23**, 289–292 (1996).
299. Diaz-Torres, M. L. *et al.* Novel Tetracycline Resistance Determinant from the Oral Metagenome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1430–1432 (2003).
300. Slots, J. Low-cost periodontal therapy. *Periodontol.* **2000** **60**, 110–137 (2012).
301. Gilbert, A. Local tetracycline is an effective adjunct in the treatment of chronic periodontitis. *Evid. Based Dent.* **5**, 67–67 (2004).

302. Pavia, M. *et al.* Meta-Analysis of Local Tetracycline in Treating Chronic Periodontitis. *J. Periodontol.* **74**, 916–932 (2003).
303. Jung, D.-Y. *et al.* The clinical effect of locally delivered minocycline in association with flap surgery for the treatment of chronic severe periodontitis: a split-mouth design. *J. Clin. Periodontol.* **39**, 753–759 (2012).
304. Inglesby, T. V *et al.* Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA* **287**, 2236–2252 (2002).
305. Prohl, A. *et al.* Evaluation of antimicrobial treatment in a bovine model of acute Chlamydia psittaci infection: tetracycline versus tetracycline plus rifampicin. *Pathog. Dis.* **73** (2014).
306. Zaenglein, A. L. *et al.* Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* **74**, 945-973 (2016).
307. Carmeli, E. *et al.* Tetracycline therapy for muscle atrophy due to immobilization. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* **9**, 81–88 (2009).
308. National Research Council, *et al.* *The use of drugs in food animals: benefits and risks*. National Academy Press (1999).
309. Abusleme, L. *et al.* The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* **7**, 1016–1025 (2013).
310. Checchi, L. *et al.* Bacteria prevalence in a large Italian population sample: a clinical and microbiological study. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **30**, 199–208.
311. Vieira Colombo, A. P. *et al.* Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb. Pathog.* **94**, 27–34 (2016).
312. Chávez de Paz, L. *et al.* Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **100**, 232–241 (2005).
313. Rams, T. E. *et al.* Antibiotic Susceptibility of Periodontal *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius* Clinical Isolates. *J. Periodontol.* **85**, 1792–1798 (2014).
314. Abiko, Y. *et al.* Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J. Periodontal Res.* **45**, 389–395 (2010).
315. Aas, J. A. *et al.* Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5721–5732 (2005).
316. Zbinden, A. *et al.* The novel species *Streptococcus tigurinus* and its association with oral infection. *Virulence* **6**, 177–182 (2015).
317. Heller, D. *et al.* Molecular Characterization of the Microbial Diversity in the Early, *In Vivo* -Formed, Dental Biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, AEM.03984-15 (2016).

318. Kirst, M. E. *et al.* Dysbiosis and Alterations in Predicted Functions of the Subgingival Microbiome in Chronic Periodontitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 783–793 (2015).
319. García López, E. & Martín-Galiano, A. J. The Versatility of Opportunistic Infections Caused by *Gemella* Isolates Is Supported by the Carriage of Virulence Factors From Multiple Origins. *Front. Microbiol.* **11** (2020).
320. de Aquino, S. G. *et al.* Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune Experimental Arthritis by Inducing a TLR2- and IL-1-Driven Th17 Response. *J. Immunol.* **192**, 4103–4111 (2014).
321. Warburton, P. J. *et al.* *TetAB(46)*, a predicted heterodimeric ABC transporter conferring tetracycline resistance in *Streptococcus australis* isolated from the oral cavity. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 17–22 (2013).
322. Lancaster, H. *et al.* The maintenance in the oral cavity of children of tetracycline-resistant bacteria and the genes encoding such resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 524–531 (2005).
323. Roberts, A. P. *et al.* Transfer of Tn916-Like Elements in Microcosm Dental Plaques. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2943–2946 (2001).
324. Cochetti, I. *et al.* *erm(B)*-Carrying Elements in Tetracycline-Resistant Pneumococci and Correspondence between Tn1545 and Tn6003. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1285–1290 (2008).
325. Roberts, A. P. & Mullany, P. Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 856–871 (2011).
326. Pallecchi, L. *et al.* Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **6**, 725–732 (2008).
327. Mansbridge, J. Skin substitutes to enhance wound healing. *Expert Opin. Investig. Drugs* **7**, 803–809 (1998).
328. Castanheira, M. *et al.* Update on *Acinetobacter* Species: Mechanisms of Antimicrobial Resistance and Contemporary *In Vitro* Activity of Minocycline and Other Treatment Options. *Clin. Infect. Dis.* **59**, S367–S373 (2014).
329. Lancaster, H. *et al.* Prevalence and identification of tetracycline-resistant oral bacteria in children not receiving antibiotic therapy. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**, 99–104 (2003).
330. Mitchell, J. *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol. Oral Microbiol.* **26**, 89–98 (2011).
331. Thurnheer, T. & Belibasakis, G. N. *Streptococcus oralis* maintains homeostasis in oral biofilms by antagonizing the cariogenic pathogen *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.* **33**, 1–6 (2018)
332. Douglas, C. W. I. *et al.* Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.* **39**, 179–182 (1993).
333. Roy, P. *et al.* Balanoposthitis caused by *Streptococcus mitis/oralis*. *Med. J. Armed Forces India* **72**, 407–409 (2016).

334. Shelburne, S. A. *et al.* *Streptococcus mitis* Strains Causing Severe Clinical Disease in Cancer Patients. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 762–771 (2014).
335. Thiagarajan, S. *et al.* *Streptococcus oralis* cerebral abscess following monkey bite in a 2-month-old infant. *Paediatr. Int. Child Health* **36**, 160–162 (2016).
336. Chung, J. K. & Lee, S. J. *Streptococcus mitis/oralis* endophthalmitis management without phakic intraocular lens removal in patient with iris-fixated phakic intraocular lens implantation. *BMC Ophthalmol.* **14**, 92 (2014).
337. Chander, Y. *et al.* Identification of the *tet(B)* resistance gene in *Streptococcus suis*. *Vet. J.* **189**, 359–360 (2011).
338. Cvitkovitch, D. G. Genetic competence and transformation in oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **12**, 217–243 (2001).
339. Hillen, W. & Schollmeier, K. Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. *Nucleic Acids Res.* **11**, 525–39 (1983).
340. Guay, G. G. *et al.* Mutations in the *tetA(B)* gene that cause a change in substrate specificity of the tetracycline efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 857–60 (1994).
341. Levy, S. B. *et al.* Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1523–4 (1999).
342. Hillen, W. & Berens, C. Mechanisms Underlying Expression of Tn10 Encoded Tetracycline Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 345–369 (1994).
343. Saenger, W. *et al.* The Tetracycline Repressor-A Paradigm for a Biological Switch. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 2042–2052 (2000).
344. Feres, M. *et al.* Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol. 2000* **67**, 131–186 (2015).
345. Nilius, A. M. *et al.* Comparative *in vitro* activity of ABT-773, a novel antibacterial ketolide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2163–2168 (2001).
346. Citron, D. M. & Appleman, M. D. Comparative *in vitro* activities of ABT-773 against 362 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 345–348 (2001).
347. Muniz, F. W. M. G. *et al.* Azithromycin: A new concept in adjuvant treatment of periodontitis. *Eur. J. Pharmacol.* **705**, 135–139 (2013).
348. Renatus, A. Clinical Efficacy of Azithromycin as an Adjunctive Therapy to Non-Surgical Periodontal Treatment of Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Diagn. Res.* **10** (2016)
349. Luna, V. A. *et al.* Distribution of *mef(A)* in gram-positive bacteria from healthy Portuguese children. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2513–2517 (2002).
350. Seyama, S. *et al.* Emergence and molecular characterization of *Haemophilus influenzae* harbouring *mef(A)*. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, dkw501 (2016).

351. Atkinson, C. T. *et al.* Expression of acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 3298–3301 (2017).
352. Xing, L. *et al.* *ErmF* and *ereD* are responsible for erythromycin resistance in *Riemerella anatipestifer*. *PLoS One* **10**, e0131078 (2015).
353. Sakai, Y. *et al.* *Prevotella nigrescens* in children. *J. Clin. Periodontol.* **29**, 929–934 (2002).
354. Scornec, H. *et al.* Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2722–2728 (2017).
355. Segura-Egea, J. J. *et al.* Worldwide pattern of antibiotic prescription in endodontic infections. *Int. Dent. J.* **67**, 197–205 (2017).
356. O’Sullivan, M. V. N. *et al.* Influence of Disk Separation Distance on Accuracy of the Disk Approximation Test for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4072–4076 (2006).
357. Chung, W. O. *et al.* Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 5–14 (1999).
358. Roberts, M. C. Location of the Various Genes Table. <http://faculty.washington.edu/marilynr> (2017).
359. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (27th ed.)*. Clinical and Laboratory Standards Institute (2017).
360. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints (2018).
361. Lai, P.-C. *et al.* Azithromycin Concentrations in Blood and Gingival Crevicular Fluid After Systemic Administration. *J. Periodontol.* **82**, 1582–1586 (2011).
362. Jain, N. *et al.* Effect of Gingivitis on Azithromycin Concentrations in Gingival Crevicular Fluid. *J. Periodontol.* **83**, 1122–1128 (2012).
363. Doyle, C. J. *et al.* Azithromycin suppresses *P. gingivalis* LPS-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine production by human gingival fibroblasts *in vitro*. *Clin. Oral Investig.* **19**, 221–227 (2015).
364. Kaplan, W. *et al.* Priority medicines for Europe and the world 2013 update. http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/MasterDocJune28_FINAL_Web.pdf (2013).
365. Bronzwaer, S. *et al.* The European Community Strategy Against Antimicrobial Resistance. *Euro Surveill.* **9**, 30–34 (2004).
366. Klein, E. Y. *et al.* Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E3463–E3470 (2018).

367. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (2014).
368. Sherrard, L. J. *et al.* Antibiotic resistance in *Prevotella* species isolated from patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2369–2374 (2013).
369. Ulger Toprak, N. *et al.* A multicenter survey of antimicrobial susceptibility of *Prevotella* species as determined by Etest methodology. *Anaerobe* **52**, 9–15 (2018).
370. Aracil, B. High prevalence of erythromycin-resistant and clindamycin-susceptible (M phenotype) viridans group streptococci from pharyngeal samples: a reservoir of *mef* genes in commensal bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 592–594 (2001).
371. Meyle, J. & Chapple, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol. 2000* **69**, 7–17 (2015).
372. Matesanz-Pérez, P. *et al.* A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **40**, 227–241 (2013).
373. Rabelo, C. C. *et al.* Systemic antibiotics in the treatment of aggressive periodontitis. A systematic review and a Bayesian Network meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* **42**, 647–657 (2015).
374. Pretzl, B. *et al.* Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy—a consensus report. *Clin. Oral Investig.* **23**, 3073–3085 (2019).
375. Handal, T. *et al.* beta-Lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**, 303–308 (2004).
376. Jacoby, G. A. AmpC β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 161–182 (2009).
377. Perez, F. *et al.* The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**, 459–469 (2007).
378. Danziger, L. H. & Pendland, S. L. Bacterial resistance to β -lactam antibiotics. *Am. J. Heal. Pharm.* **52**, S3–S8 (1995).
379. Lee, J. H. *et al.* New definitions of extended-spectrum β -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Med. Res. Rev.* **32**, 216–232 (2012).
380. Turner, P. J. Extended-Spectrum β -Lactamases. *Clin. Infect. Dis.* **41**, S273–S275 (2005).
381. Handal, T. *et al.* Chromosome- and plasmid-encoded beta-lactamases in *Capnocytophaga* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3940–3943 (2005).

382. Handal, T. *et al.* Detection and characterization of β -lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 319–324 (2005).
383. Søråas, A. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria are not detected in supragingival plaque samples from human fecal carriers of ESBL-producing Enterobacteriaceae. *J. Oral Microbiol.* **6**, 24026 (2014).
384. Olsen, I. *et al.* Bacterial sex in dental plaque. *J. Oral Microbiol.* **5**, 1 (2013).
385. Monstein, H.-J. *et al.* Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in Enterobacteriaceae. *APMIS* **115**, 1400–1408 (2007).
386. Boyd, D. A. *et al.* Complete Nucleotide Sequence of a 92-Kilobase Plasmid Harboring the CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamase Involved in an Outbreak in Long-Term-Care Facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3758–3764 (2004).
387. Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657–686 (2005).
388. D'Andrea, M. M. *et al.* CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 305–317 (2013).
389. Ready, D. *et al.* Penicillin and amoxicillin resistance in oral *Veillonella* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40**, 188–189 (2012).
390. Nyfors, S. *et al.* Age-related frequency of penicillin resistance of oral *Veillonella*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**, 279–283 (2003).
391. Reig, M. *et al.* Penicillin resistance in *Veillonella*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1210 (1997).
392. Theron, M. M. Penicillin-binding proteins involved in high-level piperacillin resistance in *Veillonella* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 120–122 (2003).
393. Fernández-Canigia, L. *et al.* Detection and genetic characterization of β -lactamases in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from oral cavity infections and peritonsillar abscesses. *Anaerobe* **33**, 8–13 (2015).
394. Rams, T. E. *et al.* Prevalence of β -lactamase-producing bacteria in human periodontitis. *J. Periodontal Res.* **48**, 493–499 (2013).
395. Pancoast, S. J. Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *Med. Clin. North Am.* **72**, 581–612 (1988).
396. Holbrook, W. P. *et al.* A method for the isolation of *Bacteroides melaninogenicus* from the human mouth. *J. Med. Microbiol.* **11**, 203–207 (1978).
397. McCarthy, K. *Pseudomonas aeruginosa*: Evolution of Antimicrobial Resistance and Implications for Therapy. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **36**, 44–55 (2015).

398. Puzari, M. & Chetia, P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 24 (2017).
399. Ready, D. *et al.* Potential Role of *Veillonella* spp. as a Reservoir of Transferable Tetracycline Resistance in the Oral Cavity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2866–2868 (2006).
400. Clewell, D. B. *et al.* Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* **3**, 229–236 (1995).
401. Edwards, R. *et al.* Characterization of β -Lactamases of *Prevotella* species. *Anaerobe* **2**, 217–221 (1996).
402. Kolenbrander, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 413–437 (2000).
403. Roberts, A. P. & Kreth, J. The impact of horizontal gene transfer on the adaptive ability of the human oral microbiome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).
404. Monnet, D. L. Surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe. ECDC (2014).
405. Haenni, M. *et al.* Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiol. Spectr.* **6**, (2018).
406. Chang, C.-Y. *et al.* A Novel Metallo- β -Lactamase Involved in the Ampicillin Resistance of *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49136 Strain. *PLoS One* **11**, e0155905 (2016).
407. Koncan, R. *et al.* Learning from mistakes: Taq polymerase contaminated with β -lactamase sequences results in false emergence of *Streptococcus pneumoniae* containing TEM. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 702–703 (2007).
408. Naito, M. *et al.* Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. *Microbiology* **157**, 2022–2032 (2011).
409. Skippington, E. & Ragan, M. A. Phylogeny rather than ecology or lifestyle biases the construction of *Escherichia coli-Shigella* genetic exchange communities. *Open Biol.* **2**, 120112–120112 (2012).
410. Soucy, S. M. *et al.* Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 472–482 (2015).
411. Andersson, D. I. & Hughes, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 901–911 (2011).
412. De Gelder, L. *et al.* Combining Mathematical Models and Statistical Methods to Understand and Predict the Dynamics of Antibiotic-Sensitive Mutants in a Population of Resistant Bacteria During Experimental Evolution. *Genetics* **168**, 1131–1144 (2004).
413. Cohen, T. *et al.* The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet. Infect. Dis.* **3**, 13–21 (2003).

414. Cochetti, I. *et al.* New Tn916-related elements causing *erm*(B)-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible pneumococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 127–131 (2007).
415. McDougal, L. K. *et al.* Detection of Tn917-like sequences within a Tn916-like conjugative transposon (Tn3872) in erythromycin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2312–8 (1998).
416. Roberts, M. C. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* **28**, 47–62 (2004).

Anexos

12. Anexos

Anexo I. Protocolos para la preparación de reactivos y medios de cultivo y detallado de técnicas de laboratorio no descritas en los capítulos de la Tesis Doctoral.

RTF

K ₂ HPO ₄ (Merck)	0,45 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,45 g
NaCl (Merck)	0,9 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	0,9 g
MgSO ₄ (Merck)	0,18 g
Na ₂ CO ₃ (Merck)	0,4 g
Dithiotreitol (Sigma-Aldrich)	0,2 g
Agua Milli-Q	hasta 1.000 ml

Medio en el cual viajan las muestras subgingivales durante su transporte al laboratorio.

- Disolver todos los ingredientes en agua con agitación magnética.
- Una vez disueltos, esterilizar la solución mediante filtración (Filterware-CA Membrane 1L, Nalgene)
- Alicuotar en tubos roscados de 2 ml.
- Para prerreducir el medio, almacenar los tubos durante 48 horas en la cabina de anaerobiosis.
- Almacenar a 4°C.

Agar sangre

Preparado para AS n°2 (Oxoid)	40 g
Hemina- menadiona	10 ml
Sangre de caballo desfibrinada (Thermo-scientific)	50 ml
Agua Milli-Q	1.000 ml

Medio rico de crecimiento idóneo para gran parte de la microbiota oral

- Mezclar el preparado para AS con el agua Milli-Q y autoclavar la solución a 121°C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar el medio hasta los 50°C y añadir la hemina-menadiona con un filtro de 0.22 µm de poro (Nalgene) y posteriormente la sangre de caballo desfibrinada.

- Mezclar con suavidad la solución y alicuotarla en volúmenes de 25 ml en placas de petri estériles.

Concentraciones de corte los antibióticos testados:

Los antibióticos se preparaban en una dilución con el solvente apropiado y se añadian al agar sangre en fase líquida, previa alicuota del medio en las placas de petri.

- AMX: 8 µg/ml disueltos en agua Milli-Q
- CTX: 2 µg/ml disueltos en agua Milli-Q
- TET: 8 µg/ml disueltos en agua Milli-Q
- KAN: 64 µg/ml disueltos en PBS pH = 8
- ERY: 1 µg/ml disueltos en etanol
- CHL: 8 µg/ml disueltos en etanol
- STR: 128 µg/ml disueltos en agua Milli-Q

Lisozima

Lisozima (Sigma-Aldrich)	20 mg/ml
Tris-Cl pH 8	20 mM
EDTA	2 mM
Tritón (Merck)	1,2%
Agua Milli-Q	hasta 50 ml

Tampón de lisis empleado en las extracciones de DNA.

- Mezclar todos los componentes salvo la lisozima y dejar almacenado a 4°C.
- En el momento de su utilización, pesar la lisozima necesaria y añadir el volumen de la solución anterior que se necesite para conseguir una concentración de 20 mg/ml.

PBS

NaCl (Panreac)	8 g
KCl (Merck)	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ (Panreac)	1,15 g
KH ₂ PO ₄ (Panreac)	0,2 g
Agua Milli-Q	1.000 ml

Tampón salino utilizado como diluyente en los bancos de diluciones.

- Mezclar los ingredientes y comprobar que el pH sea de $7,1 \pm 0,2$.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- Almacenar a 4°C .

BHI-2

BHI (Difco)	37 g
Mucina (Sigma-Aldrich)	2,5 g
Extracto de levadura (Oxoid)	1 g
NaHCO_3 (Merck)	2 g
L-Cisteína (Merck)	0,1 g
Ácido glutámico 10%	25 ml
NaOH 1N	23,5 ml
Hemina-Menadiona	10 ml
Agua Milli-Q	hasta 1.000 ml

Medio de cultivo líquido rico, empleado para el crecimiento de bacterias en suspensión.

- Mezclar los ingredientes secos con 900 ml de agua Milli-Q y autoclavar a 121°C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar y, en campana de flujo, añadir con filtro de $0,22 \mu\text{m}$ de poro (Nalgene) el ácido glutámico y el NaOH .
- Comprovar el pH y corregir si es necesario con más NaOH 1N hasta un pH de $7,5 \pm 0,1$.
- Añadir la hemina-menadiona y rellenar con agua Milli-Q hasta 1000 ml.
- Almacenar a 4°C .

Tampón TAE 50x

Tris-Base (Sigma-Aldrich)	242 g
EDTA 0.5 M pH 8 (Sigma-Aldrich)	100 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	57 ml
Agua Milli-Q	750 ml

Tampón utilizado para la fabricación de geles de electroforesis y para rellenar las cubetas de electroforesis. Se prepara 50x y se utiliza al 1x, mezclando 20 ml de la solución 50x en 980 ml de agua destilada.

- Mezclar los ingredientes y disolver agitando con suavidad la botella.
- Almacenar a temperatura ambiente.

Tampón de carga

Glicerol (30%) (BDH Chemicals)	3 ml
Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)	25 mg
NaOH (Merck)	1 gota
Agua Milli-Q	7 ml

Tampón utilizado para cargar muestras de DNA en geles de electroforesis.

- Mezclar el glicerol, el azul de bromofenol y el agua Milli-Q y añadir una gota de NaOH para conseguir un color azulado.
- Usar 1 μ l de tampón de carga por cada 25 μ l de muestra de DNA.
- Almacenar a temperatura ambiente.

Medio SOC

NaCl (Merck)	0,5 g
Bacto triptona (Difco)	20 g
Extracto de levadura (Oxoid)	5 g
KCl 2.5 M (Hach)	0,5 ml
Glucosa (Panreac)	20 mM
Agua Milli-Q	hasta 1.000 ml

Medio utilizado en el proceso de electroporación. Contiene glucosa que ayuda a proteger las células en un momento en el que se encuentran debilitadas por el arco eléctrico.

- Mezclar todos los ingredientes salvo la glucosa en 900 ml de agua Milli-Q.
- Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar y añadir la glucosa con un filtro de 0,22 μ m de poro (Nalgene).
- Añadir agua Milli-Q hasta 1.000 ml.
- Almacenar a 4°C.

Hemina-menadiona

Hemina (Sigma-Aldrich)	250 mg
NaOH 1N (Merck)	5 ml
Menadiona (Fluka)	50 mg
Etanol 96°C (Panreac)	10 ml
Agua Milli-Q estéril	485 ml

Reactivo necesario para la preparación de otros medios como agar sangre o BHI-2.

- Mezclar la hemina con el NaOH en un tubo hasta su completa disolución.
- En otro tubo, mezclar la menadiona con el etanol.
- Para esterilizar las soluciones, filtrarlas con un filtro de 0.22 μm de poro (Nalgene).
- Añadir el agua Milli-Q estéril y tapar la botella con papel de aluminio para protegerla de la luz.
- Almacenar a 4°C.

Gel de electroforesis

Tampón TAE 1x	ml según tamaño del gel
Agarosa (Conda)	g según porcentaje y tamaño del gel
Bromuro de etidio (Amresco)	0,5 $\mu\text{g/ml}$

Los geles de electroforesis se emplean para la visualización y separación DNA según el tamaño de la secuencia.

- Mezclar en un erlenmeyer la agarosa y el tampón TAE 1x.
- Llevar a ebullición en un microondas y dejar enfriar hasta que sea manipulable sin ocasionar quemaduras, pero vigilando que no se solidifique.
- Mientras se enfría, preparar el molde del gel y el peine, vigilando la profundidad de éste.
- Añadir el bromuro de etidio a la solución templada, mezclar por agitación y verter sobre el molde. Eliminar las burbujas con la punta de una pipeta o con el mismo peine y dejar solidificar.
- Una vez solidificado, desmoldar el gel y retirar el peine con cuidado de no dañar los pocillos y colocarlo en la cubeta de electroforesis para cargar las muestras.
- No se recomienda almacenar los geles una vez fabricados puesto que tienden a deshidratarse fácilmente y se pueden alterar sus propiedades.

- Es imprescindible seguir un protocolo estricto con la manipulación del material que entre en contacto con el bromuro de etidio, al ser éste un agente carcinogénico.

Preparación material RNA

RNase AWAY™ (ThermoFisher Scientific)	cantidad indeterminada
DEPC (Merck)	0,2 ml por cada 100 ml de agua

Tanto el material como los tampones que entran en contacto con muestras de RNA tienen que ser descontaminados de la presencia de RNAsas para evitar su degradación.

- En el caso del material sólido se emplea RNase AWAY™, impregnando un paño de papel con este material y frotando la superficie a descontaminar dentro de una cabina de extracción de gases, dejándolo secar mínimo 1 hora antes de volver a manipular.
- El DEPC (Diethylpyrocarbonate) se añade al agua que se utilizará como disolvente de distintas soluciones. Para ello, añadir 0.2 ml de DEPC por cada 100 ml de agua Milli-Q y mezclar con agitación magnética en una cabina de extracción de gases. Una vez realizada la mezcla, inactivar el DEPC autoclavando el agua 121°C durante 20 minutos.
- Para evitar la ulterior contaminación del material con RNAsas, evitar tocar nada que no haya sido tratado con RNase AWAY™ o con DEPC, y cambiar los guantes siempre que sea necesario, evitando tocar con las manos aquellas zonas del guante que después tocarán el material a utilizar.

Stock de bacterias electrocompetentes

Medio LB	1.000 ml
Cultivo líquido crecido de la bacteria	10 ml
Glicerol 10% (BDH chemicals)	21 ml
Agua Milli-Q estéril	2.000 ml

Inducir la competencia en las células bacterianas permite, mediante electroporación, introducir DNA foráneo en la célula.

- Partir de un cultivo líquido crecido de la cepa a electroporar.
- Pasar el cultivo líquido a un Erlenmeyer con 1.000 ml de medio LB y dejar crecer hasta que llegue a su fase exponencial de crecimiento.

- Con el cultivo ya crecido, enfriarlo a 4°C junto con el resto del material que se utilizará en el procedimiento.
- Centrifugar el cultivo a 9.000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Descartar sobrenadante y resuspender el sedimento con el mismo volumen de agua fría Milli-Q estéril que el del medio descartado.
- Repetir el lavado.
- Resuspender el sedimento en 20 ml de glicerol 10% estéril y frío.
- Centrifugar a 9.000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1 ml de glicerol 10% estéril y frío.
- Alicuotar la suspensión en volúmenes de 50 µl y conservar a -80°C.

Electroporación

Cubeta de electroporación de 2mm (Biorad) 1 cubeta por electroporación

Medio SOC 1 ml

DNA a electroporar hasta 5 µl

Cepa electrocompetente 50 µl

Electroporador (Biorad)

La electroporación permite introducir DNA en células bacterianas electrocompetentes.

- Trabajar en condiciones de frío hasta el momento de la electroporación.
- Colocar en hielo la cubeta, el medio SOC, el DNA y la cepa competente.
- Mezclar la cepa con el DNA e incubar durante 5 minutos.
- Transferir la mezcla a la cubeta de electroporación evitando crear burbujas y realizar la descarga eléctrica en las siguientes condiciones:

Voltaje 2,5 kV/cm²

Capacitancia 25 µF

Resistencia en paralelo 200 Ω

- Tras la descarga, añadir rápidamente el medio SOC a la cubeta y transferir la mezcla a un tubo estéril de 10 ml.
- Incubar a 37°C en agitación durante 1 hora y sembrar las células en los medios selectivos correspondientes.

Creación de un mutante defectivo de *tet(M)*

En el capítulo 4 se diseñó un mutante defectivo para *tet(M)* de *S. oralis* mediante recombinación homóloga. Para su creación se realizó el siguiente protocolo:

- Extracción del gen *erm(B)* con primers que contienen colas con dianas de restricción.
- Amplificación de los extremos 5' y 3' del gen *tet(M)* del aislado 469.4 con dianas para encajar con el gen *erm(B)*.
- Purificación de los amplicones y posterior digestión.
- Inactivación de las enzimas de digestión y ligación mediante ligasa T4.
- Purificación del constructo y electroporación en células electrocompetentes del aislado 469.4.
- Siembra de las células electroporadas en agar sangre con ERY y verificación del evento de recombinación mediante PCR.

Anexo II. Resoluciones del Comité Ético, aprobando la recolección de las muestras subgingivales empleadas en esta Tesis Doctoral.

Universitat Internacional de Catalunya
COMUNICAT INTERN

Dr. José Nart
Investigador Principal/Cap d'Àrea

CEIC

Ref.77/2011

Comitè Ètic d'Investigació Clínica

El Comitè Ètic d'Investigació Clínica en sessió del dia 19 de setembre de 2011 va adoptar, entre d'altres, el següent acord:

S'aprova l'estudi número PER-ECL-2011-06-NF "Prevención de la neoformación de placa supragingival y efectos microbiológicos de un colutorio de clorhexidina al 0,03% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05% y de un colutorio al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%, ambos con moléculas de clorhexidina 100% disponibles, en un modelo experimental en ausencia de cepillado de 4 días" de l'àrea de Periodòncia (Investigador Principal: Dr. José Nart/Investigadora Secundària: Carolina Mor).

Atentament,



Deborah Violant
27 de setembre de 2011

A/c.: Dr. Lluís Giner, Dra. Montse Mercadé, Sra. Leontina Vinaixa, Carolina Mor.



CARTA APROVACIÓ PROJECTE PEL CER

Codi de l'estudi: ODO-2014-01

Versió del protocol: 1.0

Data de la versió: 31/01/14

Títol: "Prevalencia y caracterización de genes de resistencia a antibióticos en bacterias orales"

Sant Cugat del Vallès, 03 de febrer de 2014

Investigador: Alexandre Arredondo Campaña

Títol de l'estudi: "Prevalencia y caracterización de genes de resistencia a antibióticos en bacterias orales"

Benvolgut(da),

Valorat el projecte presentat, el CER de la Universitat Internacional de Catalunya, considera que, des del punt de vista ètic, reuneix els criteris exigits per aquesta institució i, per tant, ha

RESOLT FAVORABLEMENT

emetre aquest CERTIFICAT D'APROVACIÓ per part del Comitè d'Ètica de la Recerca, per que pugui ser presentat a les instàncies que així ho requereixin.

Em permeto recordar-li que si en el procés d'execució es produís algun canvi significatiu en els seus plantejaments, hauria de ser sotmès novament a la revisió i aprovació del CER.

Atentament,

Dr. Josep Argemí
President CER-UIC

Anexo III. Artículos publicados en revistas científicas en el marco de la Tesis Doctoral y los consentimientos de publicación.

JOURNAL OF ORAL MICROBIOLOGY
2019, VOL. 11, 1643204
<https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1643204>



ORIGINAL ARTICLE

OPEN ACCESS

Detection and expression analysis of *tet(B)* in *Streptococcus oralis*

Alexandre Arredondo ^{a,b}, Gerard Álvarez ^a, José Nart^c, Carolina Mor^c, Vanessa Blanc ^a and Rubén León ^a

^aDepartment of Microbiology, Dentaaid Research Center, Cerdanyola del Vallès, Spain; ^bDepartament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ^cDepartment of Periodontology, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Tetracycline resistance can be achieved through *tet* genes, which code for efflux pumps, ribosomal protection proteins and inactivation enzymes. Some of these genes have only been described in either Gram-positive or Gram-negative bacteria. This is the case of *tet(B)*, which codes for an efflux pump and, so far, had only been found in Gram-negative bacteria. In this study, *tet(B)* was detected in two clinical *Streptococcus oralis* strains isolated from the gingival sulci of two subjects. In both cases, the gene was completely sequenced, yielding 100% shared identity and coverage with other previously published sequences of *tet(B)*. Moreover, we studied the expression of *tet(B)* using RT-qPCR in the isolates grown with and without tetracycline, detecting constitutive expression in only one of the isolates, with no signs of expression in the other one.

This is the first time that the presence and expression of the *tet(B)* gene has been confirmed in Gram-positive bacteria, which highlights the potential of the genus *Streptococcus* to become a reservoir and a disseminator of antibiotic resistance genes in an environment so prone to horizontal gene transfer as is the oral biofilm.

ARTICLE HISTORY

Received 21 March 2019
Revised 28 June 2019
Accepted 3 July 2019

KEYWORDS

Tetracycline; antibiotic resistance; *Streptococcus oralis*; *tet(B)*; horizontal gene transfer; gene expression

Since their discovery in the 1940s, tetracyclines have been used for many years to treat a wide spectrum of infections. However, resistance to these antibiotics soon appeared, and only the discovery of new derivatives allowed their continued use until the 1980s, when they were gradually replaced by other antibiotics such as fluoroquinolones [1].

Despite their widespread resistance, some tetracyclines are still useful in some treatments, such as in acne vulgaris, periodontitis and infections caused by multidrug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [2–4]. Resistance can occur through efflux pumps, ribosomal protection or enzymatic inactivation. According to <http://faculty.washington.edu/marilynr/> (last update May 1st, 2019), 60 tetracycline resistance genes have been detected that code for these mechanisms, along with 11 mosaic genes that code for ribosomal protection proteins. Some of these genes, such as *tet(C)* and *tet(32)*, have only been found in Gram-positive bacteria, while others such as *tet(B)* have only been found in Gram-negative bacteria. In a recent study by Chander et al., *tet(B)* was found in *Streptococcus suis* isolated from pigs [5], but a lack of full sequencing of the gene prevented the confirmation of such a finding.

In oral biofilm, streptococci are a great reservoir of tetracycline resistance genes [6–8], and one of the

most common in the oral environment is *S. oralis* [9]. *S. oralis* is a member of the *Streptococcus mitis* group, known to be a commensal bacterium and opportunistic pathogen [10]. *S. oralis* is an early colonizer of the oral biofilm and plays an important role in its establishment and homeostasis [11]. Moreover, it has been described to antagonize bacteria such as *Streptococcus mutans*, thus preventing the development of dysbiotic biofilm [12]. However, it is one of the most isolated bacteria in endocarditis infections [13,14] and it has been found in numerous types of infection sites [15–19].

Transformation among streptococci is a common event, as they exhibit natural competence and easily acquire foreign DNA. Therefore, the transference of antibiotic resistance genes has been largely studied in this genus [20,21]. Bacteria in the oral environment tend to grow by forming a multispecies biofilm, which increases the chances of horizontal gene transfer and the spread of antimicrobial resistance, creating a large reservoir of antibiotic resistance genes that could be transferred to other bacteria, pathogenic or not [22].

In this study we described the presence of *tet(B)* in two *S. oralis* isolates obtained from subgingival samples of healthy volunteers. Furthermore, in order to prove the presence and transcription of the gene in Gram-positive bacteria, the complete sequence of the

CONTACT Rubén León leon@dentaaid.es Department of Microbiology, Dentaaid Research Center, Ronda Can Fatjó 10, Parc Tecnològic del Vallès, Barcelona 08290, Spain

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

gene was obtained, and its expression was evaluated in both isolates.

Materials and methods

Sample collection and culture

Subgingival samples were collected from periodontally healthy volunteers in the dental clinic of the Universitat Internacional de Catalunya (UIC), (Barcelona, Spain), and the research protocol was approved by the Ethics Committee of the UIC (study number: PER-ECL-2011-06-NF). Subjects had not received antibiotics 3 months prior to the study and did not show signs of gingivitis or periodontitis. Sterile paper points were inserted into the gingival sulci of teeth 16, 21, 36 and 41 and kept in place for 20 sec. These paper points were pooled in a vial containing 1.5 ml of sterilized reduced transport fluid (RTF) without EDTA [23] and sent to the laboratory at 4°C for processing within 24 h. Samples were serially diluted and plated on blood agar (Oxoid Nutrient Broth No. 2; Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) containing 5% horse blood, hemin (5 mg/l), menadione (1 mg/ml) and 8 µg/ml of tetracycline (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) to screen for tetracycline resistant bacteria. Incubation was performed at 37°C in anaerobic conditions, and after 72 h, all different colony morphologies were subcultured to obtain pure cultures. For each selected isolate, liquid cultures with and without tetracycline (8 µg/ml) were done using modified brain heart infusion (brain heart infusion broth [37 g/l], yeast extract [1 g/l], L-cysteine [0.1 g/l], sodium bicarbonate [2 g/l], and supplemented with hemin [5 mg/l] and glutamic acid [0.25%]). Cultures grew to an OD₆₀₀ of 0.8–1 (≈ 10⁸ cfu/ml), when DNA and RNA extractions were performed.

Detection of *tet(B)*

DNA was extracted from all the isolates using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, quantified using a Nanodrop 2000 UV-vis spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and visualized in a 0.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

All the isolates were screened for a battery of *tet* genes (data not shown). To detect *tet(B)* the primers tetB-F and tetB-R were used (Table 1) with the following PCR conditions: an initial denaturation of 5 min at 95°C, 30 cycles of 30 sec of denaturation at 95°C, 30 sec of annealing at 56.5°C and 45 sec of extension at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C. The result of the PCR was visualized in a 3% agarose gel stained with ethidium bromide, where a band of 242 bp could indicate the presence of *tet(B)*.

DNA sequencing

tet(B) was found in two isolates, 444.1 and 469.4, from two different subjects. In order to identify each isolate to the species level, the 16S rRNA, *sodA* and *groEL* genes were amplified using the primers 27-F and 1544-R, *sodA*-F and *sodA*-R, and *groEL*-F and *groEL*-R, respectively (Table 1). The PCR products were purified using the E.Z.N.A.[®] Gel extraction Kit (Omega BIO-TEK, Norcross, GA, USA) and sequenced by primer walking at the Genomics and Bioinformatics Service of the Autonomous University of Barcelona (Barcelona, Spain). Primers tetB-Insert-F and tetB-insert-R (Table 1) were used to fully sequence the *tet(B)* gene. These primers amplified the gene 41 bp upstream of the start codon and 72 bp downstream of the stop codon. The 1,319 bp amplicons were obtained by PCR and were purified and sequenced by primer walking as described above. The sequences obtained were analyzed using BLASTn software at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Reference sequences for alignment were obtained from the database on <http://faculty.washington.edu/marilynr/>, specifically the sequences with the accession numbers: J01830, AF223162, V00611, AL513383, AJ277653, AF326777 and AP000342. Additionally, other sequences of *tet(B)* from other species were used to ensure better reliability: CP015434.1, KX458222.1, CP015836.1, NG_048163.1 and LN908249.1. Alignment was performed using the Clustal Omega service at <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

RNA isolation and expression of *tet(B)* gene

RNA was extracted from liquid cultures with and without tetracycline using the High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the instructions provided by the manufacturer. An extra step to remove any remaining DNA was done using the TURBO DNA-free[™] Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). The absence of DNA in the samples was verified by PCR using the sets of primers tetB-RT-F/tetB-RT-R, and 16S-So-F/16S-So-R (Table 1), visualizing the results in a 3% agarose gel. The remaining RNA was quantified in a Qubit 4 Fluorometer using the Qubit RNA XR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA), and its integrity was verified on a 2% agarose gel.

Expression of *tet(B)* was measured by Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR). Reactions were performed with a LightCycler[®] 480 II Instrument using the LightCycler[®] 480 RNA Master Hydrolysis Probes kit (Roche Diagnostics, Mannheim Germany), following the instructions provided by the manufacturer. The sets of primers tetB-RT and 16S-So (Table 1) were used together with probes 45 and

Table 1. List of primers used in this study.

Primers	Sequence 5' – 3'	Product size (bp)	Annealing Temp (°C)	Reference
27-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1,533	57	[37]
1544-R	AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC			
sodA-F	CCI TAY ICI TAY GAY GCI YTI GAR CC	500	37	[38]
sodA-R	ARR TAR TAI GCR TGY TCC CAI ACR TC			
groEL-F	GAH GTN GTI GAA GGI ATG CA	800	52	[39]
groEL-R	ATT TGR CGI AYW GGY TCT TC			
tetB-F	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	242	55	[40]
tetB-R	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG			
tetB-insert-F	ACC AAA GCT TAG TTA TTC TAC CAC TCC CTA TCA GT	1,319	53	This study
tetB-insert-R	CIT CTT CGA ATG CCC TCT TGG GTT ATC AAG			
tetB-RT-F	TTC AAG TGC GCT TTG GAT GC	111	60	This study
tetB-RT-R	CGT IGA GAA GCT GAG GTG GT			
16S-So-F	CGC TCG GGA CCT ACG TAT TA	59	60	This study
16S-So-R	TAC CAG AAA GGG ACG GCT AA			
M1-F	GAT TTT TTA GCA GAA GTA	629	55	This study
M1-NdeI-R	CCG ATA CCA TAT GCC GAT ATT CTA ACC GAA T			
M2-HindIII-F	CCG ATA CAA GCT TAG TGA CCC GCT TCT GCG A	782	55	This study
M2-R	GAC TAT TTG GAC GAC GGG			
ermB-NdeI-F	GCG TTA GCA TAT GTA CGT TAG ATT AAT TCC TAC CAG	887	55	This study
ermB-HindIII-R	CCG ATA CAA GCT TTT ATT TCC CCT TAA ATA			

66 from the Roche Diagnostics' Universal ProbeLibrary for the genes *tet(B)* and 16S rRNA, respectively. The RT-qPCR conditions were as follows: i) 75 ng of RNA were used in each reaction for the synthesis of cDNA, which was performed at 63°C for 3 min; ii) cycling conditions were 95°C for 30 sec, followed by 45 cycles of 15 sec at 95°C, 40 sec at 60°C and 1 sec at 72°C. Data were analyzed using the LightCycler® 480 Software 1.5. The 16S rRNA gene was used as an endogenous control, and the formula $2^{\Delta C_p(tet(B)) / 2^{\Delta C_p(16S\ rRNA)}}$ was used to evaluate differences in the expression of *tet(B)* in the presence and absence of tetracycline.

Construction of *tet(M)* defective mutants

Isolate 469.4 was found to harbor the gene *tet(M)*. Therefore, in order to determine the contribution of *tet(B)* to the tetracycline resistance of this isolate, disruption of the gene *tet(M)* was performed by introducing the gene *erm(B)*, which confers resistance to erythromycin, between the positions 853 and 1,110 of the *tet(M)* gene. To this end, we made a construct consisting of the gene *erm(B)* surrounded by two sequences homologous to *tet(M)*, which we named M1 (the 5' region) and M2 (the 3' region). *erm(B)* was extracted by PCR using the primers *ermB-NdeI-F* and *ermB-HindIII-R* from a *S. oralis* clinical strain resistant to erythromycin pertaining to the Dentaid Research Center (Cerdanyola del Vallès, Spain) strain collection. M1 and M2 sequences were obtained by PCR from the isolate 469.4 using the primers M1-F and M1-NdeI-R for the M1 sequence, and M2-HindIII-F and M2-R for the M2 sequence (Table 1). PCR products were purified using the E.Z.N.A.® Gel extraction Kit and digested with *NdeI* and *HindIII* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA). Digested fragments were ligated using T4 ligase (Roche

Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The construct was then purified using the E.Z.N.A.® Gel extraction Kit and transformed into 469.4 by electroporation using the Gene Pulser Xcell (BioRad, Hercules, CA, USA). Electroporated cells were plated on blood agar plates containing 5 µg/ml of erythromycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated in anaerobic conditions for 24–48 h. The recombination event was confirmed by PCR using primers M1-F and M2-R.

Antibiotic susceptibility testing

Susceptibility to tetracycline was tested in 444.1, 469.4 and 469.4Δ*tet(M)::erm(B)*(Ery^R) using E-test strips (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to manufacturer's instructions. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 was used as a quality control strain.

Results

Species identification and *tet(B)* sequences

From a library of 448 tetracycline resistant isolates (data not shown), two isolates obtained from two different subjects were found to carry the *tet(B)* gene. Sequencing of the 16S rRNA gene revealed that both isolates were *S. oralis* and shared the same sequence, which showed 100% identity with the 16S rRNA sequences from *S. oralis* ATCC 700233, DSMZ 20,066 and CIP 103216. To further corroborate this result, sequences of the genes *sodA* and *groEL* were also aligned to streptococcal sequences, observing the highest homology with *S. oralis* sequences. To ensure the presence of *tet(B)*, full sequencing of the gene and further alignment against reference sequences was performed, showing an identity of 99.99–100% of the *tet(B)* isolated in this study. Sequence J01830 was used as a reference, being

the first published sequence of *tet(B)* [24]. Point mutations were found in all of the sequences used compared to J01830 (Supplementary Figure 1). *tet(B)* sequences of isolates 444.1 and 469.4, as well as sequences AF223162, AF326777, AL513383, CP015836.1, KX458222.1, LN908249.1 and NG_048163.1, presented five point mutations in positions 463, 794, 854, 940 and 1012. Sequence CP015434.1 exhibited an additional point mutation in position 1,140, and sequence AP000342 had four of these point mutations in positions 794, 854, 940 and 1,012. All these mutations resulted in amino acid substitutions with the exception of the mutations in position 1,140 (Table 2 and Supplementary Figure 2).

Sequences obtained in this study were submitted to GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), and the following accession numbers were retrieved: MK611935 and MK611934 for the 16S rRNA gene of 444.1 and 469.4, respectively, and MK611936 and MK611937 for the *tet(B)* gene of 444.1 and 469.4, respectively.

Expression of *tet(B)*

The level of expression of *tet(B)* in isolates 444.1 and 469.4 was determined comparing log-phase liquid cultures with and without tetracycline of each isolate. The exposure to tetracycline did not decrease the growth rate of the bacteria recovered from the culture and yielded similar amounts of RNA.

A transcriptional analysis of the gene *tet(B)* was performed using RT-qPCR. *tet(B)* mRNA was detected in isolate 469.4 but not in isolate 444.1, despite showing very similar levels of 16S rRNA expression (Figure 1). As for isolate 469.4, no differences were observed in the expression of *tet(B)* when applying tetracycline to the medium. The gene expression value, normalized with the 16S rRNA gene, was 0.06 (log₂).

According to previous screening for *tet* genes, isolate 469.4 contained a *tet(M)* gene in addition to *tet(B)*. In order to determine the influence of *tet(B)* on the tetracycline resistance of the isolate 469.4, the mutant 469.4Δ*tet(M)::erm(B)*(Ery^R) was constructed.

Antibiotic susceptibility

Susceptibility to tetracycline was tested in isolates 444.1 and 469.4 using E-test strips, observing a minimum inhibitory concentration (MIC) of 32 μg/ml to tetracycline. In order to assess whether tetracycline resistance was being conferred by the gene *tet(M)* as opposed to *tet(B)*, susceptibility to tetracycline in the mutant strain 469.4Δ*tet(M)::erm(B)*(Ery^R) was also tested, observing a MIC of 32 μg/ml.

Discussion

Resistance to tetracyclines is widespread, and although tetracyclines are still useful in some treatments, only the most recent versions are being used to treat multidrug

Table 2. Positions of nucleotide substitutions in the *tet(B)* sequences used as comparison. Between parentheses, the positions and amino acid substitutions corresponding to each nucleotide substitution. NC: no changes.

Sequences	Nucleotide substitution					1140A>G (NC)
	463A>G (Thr155Ala)	794A>G (Glu265Gly)	854A>T (Asp285Val)	940G>C (Glu314Gln)	1012A>G (Thr338Ala)	
469.4	+	+	+	+	+	+
444.1	+	+	+	+	+	+
AF223162	+	+	+	+	+	+
AF326777	+	+	+	+	+	+
AL513383	+	+	+	+	+	+
CP015836.1	+	+	+	+	+	+
KX458222.1	+	+	+	+	+	+
LN908249.1	+	+	+	+	+	+
NG_048163.1	+	+	+	+	+	+
CP015434.1	+	+	+	+	+	+
AP000342	+	+	+	+	+	+

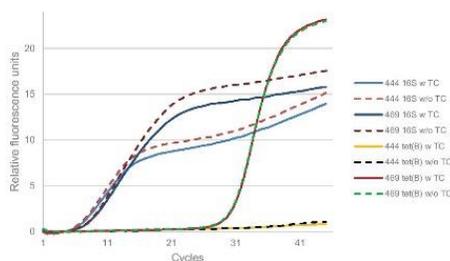


Figure 1. Amplification curves of the 16S rRNA and *tet(B)* genes obtained by RT-qPCR from RNA of 444.1 and 469.4.

resistant bacteria [25]. Nevertheless, a new formulation of minocycline, a second generation tetracycline, has been proven effective against MDR *A. baumannii* infections, allowing an old antibiotic to be used again [4,25]. Unfortunately, resistance to these antibiotics is possible through different mechanisms such as efflux pumps like the one coded by *tet(B)*, which can recognize different tetracyclines as substrates, including minocycline, doxycycline and even glycylicyclines through punctual mutations [26]. *tet(B)* is the most distributed tetracycline resistance gene among Gram-negatives [27] and so far it has not been described in Gram-positives. However, a recent study [5] reported to have found *tet(B)* in *S. suis*, being the first time to describe the presence of this gene in a Gram-positive bacteria. Nonetheless, and although sequencing was performed and 100% identity was obtained, only 54.55% of the gene was covered, raising doubts of whether the gene might or might not be *tet(B)*. According to Levy et al. [28], tetracycline resistance determinants should have $\leq 80\%$ of amino acid identity in order to be considered different genes, which makes it impossible for the previously discussed analysis to determine if the gene studied was *tet(B)*.

In our study we found two isolates of *S. oralis* susceptible of carrying *tet(B)*. In both cases, we performed full sequencing of the gene, resulting in 100% coverage, and compared the sequences to those *tet(B)* sequences previously published, showing some minor differences involving up to six nucleotides in a sequence of 1,206 base pairs, which led to up to five amino acid substitutions in a sequence of 401 amino acids (100% – 98.75% identity). Most of the polymorphisms observed in the *tet(B)* sequences obtained from isolates 444.1 and 469.4 were shared by all the published sequences used in this study with the exception of V00611 and AJ277653, which were identical to the reference sequence J01830 (Table 2). These three sequences were obtained from *Escherichia coli*, although CP015836.1, another *E. coli* sequence used in this study, presented five point mutations compared to J01830, implying that these mutations might have occurred at some point during replication or transference and were maintained in certain strains.

tet(B) expression was studied to understand the functionality of the gene in the two *S. oralis* isolates obtained. It is known that, in the presence of tetracycline, the transcription of tetracycline resistance genes is induced [29,30]. For this reason, cultures were made with and without tetracycline and RNA was extracted to quantify the expression of the gene. *tet(B)* mRNA could only be found in isolate 469.4, meaning that the gene was not being expressed under those conditions in isolate 444.1. Furthermore, expression in 469.4 seemed to be

constitutive, since its transcription did not depend on the addition of tetracycline, as it was observed once normalized with the expression values of the 16S rRNA gene. Both isolates carried *tet(M)* as well, which might have conferred resistance to tetracycline, as opposed to *tet(B)*. We disabled the *tet(M)* gene in the 469.4 isolate through homologous recombination to determine its role in the level of tetracycline resistance, and we found no changes in the level of susceptibility, indicating that *tet(B)* could be responsible for tetracycline resistance in isolate 469.4, although it cannot be ruled out that resistance to tetracycline could be provided by another gene or mechanism.

The presence of *tet(B)* in Gram-positive bacteria is another step in the dissemination of antibiotic resistance genes. Although *tet(B)* seemed to be expressed in only one of the isolates, the presence of this tetracycline resistance gene had never been confirmed in Gram positives. Whether *tet(B)* is being expressed or not, it seems clear that the reservoir for this gene has expanded to the genus *Streptococcus*, an enormous bacterial group, increasing the chances for its dissemination. The transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria has been previously reported [31-33], and the oral environment offers a great opportunity for these transfers to occur. The characteristics of the oral biofilm make it prone to genetic exchange, allowing the bacteria that live in such environment to acquire and share antibiotic resistance genes, among others [22,34-36]. Furthermore, the oral environment is a transit area for many bacteria that might end up in other niches of the human body, thus creating the opportunity for these bacteria to acquire genetic determinants present in the oral microbiome. Given that the *tet(B)* sequence analyzed in this study was identical to other sequences of *tet(B)* observed in Gram-negatives, the functionality of this gene, being transferred to Gram-negatives, would be expected. In this study we confirmed the presence and expression of the gene *tet(B)* in Gram-positive bacteria. However, further studies should be conducted in order to establish the function of the gene *tet(B)* in isolates 444.1 and 469.4. Moreover, a full characterization of the surroundings of the gene and its ability to transfer among other streptococci might help to understand the actual potential of the *tet(B)* gene in Gram-positive bacteria.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Alexandre Arredondo  <http://orcid.org/0000-0003-4459-1300>

Gerard Álvarez  <http://orcid.org/0000-0002-0022-1669>

Vanessa Blanc  <http://orcid.org/0000-0002-2740-6559>

Rubén León  <http://orcid.org/0000-0001-6400-4906>

References

- [1] Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(3):419–431.
- [2] Smilack JD. The tetracyclines. *Mayo Clin Proc.* 1999;74(7):727–729.
- [3] Herrera D, Alonso B, León R, et al. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):45–66.
- [4] Castanheira M, Mendes RE, Jones RN. Update on *Acinetobacter* species: mechanisms of antimicrobial resistance and contemporary *In vitro* activity of minocycline and other treatment options. *Clin Infect Dis.* 2014;59(6 Suppl):367–373.
- [5] Chander Y, Oliveira SR, Goyal SM. Identification of the *tet(B)* resistance gene in *Streptococcus suis*. *Vet J.* 2011;189(3):359–360.
- [6] Villedieu A, Diaz-Torres ML, Hunt N, et al. Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):878–882.
- [7] Lancaster H, Ready D, Mullany P, et al. Prevalence and identification of tetracycline-resistant oral bacteria in children not receiving antibiotic therapy. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;228(1):99–104.
- [8] Pompilio A, Di Bonaventura G, Gherardi G. An overview on *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* complex isolates: identification to the species/subspecies level and antibiotic resistance. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):480.
- [9] Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1311–1318.
- [10] Mitchell J. *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol Oral Microbiol.* 2011;26(2):89–98.
- [11] Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol.* 1993;175(11):3247–3252.
- [12] Thurnheer T, Belibasakis GN. *Streptococcus oralis* maintains homeostasis in oral biofilms by antagonizing the cariogenic pathogen *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol.* 2018;33(3):234–239.
- [13] Douglas CWI, Heath J, Hampton KK, et al. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol.* 1993;39(3):179–182.
- [14] Hosokawa S, Okayama H, Hiasa G, et al. Isolated left atrial infective mural endocarditis. *Intern Med.* 2018;57(7):957–960.
- [15] Roy P, Srinivasan S, Chattoraj A. Balanoposthitis caused by *Streptococcus mitis/oralis*. *Med J Armed Forces India.* 2016;72(4):407–409.
- [16] Shelburne SA, Sahasrabhojane P, Saldana M, et al. *Streptococcus mitis* strains causing severe clinical disease in cancer patients. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(5):762–771.
- [17] Thiagarajan S, Krishnamurthy S, Raghavan R, et al. *Streptococcus oralis* cerebral abscess following monkey bite in a 2-month-old infant. *Paediatr Int Child Health.* 2016;36(2):160–162.
- [18] Chung JK, Lee SJ. *Streptococcus mitis/oralis* endophthalmitis management without phakic intraocular lens removal in patient with iris-fixed phakic intraocular lens implantation. *BMC Ophthalmol.* 2014;14:92.
- [19] Poi BN, Pasupulety Venkata NK, Auckland CR, et al. Neonatal meningitis and maternal sepsis caused by *Streptococcus oralis*. *J Neonatal Perinatal Med.* 2018;11(3):331–334.
- [20] Cvitkovitch DG. Genetic competence and transformation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(3):217–243.
- [21] Santoro F, Iannelli F, Pozzi G. Genomics and genetics of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Spectr.* 2019;7:3.
- [22] Roberts AP, Mullany P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(12):1441–1450.
- [23] Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol.* 1972;24(4):638–644.
- [24] Hillen W, Schollmeier K. Nucleotide sequence of the *Tn10* encoded tetracycline resistance gene. *Nucleic Acids Res.* 1983;11(2):525–539.
- [25] Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, et al. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem.* 2014;39(5):559–575.
- [26] Guay GG, Tuckman M, Rothstein DM. Mutations in the *tetA(B)* gene that cause a change in substrate specificity of the tetracycline efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(4):857–860.
- [27] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):232–260.
- [28] Levy SB, McMurry LM, Barbosa TM, et al. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(6):1523–1524.
- [29] Hillen W, Berens C. Mechanisms underlying expression of *Tn10* encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:345–369.
- [30] Saenger W, Orth P, Kisker C, et al. The tetracycline repressor-A paradigm for a biological switch. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2000;39(12):2042–2052.
- [31] Ojo KK, Tung D, Luis H, et al. Gram-positive *merA* gene in gram-negative oral and urine bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;238(2):411–416.
- [32] Ojo KK, Ulep C, Van Kirk N, et al. The *mef(A)* gene predominates among seven macrolide resistance genes identified in gram-negative strains representing 13 genera, isolated from healthy Portuguese children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3451–3456.
- [33] Kurenbach B, Bohn C, Prabhu J, et al. Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its *tra* region. *Plasmid.* 2003;50(1):86–93.
- [34] Hannan S, Ready D, Jasni AS, et al. of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;59(3):345–349.
- [35] Warburton PJ, Palmer RM, Munson MA, et al. Demonstration of *in vivo* transfer of doxycycline resistance mediated by a novel transposon. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(5):973–980.

- [36] Willi K, Sandmeier H, Kulik EM, et al. Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycescomitans* strains by temperate bacteriophages Aaφ23. *Cell Mol Life Sci.* 1997;53(11–12):904–910.
- [37] Shigematsu T, Hayashi M, Kikuchi I, et al. A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;293(2):240–247.
- [38] Poyart C, Quesne G, Coulon S, et al. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):41–47.
- [39] Glazunova OO, Raoult D, Roux V. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59(9):2317–2322.
- [40] Ng L-K, Martin I, Alfa M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes.* 2001;15(4):209–215.



ORIGINAL ARTICLE

WILEY **ORAL DISEASES**

Azithromycin and erythromycin susceptibility and macrolide resistance genes in *Prevotella* from patients with periodontal disease

Alexandre Arredondo^{1,2} | Vanessa Blanc¹ | Carolina Mor³ | José Nart³ | Rubén León¹¹Department of Microbiology, Dentaid Research Center, Cerdanyola del Vallès, Spain²Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain³Department of Periodontology, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain**Correspondence**Rubén León, Department of Microbiology, Dentaid Research Center, Barcelona, Spain.
Email: leon@dentaid.es**Abstract****Objectives:** To study oral *Prevotella* spp. isolated from patients with chronic periodontitis, to determine their susceptibility to azithromycin and erythromycin and to screen the presence of macrolide resistance genes therein.**Material and Methods:** Isolates with a *Prevotella*-like morphology were obtained from subgingival samples of 52 patients with chronic periodontitis. Each isolate was identified to the species level by sequencing of the 16S rRNA gene. In 100 *Prevotella* spp. isolates, azithromycin and erythromycin susceptibility was determined using the E test method, and the screening of *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, *erm(G)*, *erm(Q)* and *mef(A)* genes was done by PCR.**Results:** *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* were the most identified species (33% each). Minimum inhibitory concentrations (MICs) ranges for both antibiotics were 0.016/0.032 to >256 µg/ml. MIC₅₀ values for azithromycin and erythromycin were 1.5 and 1 µg/ml, respectively, and MIC₉₀ values were >256 µg/ml for both antibiotics. Nineteen per cent of the isolates carried *erm(B)*, and 51% carried *erm(F)*.**Conclusions:** The MIC values found were high compared to previous studies. *erm(F)* was greatly prevalent, and we describe for the first time the *erm(B)* gene in *Prevotella* spp. The presence of either of the genes seems to be associated with a higher degree of resistance to azithromycin and erythromycin.**KEYWORDS**antibiotic, azithromycin, erythromycin, periodontitis, *Prevotella*, resistance

1 | INTRODUCTION

The genus *Prevotella* consists of anaerobic gram-negative bacteria that, being commonly found in the oral microbiota of healthy individuals, have been considered commensal bacteria for a long time (Aas, Paster, Stokes, Olsen, & Dewhirst, 2005; Zaura, Keijsers, Huse, & Crielaard, 2009). However, recent studies have linked the presence or relative increase in some *Prevotella* species to inflammatory

disorders and endogenous infections, for example rheumatoid arthritis, gut dysbiosis, bacterial vaginosis, asthma and periodontitis (Larsen, 2017). In periodontal disease, it has been categorised in the orange complex of Socransky's and Haffajee's pyramid, which refers mainly to gram-negative anaerobic bacteria that are late colonisers of the oral biofilm and could have a role in the development of periodontitis (Socransky & Haffajee, 2002; Zambon, Reynolds, & Slots, 1981). Moreover, not until recently have species such as *Prevotella*

intermedia and *Prevotella nigrescens* been described to present a proinflammatory potential similar to that of *Porphyromonas gingivalis*, one of the major pathogens related to periodontitis (de Aquino et al., 2014).

Scaling and root planing (SRP) is the basis of periodontal treatment. Nevertheless, some cases require the use of adjunctive therapy with antimicrobials such as beta lactams and metronidazole (Slots, 2012). Although the combination of amoxicillin and metronidazole has been largely studied and prescribed (Feres, Figueredo, Soares, & Faveri, 2015), macrolides like azithromycin (AZM) have been proven effective against both aerobic and anaerobic bacteria, regardless of the intrinsic resistance to macrolides of gram-negative bacteria (Citron & Appleman, 2001; Nilius et al., 2001; Xu, Flavin, & Eiznhamer, 2012). This antibiotic has recently been proposed as an effective coadjuvant in the treatment of periodontitis, reducing periodontal probing depth and increasing attachment level (Muniz et al., 2013; O'Rourke, 2017; Renatus, Hermann, Schönfelder, Schwarzenberger, & Jentsch, 2016).

Macrolides like AZM are bacteriostatics that bind to the 23S rRNA, impeding protein synthesis. Antibiotic resistance to AZM has been mainly observed in the form of methylases, efflux pumps and inactivating enzymes (Roberts et al., 1999). Methylases, which are the most widespread and are encoded by *erm* genes, prevent the attachment of the macrolide by adding one or two methyl groups to the ribosomal binding site and confer resistance to macrolides, streptogramins and lincosamides. On the other hand, Mef efflux pumps, like the one coded by *mef(A)*, expel the macrolide in exchange for a proton and confer resistance to a narrower spectrum of antibiotics (Luna et al., 2002; Roberts, 2002). Recently, *mef(A)* and *erm(B)* were linked to high levels of macrolide resistance in gram negatives such as *Haemophilus influenzae* (Atkinson, Kunde, & Tristram, 2017; Seyama et al., 2016), which makes them interesting targets of surveillance when screening for macrolide resistance genes. Additionally, *erm(F)* has been linked to high levels of erythromycin (ERM) and clindamycin resistance in the *Bacteroides* and *Parabacteroides* genera (Kierzkowska et al., 2018; Xing et al., 2015), and it is commonly found in bacteria of the genus *Prevotella* (Chung, Werckenthin, Schwarz, & Roberts, 1999; Sanai et al., 2002).

To our knowledge, there are no reports linking the effects of macrolide resistance genes to AZM or ERM resistance in isolates from the oral environment. These genes can be transferred to other bacteria through conjugative transposons, which are triggered in the presence of antibiotics (Scornec, Bellanger, Guilloteau, GrosHenry, & Merlin, 2017). Given the increased use of AZM in the clinical practice and the environmental pressure exerted as a result of such increase, there is a need to monitor AZM resistance among periodontal bacteria such as *Prevotella* spp., which could also help to determine the effectiveness of this antibiotic in the clinical practice (ECDC, EFSA, & EMA, 2017). Moreover, ERM resistance also has clinical relevance in endodontic infections since it is an antibiotic of choice for patients allergic to β -lactams (Segura-Egea et al., 2017).

The aim of this study was to determine the presence of macrolide resistance genes and the susceptibility to AZM and to ERM of

oral *Prevotella* spp. isolated in Spain. To this end, 100 *Prevotella* spp. isolates obtained from patients with periodontitis were screened for seven macrolide resistance genes, and their susceptibility to AZM and to ERM was analysed.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample collection and culture

Prevotella spp. isolates were picked from the strain collection of Dentaid Research Center (Cerdanyola del Vallès, Spain). Briefly, the isolates were obtained from 52 patients with chronic periodontitis attending the University Dental Clinic of Universitat Internacional de Catalunya (UIC), (Barcelona, Spain), between 2014 and 2015. The clinical conditions of the patients matched the criteria suggested by the American Academy of Periodontology's Periodontal Disease Classification Consensus Report (Armitage, 1999). Briefly, the individuals met the following criteria: at least five teeth and a probing depth of ≥ 5 mm, clinical attachment level ≥ 3 mm and extensive radiographically determined bone loss. These patients did not take antibiotics 3 months prior to sample collection. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the UIC (Study number: ODO-2014-01) and complied with the principles of the Declaration of Helsinki. Samples were obtained by placing sterile paper points in subgingival pockets for 20 s. All the paper points of each patient were pooled in vials containing 1.5 ml of reduced transport fluid without EDTA (Syed & Loesche, 1972) and sent to the laboratory at 4°C. Serial dilutions of each sample were made and plated on blood agar plates (Oxoid Nutrient Broth No. 2; Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) containing 5% horse blood, hemin (5 mg/L) and menadione (1 mg/L), and were incubated in anaerobic conditions (10% H₂, 10% CO₂ and 80% N₂) at 37°C for 48–72 hr. *Prevotella*-like morphologies, for example black-pigmented, smooth and slightly convex colonies of approximately 0.3–2 mm in diameter, were selected, and pure cultures of each isolate were made and stored at –80°C in a 30% glycerol solution. For this study, all the isolates were re-grown on blood agar plates and incubated in anaerobic conditions at 37°C for 48–72 hr.

2.2 | Sequencing of 16S rRNA gene and screening of macrolide resistance genes

DNA extraction was performed using the ATP™ Genomic DNA Mini Kit (ATP Biotech Inc., Taipei City, Taiwan) according to the manufacturer's instructions, and the DNA was quantified using a NanoDrop 2000C UV-vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Isolates were identified to a species level through 16S rRNA gene sequencing. Universal primers forward (27F): 5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' and reverse (1544R): 5' AGAAAGG AGGTGATCCAGCC (Shigematsu et al., 2009) at 0.5 μ M were used to amplify a 1,533-bp-length fragment of the gene. Between 30 and 100 nanograms of DNA, 1X PCR buffer, 1X dNTPs solution, 2.5 mM of MgCl₂ and 1 unit of Taq polymerase (all reagents from Takara,

TABLE 1 Primers and annealing temperatures for the identification of macrolide resistance genes

Primers	Sequence 5'-3'	Product size	Annealing Temp	Reference
erm(B) F erm(B) R	GGT AAA GGG CAT TTA ACG AC CGA TAT TCT CGA TTG ACC CA	494	55	O'Sullivan, Cai, Kong, Zeng, and Gilbert (2006)
erm(F) F erm(F) R	CGG GTC AGC ACT TTA CTA TTG GGA CCT ACC TCA TAG ACA AG	466	50	Chung et al. (1999)
erm(A) F erm(A) R	TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT	640	48	Chung et al. (1999)
erm(C) F erm(C) R	TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT	640	43	Chung et al. (1999)
erm(Q) F erm(Q) R	AAG TTA TTG GGT TAC AGC TA CAC CTC CTA ATT TAA ATC TAC TA	624	53	Roberts (2017)
erm(G) F erm(G) R	GCA AGT TCT GCG CAA TAG CA TAG CGG CAA TAA TCG CAC CA	240	57	This study
mef(A) F mef(A) R	ACC GAT TCT ATC AGC AAA G GGA CCT GCC ATT GGT GTG	942	55	Luna et al. (2002)

Tokyo, Japan) were added to the PCR mix. PCR amplification was carried out using a T3000 Thermocycler (Biomtra, Goettingen, Germany) under these conditions: 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of: 95°C for 60 s, 57°C for 60 s and 72°C for 60 s; and followed by another 10 min at 72°C. The amplified product was subsequently purified using the E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA), sequenced (Macrogen Inc, Amsterdam, the Netherlands), aligned to form a single contig using Clustal Omega software (available at <https://www.ebi.ac.uk/>) and analysed using NCBI's BLAST. Only sequences with ≥99% identity were accepted. One hundred isolates were selected for the study, and from each patient, only one isolate was obtained of each species.

Seven macrolide resistance genes were screened using PCR. Primers and annealing temperatures are listed in Table 1. The PCR conditions for the detection of each macrolide resistance gene are provided in the references of Table 1. For the amplification of *erm(G)*, 30–100 ng of DNA, 1X PCR Buffer, 1X dNTPs solution, 2.5 mM of MgCl₂, 0.5 μM of each primer and 1 unit of Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan) were added to the PCR mix. PCR conditions were as follows: 5 min at 95°C, followed by 30 cycles of: 95°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 30 s; followed by 10 min at 72°C. DNA of the isolates carrying the macrolide resistance genes screened was selected as positive controls. In order to validate these DNA controls, their PCR products were sequenced and annealed with reference sequences published in NCBI's GenBank. Negative controls were done adding water to the mix instead of DNA. PCR products were examined by electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide (0.5 μg/ml) in 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA).

2.3 | Antibiotic susceptibility testing

The *Prevotella* spp. isolates were re-plated on blood agar to conduct an antimicrobial susceptibility test using E test strips (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing a concentration gradient of AZM or ERM. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of both

antimicrobials were measured as instructed by the manufacturer after incubation at 37°C in anaerobic conditions. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 was used as a quality control strain.

2.4 | Statistical analysis

Student's *t* test was used as a paired statistical test for continuous variables to find statistical differences between the MIC values for both antibiotics in each isolate. Prior to the test, MIC values were normalised using the Napierian logarithm. *p* values <0.05 were accepted for statistical significance.

Comparisons of the groups of isolates carrying each gene and their MIC values were done by Mann-Whitney-Wilcoxon test. *p* values <0.0083 were accepted for statistical significance after Bonferroni corrections.

3 | RESULTS

Fifty-two patients (mean age of 49.8 years) were included in this study. Patients showed a mean probing depth of 6.63 ± 1.72 mm, a mean clinical attachment loss of 7.49 ± 2.07 mm and 94.29% of gingival sites with bleeding on probing. One hundred *Prevotella* spp. isolates were obtained averaging 1.92 isolates (range 1–5) per patient, with 28 patients presenting more than one isolate. *P. intermedia* and *P. nigrescens* were the most frequent species (33% each), followed by *Prevotella buccae* and *Prevotella denticola* (Table 2).

Minimum inhibitory concentrations for ERM and AZM ranged from 0.016 to ≥256 μg/ml and from 0.023 to ≥256 μg/ml, respectively, with large differences between isolates from the same species. The isolates carried by 23 of the 28 patients with more than one isolate showed different MICs. Moreover, significant differences were observed when comparing MICs for AZM and ERM within the 100 isolates (*p* = 0.001). All *Prevotella* isolates showed a MIC₅₀ of 1 μg/ml for ERM and a MIC₅₀ of 1.5 μg/ml for AZM. These isolates

TABLE 2 Number of *Prevotella* isolates, MIC ranges and MIC₅₀ and MIC₉₀ for the two tested antimicrobials

Species	N isolates	Erythromycin resistance			Azithromycin resistance		
		MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>P. intermedia</i>	33	0.016 to ≥256	0.38	16	0.032 to ≥256	0.5	≥256
<i>P. nigrescens</i>	33	0.023 to ≥256	0.125	≥256	0.023 to ≥256	1	≥256
<i>P. buccae</i>	14	1 to ≥256	8	≥256	0.75 to ≥256	2	≥256
<i>P. denticola</i>	6	0.25 to ≥256	≥256	≥256	0.75 to ≥256	≥256	≥256
<i>P. disiens</i>	3	0.023 to ≥256	0.094	≥256	0.064 to ≥256	0.38	≥256
<i>P. maculosa</i>	3	2 to ≥256	≥256	≥256	2 to ≥256	≥256	≥256
<i>P. oralis</i>	3	1.5–4	2	4	1–3	2	3
<i>P. melaninogenica</i>	2	1 ≥ 256	0.75	1	0.75–1	0.5	0.75
<i>P. baroniae</i>	1	0.064	ND	ND	0.25	ND	ND
<i>P. oris</i>	1	1	ND	ND	0.75	ND	ND
<i>P. pallens</i>	1	≥256	ND	ND	128	ND	ND
<i>Prevotella</i> spp.	100	0.016 to ≥256	1	≥256	0.023 to ≥256	1.5	≥256

MICs are expressed in µg/ml.

also presented a MIC₉₀ of ≥256 µg/ml for ERM and AZM, except *Prevotella maculosa* and *P. intermedia* for ERM and *Prevotella melaninogenica* and *Prevotella oralis*, which presented lower MIC₅₀ and MIC₉₀ for both antimicrobials. MIC₅₀ and MIC₉₀ of *Prevotella baroniae*, *Prevotella pallens* and *Prevotella oris* could not be determined since only one isolate of each species was obtained (Table 2).

There are no resistance breakpoints available to apply in the macrolide resistance of gram-negative anaerobes (CLSI, 2017; EUCAST, 2018). However, the concentration of AZM in gingival crevicular fluid has been estimated to be 7–8 µg/ml after an oral dose of 500 mg (Jain, Lai, & Walters, 2012; Lai, Ho, Jain, & Walters, 2011). Under this premise, at least 31% of our isolates would be resistant to AZM (MIC ≥12 µg/ml), with *P. denticola*, *P. buccae*, *P. nigrescens* and *P. intermedia* being the species with a higher percentage of resistant isolates: 66.67%, 42.86%, 33.33% and 18.18%, respectively.

erm(B) and *erm(F)* genes were detected by PCR in 58 of the 100 *Prevotella* isolates. *erm(B)* was detected in 19 isolates, while *erm(F)* was found in 51 isolates. Both genes were present in 12 isolates, and this combination was mainly found in *P. intermedia* and *P. nigrescens*, although it was also found in one *P. melaninogenica* isolate (Table 3). Seventeen of the 28 patients with more than one isolate had different genes. None of the other five genes screened were detected.

When the MICs of each *Prevotella* isolate were related to the presence of the studied genes, MIC₅₀ values for ERM increased 15.63-fold in the presence of *erm(B)* and 23.44-fold in the presence of *erm(F)* compared to the absence of any of the screened genes. MIC₅₀ values for AZM were also higher in the presence of macrolide resistance genes, being 5.26-fold higher in the case of *erm(B)* and 31.58-fold higher in the case of *erm(F)*. MIC values were significantly higher for ERM ($p = 0.001$) and AZM ($p = 0.0002$) when comparing the MICs of those isolates carrying *erm(F)* and those isolates without the screened genes. Ten isolates showed high MICs (≥12 µg/ml) for either AZM or ERM and did not carry any of the screened genes.

4 | DISCUSSION

In this study, we analysed the susceptibility to AZM and ERM of 100 clinical oral *Prevotella* spp. isolates obtained from Spanish patients with periodontitis. We identified 11 different species and screened the presence of seven macrolide resistance genes. To our knowledge, ERM and AZM resistance in oral *Prevotella* spp. has not been studied in depth, and only the presence of *erm(F)* has been reported in oral isolates of *P. intermedia* and *P. nigrescens* (Chung, Gabany, Persson, & Roberts, 2002; Sanai et al., 2002). Both antibiotics are widely used in the dental practice. ERM is frequently used in penicillin-allergic patients in endodontic treatment (Segura-Egea et al., 2017), and several clinical trials have been conducted in recent years to evaluate the effectiveness of AZM as an adjuvant to SRP. These trials have demonstrated the validity of using AZM against the major periodontopathogens, and properties such as its quick uptake by fibroblasts, its long half-life, its immunomodulatory and anti-inflammatory effects, its simple dosage regime and limited side effects have raised AZM as an appealing alternative to the treatment with amoxicillin and metronidazole (Doyle et al., 2015; Herrera, Alonso, León, Roldán, & Sanz, 2008; Hirsch, Deng, & Laohachal, 2012; O'Rourke, 2017).

In our study, MIC ranges, MIC₅₀ and MIC₉₀ of ERM were very similar to those of AZM; in fact, they were slightly lower in most of the species studied, which shows that ERM might have similar antibacterial properties to those of AZM for *Prevotella* spp. However, ERM does not have the same anti-inflammatory and immunomodulatory properties, which makes AZM a more attractive option (Hirsch et al., 2012; O'Rourke, 2017).

Monitoring antimicrobial resistance worldwide is essential in order to establish efficient treatments for infections (Kaplan et al., 2013). Researchers face different MICs for the same antimicrobial and bacterial species in different countries. For instance,

TABLE 3 MIC₅₀ and MIC₉₀ values for erythromycin and azithromycin related to the presence of the macrolide resistance genes detected

Species	Number of isolates				Erythromycin resistance					
	erm(B)	erm(F)	erm(B) + erm(F)	No genes detected	MIC ₅₀			MIC ₉₀		
					erm(B)	erm(F)	erm(B) + erm(F)	No genes detected	erm(B)	erm(F)
<i>P. intermedia</i>	1	19	5	8	ND	0.75	0.25	0.032	ND	16
<i>P. nigrescens</i>	1	8	6	18	ND	1	8	0.032	ND	≥256
<i>P. buccae</i>	2	4	0	8	≥256	≥256	ND	2	≥256	≥256
<i>P. denticola</i>	1	5	0	0	ND	≥256	ND	ND	ND	≥256
<i>P. maculosa</i>	0	1	0	2	ND	ND	ND	≥256	ND	ND
<i>P. oralis</i>	0	0	0	3	ND	ND	ND	2	ND	ND
<i>Prevotella</i> spp.	7	39	12	42	1	1.5	1	0.064	≥256	≥256

MICs are expressed in µg/ml. ND indicates those MIC₅₀ or MIC₉₀ that could not be calculated due to a number of isolates inferior to 2.

van Winkelhoff found in 2005 higher MIC values in Spanish oral *Prevotella* than those found in the Netherlands, probably due to a higher prescription and usage of antimicrobials in the former country (van Winkelhoff, Herrera, Oteo, & Sanz, 2005). Spain is one of the European countries with the highest antibiotic consumption (Bronzwaer, Lonroth, & Haigh, 2004; ECDC et al., 2017; Klein et al., 2018), and numerous studies have linked higher usage of antibiotics with higher levels of antibiotic resistance, which might explain the differences between countries (WHO, 2014). These variations in susceptibility could make a difference in whether an antimicrobial dosage leads to a successful treatment or not, and knowledge about antibiotic susceptibility in different geographical areas might help overcome this issue. The MIC ranges obtained of AZM for the isolates of our study were similar to those obtained in previous studies (0.016 to >256 µg/ml) (van Winkelhoff et al., 2005; Veloo et al., 2012), but the MIC₅₀ and MIC₉₀ values were higher. MIC₉₀ exceeded 256 µg/ml in most species, including *P. nigrescens* and *P. intermedia*. MIC₅₀ values were also high; for example, for *P. intermedia*, it was five times greater than previously described (van Winkelhoff et al., 2005; Veloo et al., 2012). Nevertheless, greater levels of resistance to AZM by *Prevotella* isolates obtained from the airways of people with cystic fibrosis have been reported (Sherrard et al., 2013), indicating that some bacteria of the genus *Prevotella* can achieve higher rates of AZM resistance. MIC ranges and both MIC₅₀ and MIC₉₀ values for ERM were also similar to those found in a recent study (Toprak et al., 2018). However, the *Prevotella* spp. isolates obtained by Toprak et al. were not limited to the oral environment as a source, but also included abscesses and wound of patients in hospitals, which might have raised its MIC₅₀ and MIC₉₀ values.

The *erm* genes are methylases that methylate the 23S rRNA, preventing the macrolide from attaching to the ribosome (Roberts, 2002). In *Prevotella* spp., only *erm(A)*, *erm(C)*, *erm(F)* and *erm(G)* have been observed (Roberts, 2017). In the present study, these genes were screened together with *erm(B)* and *mef(A)* genes but only *erm(B)* and *erm(F)* were detected. To our knowledge, this is the first time that *erm(B)* has been detected in bacteria of the genus *Prevotella*.

The presence of *erm(F)* was expected, since it has been observed that this gene is distributed among black-pigmented anaerobes, often integrated into conjugative transposons with *tet(Q)*, a tetracycline resistance gene (Chung et al., 2002; Sanai et al., 2002). Furthermore, *erm(B)* has been largely found in streptococci of the oral environment, especially in conjugative transposons of the Tn916/1545 family (Roberts & Mullany, 2010; Villedieu et al., 2004). The *int* gene codes for the Int protein involved in the transposition of these mobile genetic elements. In this study, four isolates carrying *erm(B)* and 19 isolates carrying *erm(F)* also carried the gene *int* (data not shown). This could be an indication of the presence of transposons in these isolates, but more studies should be conducted to confirm this. The presence of these resistance genes in transferrable elements could grant them the ability to spread within the *Prevotella* genus as well as among other oral bacteria, sustaining a reservoir of antimicrobial resistance genes in the oral environment (Aracil et al., 2001; Villedieu et al., 2003).

Differences were observed when comparing the MIC₅₀ values for AZM and ERM with the presence or absence of macrolide resistance genes. In the case of *erm(B)*, 15.63-fold and 5.26-fold increases in the MIC₅₀ for ERM and AZM, respectively, were observed. However, the number of isolates that carried *erm(B)* alone was too low to draw conclusions. MIC₅₀ values for *erm(F)* also increased, 23.44-fold and 31.58-fold for ERM and AZM, respectively. Additionally, statistically significant higher MIC values for both ERM and AZM were observed in those isolates carrying *erm(F)*. Since *erm(F)* is often detected in black-pigmented anaerobes (Chunget al., 1999; Sanai et al., 2002), a consistent level of resistance when carrying this gene was to be expected. Given the increase in resistance to azithromycin provided by *erm(F)* and the presence of this gene among oral black-pigmented anaerobes, the use of azithromycin as a therapeutic option could be at stake if the dissemination of macrolide resistance genes were to occur.

In this study, a breakpoint of ≥12 µg/ml of AZM was used in order to determine resistance to this antibiotic, given that neither the EUCAST nor the CLSI provide macrolide breakpoints for anaerobic bacteria. Susceptibility to ≥12 µg/ml of AZM among *Prevotella* spp. isolates obtained from patients with periodontitis was high (31%), with higher

		Azithromycin resistance							
		MIC ₅₀				MIC ₉₀			
<i>erm(B)</i> + <i>erm(F)</i>	No genes detected	<i>erm(B)</i>	<i>erm(F)</i>	<i>erm(B)</i> + <i>erm(F)</i>	No genes detected	<i>erm(B)</i>	<i>erm(F)</i>	<i>erm(B)</i> + <i>erm(F)</i>	No genes detected
1	≥256	ND	1.5	1	0.064	ND	≥256	1.5	≥256
≥256	3	ND	2	32	0.094	ND	≥256	≥256	24
ND	≥256	≥256	≥256	ND	1.5	≥256	≥256	ND	≥256
ND	ND	ND	≥256	ND	ND	ND	≥256	ND	ND
ND	≥256	ND	ND	ND	≥256	ND	ND	ND	≥256
ND	4	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	3
≥256	64	1	6	1.5	0.19	≥256	≥256	≥256	48

MIC₅₀ and MIC₉₀ values than previously reported, even in Spain. These values were very similar for both antibiotics, indicating a similar susceptibility of *Prevotella* spp. to ERM and AZM. Of the seven genes screened, *erm(F)* and *erm(B)* were detected, and both seemed to be associated with a higher degree of resistance to ERM and AZM when compared to the isolates in which we could not detect any of the screened genes. Given that there were isolates that did not carry any gene and exhibited high levels of resistance, further studies might prove useful to understand what mechanisms are used by *Prevotella* spp. to overcome macrolides.

Finally, surveillance of antibiotic resistance in oral bacteria should be performed regularly in order to help clinicians to choose the best antibiotic regimen for their patients, since it may seem that resistance to AZM is increasing in *Prevotella* spp., and genes with high capabilities of transferability might be responsible for this.

ACKNOWLEDGEMENT

We express our gratitude to the study participants. Moreover, we are grateful to Mrs Ann Bangle for the English revision of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest in relation to this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Rubén León, Dr. Vanessa Blanc and Mr. Alexandre Arredondo designed the study. Dr. José Nart and Dr. Carolina Mor provided clinical characterization of the patients. Mr. Alex Arredondo carried out the experiments and wrote the manuscript with the corrections and supervision of Dr. Rubén León and Dr. Vanessa Blanc. All authors supervised the final manuscript and agreed on the submission.

ORCID

Alexandre Arredondo  <https://orcid.org/0000-0003-4459-1300>

REFERENCES

- Aas, J. A., Paster, J. B., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>
- Aracil, B., Miñambres, M., Oteo, J., Rorres, C., Gómez-Garcés, J. L., & Alós, J. I. (2001). High prevalence of erythromycin-resistant and clindamycin-susceptible (M phenotype) viridans group streptococci from pharyngeal samples: A reservoir of *mef* genes in commensal bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 592–594. <https://doi.org/10.1093/jac/48.4.592>
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
- Atkinson, C. T., Kunde, D. A., & Tristram, S. G. (2017). Expression of acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 3298–3301. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx290>
- Bronzwaer, S., Lonroth, A., & Haigh, R. (2004). The European community strategy against antimicrobial resistance. *European Surveillance*, 9, 1–3. <https://doi.org/10.2807/esm.09.01.00441-en>
- Chung, W. O., Gabany, J., Persson, G. R., & Roberts, M. C. (2002). Distribution of *erm(F)* and *tet(Q)* genes in 4 oral bacterial species and genotypic variation between resistant and susceptible isolates. *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 152–158. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290210.x>
- Chung, W. O., Werckenthin, C., Schwarz, S., & Roberts, M. C. (1999). Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 5–14. <https://doi.org/10.1093/jac/43.1.5>
- Citron, D. M., & Appelman, M. D. (2001). Comparative in vitro activities of ABT-773 against 362 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 345–348. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.345-348.2001>
- CLSI. (2017). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 27th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- de Aquino, S. G., Abdollahi-Roodsaz, S., Koenders, M. I., van de Loo, F. A. J., Pruijn, G. J. M., Marijnissen, R. J., ... van den Berg, W. B. (2014). Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. *The Journal of Immunology*, 192, 4103–4111. <https://doi.org/10.10049/jimmunol.1301970>
- Doyle, C. J., Fitzsimmons, T. R., Marchant, C., Dharmapatri, A. A. S., S. K., Hirsch, R., & Bartold, P. M. (2015). Azithromycin suppresses

- P. gingivalis* LPS-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine production by human gingival fibroblasts in vitro. *Clinical Oral Investigations*, 19(2), 221–227. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1249-7>
- European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, & European Medicines Agency. (2017). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, 15(7), 30–104. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4872>
- Feres, M., Figueredo, L. C., Soares, G. M. S., & Faveri, M. (2015). Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontology* 2000, 67(1), 131–186. <https://doi.org/10.1111/prd.12075>
- Herrera, D., Alonso, B., León, R., Roldán, S., & Sanz, M. (2008). Antimicrobial therapy in periodontitis: The use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8), 45–66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01260.x>
- Hirsch, R., Deng, H., & Laohachal, M. N. (2012). Azithromycin in periodontal treatment: More than an antibiotic. *Journal of Periodontal Research*, 47, 137–148. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01418.x>
- Jain, N., Lai, P. C., & Walters, J. D. (2012). Effect of gingivitis on azithromycin concentrations in gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontology*, 83(9), 1122–1128. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110558>
- Kaplan, W., Wirtz, V. J., Mantel-Teeuwisse, A., Stolk, P., Duthey, B., & Laing, R. (2013). *Priority medicines for Europe and the world 2013 update*. Retrieved from http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/MasterDocJune28_FINAL_Web.pdf
- Kierzkowska, M., Majewska, A., Szymanek-Majchrzak, K., Sawicko-Grzalak, A., Mlynarczyk, A., & Mlynarczyk, G. (2018). The in vitro effect of clindamycin against *Bacteroides* and *Parabacteroides* isolates in Poland. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 49–52. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.11.001>
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martínez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., ... Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(15), E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712951115>
- Lai, P. C., Ho, W., Jain, N., & Walters, J. D. (2011). Azithromycin concentrations in blood and gingival crevicular fluid after systemic administration. *Journal of Periodontology*, 82(11), 1582–1586. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110012>
- Larsen, J. M. (2017). The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151(4), 363–374. <https://doi.org/10.1111/imm.12760>
- Luna, V. A., Heiken, M., Judge, K., Ulep, C., Van Kirk, N., Luis, H., ... Roberts, M. C. (2002). Distribution of *mef(A)* in gram-positive bacteria from healthy Portuguese children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2513–2517. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2513-2517.2002>
- Muniz, F. W., de Oliveira, C. C., Carvalho, R. S., Moreira, M. M. S. M., de Moraes, M. E. A., & Martins, R. S. (2013). Azithromycin: A new concept in adjuvant treatment of periodontitis. *European Journal of Pharmacology*, 705(1–3), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.044>
- Nilius, A. M., Bui, M. H., Almer, L., Hensey-Rudloff, D., Beyer, J., Ma, Z., ... Flamm, R. K. (2001). Comparative in vitro activity of ABT-773, a novel antibacterial ketolide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(7), 2163–2168. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.2163-2168.2001>
- O'Rourke, V. J. (2017). Azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy: A systematic review. *Australian Dental Journal*, 62(1), 14–22. <https://doi.org/10.1111/adj.12448>
- O'Sullivan, M. V. N., Cai, Y., Kong, F., Zeng, X., & Gilbert, G. L. (2006). Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4072–4076. <https://doi.org/10.1128/JCM.01632-06>
- Renatus, A., Hermann, J., Schönfelder, A., Schwarzenberger, F., & Jentsch, H. (2016). Clinical efficacy of azithromycin as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(7), 1–7. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20176.8115>
- Roberts, A. P., & Mullany, P. (2010). Oral biofilms: A reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(12), 1441–1450. <https://doi.org/10.1586/eri.10.106>
- Roberts, M. C. (2002). Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Molecular Biotechnology*, 20, 261–283. <https://doi.org/10.1385/MB:20:3:261>
- Roberts, M. C. (2017). Location of the various genes table. Retrieved from <http://faculty.washington.edu/marilynr/>
- Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., & Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.12.2823>
- Sanai, Y., Persson, G. R., Starr, J. R., Luis, H. S., Bernardo, M., Leitao, J., & Roberts, M. C. (2002). Presence and antibiotic resistance of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in children. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(10), 929–934. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2002.291008.x>
- Scornec, H., Bellanger, X., Guilloreau, H., Groshenry, G., & Merlin, C. (2017). Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx202>
- Segura-Egea, J. J., Martín-González, J., Jiménez-Sánchez, M. C., Crespo-Gallardo, I., Saúco-Márquez, J. J., & Velasco-Ortega, E. (2017). Worldwide pattern of antibiotic prescription in endodontic infections. *International Dental Journal*, 67(4), 197–205. <https://doi.org/10.1111/idj.12287>
- Seyama, S., Wajima, T., Suzuki, M., Ushio, M., Fujii, T., & Noguchi, N. (2016). Emergence and molecular characterization of *Haemophilus influenzae* harbouring *mef(A)*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6), 948–949. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx114>
- Sherrard, L. J., Graham, K. A., McGrath, S. J., McIlreavy, L., Hatch, J., Muhlebach, M. S., ... Tunney, M. M. (2013). Antibiotic resistance in *Prevotella* species isolated from patients with cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(10), 2369–2374. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt191>
- Shigematsu, T., Hayashi, M., Kikuchi, I., Ueno, S., Masaki, H., & Fuji, T. (2009). A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment. *FEMS Microbiology Letters*, 293(2), 240–247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01536.x>
- Slots, J. (2012). Low-cost periodontal therapy. *Periodontology* 2000, 60(1), 110–137. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00429.x>
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000, 28(1), 12–55. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x>
- Syed, S. A., & Loesche, W. J. (1972). Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Journal of Applied Microbiology*, 24(4), 638–644.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2018). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0*. Retrieved from http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

- Toprak, N. U., Veloo, A. C. M., Urban, E., Wybo, I., Justesen, U. S., Jean-Pierre, H., ... ESGAI (2018). A multicenter survey of antimicrobial susceptibility of *Prevotella* species as determined by Etest methodology. *Anaerobe*, 52, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.005>
- van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Oteo, A., & Sanz, M. (2005). Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(8), 893–898. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00782.x>
- Veloo, A. C. M., Seme, K., Raangs, K. E., Rurenga, P., Singadji, Z., Wekema-Mulder, G., & van Winkelhoff, A. J. (2012). Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(5), 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.07.004>
- Villedieu, A., Diaz-Torres, M. L., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D. A., Wilson, M., & Mullany, P. (2003). Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 878–882. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.878-882.2003>
- Villedieu, A., Diaz-Torres, M. L., Roberts, A. P., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D. A., ... Mullany, P. (2004). Genetic basis of erythromycin resistance in oral bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2298–2301. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2298-2301.2004>
- World Health Organization (2014). *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. Retrieved from <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/>
- Xing, L., Yu, H., Qi, J., Jiang, P., Sun, B., Cui, J., ... Hu, Q. (2015). *ErmF* and *ereD* are responsible for erythromycin resistance in *Riemerella anatipestifer*. *PLoS ONE*, 10(6), e0131078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131078>
- Xu, Z. Q., Flavin, M. T., & Eiznhamer, D. A. (2012). Macrolides and ketolides. In T. J. Dougherty, & M. J. Pucci (Eds.), *Antibiotic discovery and development* (pp. 181–228). New York, NY: Springer US.
- Zambon, J. J., Reynolds, H. S., & Slots, J. (1981). Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infection and Immunity*, 32(1), 198–203.
- Zaura, E., Keijser, B. J., Huse, S. M., & Crielaard, W. (2009). Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiology*, 9, 259. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-259>

How to cite this article: Arredondo A, Blanc V, Mor C, Nart J, León R. Azithromycin and erythromycin susceptibility and macrolide resistance genes in *Prevotella* from patients with periodontal disease. *Oral Dis*. 2019;25:860–867. <https://doi.org/10.1111/odi.13043>



Resistance to β -lactams and distribution of β -lactam resistance genes in subgingival microbiota from Spanish patients with periodontitis

Alexandre Arredondo^{1,2} · Vanessa Blanc¹ · Carolina Mor³ · José Nart³ · Rubén León¹ Received: 20 January 2020 / Accepted: 8 May 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Objectives The aim of this study was to analyze the distribution of β -lactamase genes and the multidrug resistance profiles in β -lactam-resistant subgingival bacteria from patients with periodontitis.

Materials and methods Subgingival samples were obtained from 130 Spanish patients with generalized periodontitis stage III or IV. Samples were grown on agar plates with amoxicillin or cefotaxime and incubated in anaerobic and microaerophilic conditions. Isolates were identified to the species level by the sequencing of their 16S rRNA gene. A screening for the following β -lactamase genes was performed by the polymerase chain reaction (PCR) technique: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-A}, *bla*_{CepA}, *bla*_{CblA}, and *bla*_{ampC}. Additionally, multidrug resistance to tetracycline, chloramphenicol, streptomycin, erythromycin, and kanamycin was assessed, growing the isolates on agar plates with breakpoint concentrations of each antimicrobial.

Results β -lactam-resistant isolates were found in 83% of the patients. Seven hundred and thirty-seven isolates from 35 different genera were obtained, with *Prevotella* and *Streptococcus* being the most identified genera. *bla*_{CTX-A} was the gene most detected, being observed in 24.8% of the isolates, followed by *bla*_{TEM} (12.9%). Most of the isolates (81.3%) were multidrug-resistant.

Conclusions This study shows that β -lactam resistance is widespread among Spanish patients with periodontitis. Furthermore, it suggests that the subgingival commensal microbiota might be a reservoir of multidrug resistance and β -lactamase genes.

Clinical relevance Most of the samples yielded β -lactam-resistant isolates, and 4 different groups of *bla* genes were detected among the isolates. Most of the isolates were also multidrug-resistant. The results show that, although β -lactams may still be effective, their future might be hindered by the presence of β -lactam-resistant bacteria and the presence of transferable *bla* genes.

Keywords Periodontitis · Antibiotic resistance · β -Lactams · Multidrug resistance

Introduction

Periodontitis is a complex infectious disease caused by a dysbiosis of the subgingival biofilm and a disproportionate response of the host's immune system [1]. Supra- and

subgingival debridement along with motivation and oral hygiene instructions are the standard treatment for periodontitis, and antimicrobials can be used as adjunctive therapy if patient's conditions apply [2–4]. The microbial etiology of inflammatory periodontal diseases provides the rationale for the use of antimicrobial medication in periodontal therapy. Antibiotics may be specially indicated for periodontal patients 36 years of age or younger with periodontitis stage II or for patients with attachment or radiographic bone loss at more than two nonadjacent sites [5]. The most used antimicrobials in periodontitis are the β -lactams, particularly amoxicillin (AMX) which can be administered together with metronidazole [2]. It has been described that those bacteria resistant to β -lactams may also be resistant to other antibiotics such as tetracyclines, aminoglycosides, and chloramphenicol [6–8]. The most important resistance mechanism to β -lactam antibiotics are the β -lactamases, enzymes that break the β -lactam ring and inactivate the antimicrobial [9]. Extended spectrum

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00784-020-03333-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rubén León
leon@dentaaid.es

¹ Department of Microbiology, Dentaaid Research Center, Cerdanyola del Vallès, Spain

² Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

³ Department of Periodontology, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

β -lactamases (ESBLs) can hydrolyze a wide array of β -lactams such as penicillins, cephalosporins, and monobactams while inhibited by β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid [8, 10, 11]. ESBLs were first detected in the 1980s in a *Klebsiella pneumoniae* isolate, and now these are found in both enteric and non-enteric microorganisms. More than 230 ESBLs have been described, including TEM-type, SHV-type, CTX-M-type, OXA-type, and KPC-type [11]. In the oral environment, *bla*_{TEM} have been described as the most prevalent ESBLs, although there are only a few studies that have screened for these genes [12–15]. Other β -lactamases found in the oral biofilm include *bla*_{CTXA}, *bla*_{CEPA/CblA}, and *bla*_{ampC}, suggesting that the mouth might be a reservoir for β -lactamase genes. In fact, the oral environment, being a transit place for bacteria entering the digestive tract and harboring more than 700 bacterial species that grow to form a biofilm, offers an excellent opportunity for horizontal gene transfer to occur [16, 17].

Spain is one of the European countries with the highest consumption of antibiotics, which has been suggested to be linked with the increase of antibiotic resistance [18]. Little is known about the distribution of β -lactamase genes in the subgingival microbiota of Spanish patients with periodontitis. For this reason, the aim of the current study was to screen for β -lactamase genes in the AMX- and cefotaxime-resistant subgingival microbiota isolated from 130 patients with periodontitis. Additionally, these isolates were tested for their multidrug resistance (MDR) to chloramphenicol, tetracycline, kanamycin, erythromycin, and streptomycin.

Materials and methods

Patients involved in the study

Subgingival samples were taken consecutively from 130 patients, recruited between 2016 and 2017, and diagnosed with generalized severe chronic periodontitis or generalized aggressive periodontitis according to the 1999 classification [19]. Nowadays, this diagnosis corresponds to generalized periodontitis stage III or IV, according to the new classification [20]. Stages were assessed according to the interproximal attachment loss. Grading was established considering the coefficient radiographic bone loss and patients age, adding the status of the systemic conditions such as smoking and diabetes. The samples were obtained from patients that attended at the Department of Periodontology of the Universitat Internacional de Catalunya (UIC) (Barcelona, Spain). All patients were supervised by the same clinician (CM), who also took the microbial samples. The study was previously approved by the Ethics Committee of the UIC (Study number: ODO-2014-01) and complied with the principles of the Declaration of Helsinki. Additionally, all the participants

signed an Institutional Review Board approved informed consent form. None of the patients had taken antibiotics at least 3 months prior to the sampling.

Clinical evaluation

The following clinical parameters were collected from a whole-mouth evaluation at baseline: probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), full mouth plaque index (FMPI), full mouth bleeding on probing (FMBP), and mobility and furcation involvement. The PPD was measured at 6 sites per tooth (mesiobuccal, mid-buccal, distobuccal, mesiolingual, mid-lingual, and distolingual) as the distance in millimeters from the free gingival margin to the base of the probeable pocket using a handheld periodontal probe (PCP-UNC 15; Hu-Friedy Mfg. Co., Chicago, IL, USA). The CAL was measured at 6 sites per tooth from the cemento-enamel junction (CEJ) or from the base of the dental restoration or prosthesis to the bottom of the pocket. The plaque index (PI) was recorded according to the criteria described by Silness and L  e [21]. Bleeding on probing (BOP) was determined as being present or absent (\pm) within 30 s after probing of the aforementioned 6 sites per tooth. Only the parameters of PPD, CAL, PI, BOP, and mobility of the selected teeth, those with deepest PPD of each quadrant, were evaluated in the study.

Sample collection

Subgingival microbial samples were taken from the deepest periodontal pocket of each quadrant. Each area was isolated with cotton rolls, the supragingival plaque deposits were carefully removed with curettes, and subgingival microbial samples were obtained by inserting two sterile paper points in each subgingival pocket and keeping them in place for 20 s. Samples from each patient were pooled in a vial containing 1.5 ml of cold sterilized reduced transport medium without ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) [22] and sent to the microbiology laboratory at 4   C for processing within the same day.

Microbial culture and bacterial selection

Subgingival biofilm samples were dispersed by vortex for 45 s. Serial tenfold dilutions were plated on blood agar (blood agar base no. 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) containing 5% of horse blood, hemin (5 mg/l), menadione (1 mg/l), and on the same media with 2 μ g/ml of cefotaxime (CTX) or 8 μ g/ml of AMX (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Both concentrations were selected based on the breakpoint concentrations recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [23, 24]. Given that

the oral microbiota harbors many different bacterial genera and that many of these are not mentioned in either the EUCAST or the CLSI guidelines, these concentrations were chosen based on taxonomic relatedness to bacteria of the oral environment, using the higher concentration of antibiotics when in doubt. Therefore, bacteria that grew on plates with antibiotics were considered to be resistant. In order to obtain a wider array of the subgingival microbiota, plates were incubated at 37 °C under microaerophilic (5% CO₂) and anaerobic (10% H₂, 10% CO₂, and 80% N₂) conditions for 48–72 h. Resistant colonies were isolated according to their morphology (two of each morphology), replated to obtain pure cultures, and preserved at –80 °C in a 30% sterilized glycerol solution.

DNA isolation and 16S rRNA gene sequencing

Genomic DNA extraction was performed on each isolate using the ATP™ Genomic DNA mini Kit (ATP Biotech Inc., Taipei City, Taiwan) following the manufacturer's instructions. Once extracted, DNA was visualized in a 0.7% agarose gel with ethidium bromide and quantified using a Nanodrop 2000C UV-vis spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Isolates were identified to a species level, through 16S rRNA gene sequencing [25]. Zero point five (0.5) micromolar of primers 27F and 1544R (Table 1) were added to the polymerase chain reaction (PCR) mix with 30–100 ng of DNA, 1X PCR buffer, 1X dNTPs solution, 2.5 mM of MgCl₂, and 1 unit of Taq polymerase (all reagents from Takara, Tokyo, Japan). Amplification was carried out using a T3000 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany) under the following conditions: 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 95 °C for 60 s,

57 °C for 60 s, and 72 °C for 60 s, and followed by 10 min at 72 °C. The PCR products were purified using the E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA) and sent for sequencing to Macrogen Inc. (Amsterdam, Netherlands). The sequences obtained were aligned using Clustal Omega Software and analyzed using NCBI's BLAST (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> and <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, respectively). Only sequences with ≥99% identity were accepted as proof to identify to the species level.

Detection of β-lactamase genes

Detection of β-lactamase genes was achieved using the primers described in Table 1. To ensure that most of the genetic variants would be detected in the screening, universal primers were used in the detection of *bla*_{CFXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CTX-M}. PCR reactions were performed with 30–100 ng of DNA, 1X PCR buffer, 1X dNTPs solution, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 μM of each primer, and 1 unit Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan). Amplifications were carried out in a T3000 Thermocycler. The thermocycling conditions were as follows: (i) for the detection of *bla*_{CFXA}, 1 min of denaturation at 95 °C, 1 min of annealing at 58 °C, and 1 min of extension at 72 °C for 26 cycles; (ii) for the detection of *bla*_{CepA/CblA}, 30 s of denaturation at 95 °C, 30 s of annealing at 58 °C, and 30 s of extension at 72 °C for 29 cycles; (iii) for the detection of *bla*_{ampC}, 1 min of denaturation at 95 °C, 1 min of annealing at 50 °C, and 1 min of extension at 72 °C for 30 cycles; (iv) for the detection of *bla*_{OXA}, 40 s of denaturation at 95 °C, 40 s of annealing at 55 °C, and 40 s of extension at 72 °C for 30 cycles; (v) for the detection of

Table 1 Primers and polymerase chain reaction conditions for the detection of β-lactamase and 16S rRNA genes

Gene	Primer name	Sequence 5' – 3'	Tm °C	Product size (bp)	Reference
16S rRNA	27 F 1544 R	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC	57	1500	[25]
<i>bla</i> _{CFXA}	CFXA F CFXA R	GCA AGT GCA GTT TAA GAT T GCT TTA GTT TGC ATT TTC ATC	58	934	[14]
<i>bla</i> _{CepA/CblA}	CepA/CblA F CepA/CblA R	CAA AGY GAC AAY AAT GCC TGC G TSA CGA AGR CGG CWA T	58	426	[26]
<i>bla</i> _{ampC}	AMPC F AMPC R	TAA ACA CCA CAT ATG TTC CG ACT TAC TTC AAC TCG CGA CG	50	769	[27]
<i>bla</i> _{OXA}	OXA F OXA R	TAT CGC GTG TCT TTC GAG TA TTA GCC ACC AAT GAT GCC	55	700	[28]
<i>bla</i> _{TEM}	TEM F TEM R	TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA GAA TGA ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT	60	445	[25]
<i>bla</i> _{SHV}	SHV F SHV R	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG TGC TTT GTT ATT CGG GCC AA	60	747	[29]
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M F CTX-M R	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG	60	593	[30]

*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CTX-M₁} a multiplex was performed as previously described [31]. In all reactions an initial, 5-min denaturation at 95 °C and a final 10 min extension at 72 °C were applied. DNA of the isolates carrying the genes screened was used as positive controls. To confirm the presence of the genes in the controls, PCR amplicons of the expected size were sequenced and annealed with reference sequences available at NCBI's GenBank. Negative controls included water in place of DNA in the PCR mix.

PCR products were observed through electrophoresis using a 2% agarose gel with ethidium bromide. Gels were photographed using a UV light transilluminator GEL DOCTM XR+ system (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA).

In vitro antimicrobial resistance testing

MDR was determined for all isolates using blood agar plates containing 5% of horse blood, hemin (5 mg/l), and menadione (1 mg/l) and supplemented with (i) 1 µg/ml of erythromycin (ERY), (ii) 64 µg/ml of kanamycin (KAN), (iii) 8 µg/ml of chloramphenicol (CHL), (iv) 128 µg/ml of streptomycin (STR), (v) 8 µg/ml of tetracycline (TET), and (vi) 2 µg/ml of CTX or 8 µg/ml of AMX (all antimicrobials were obtained as pure powder from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Incubation was performed at 37 °C in anaerobic and microaerophilic conditions for 48–72 h. The antibiotic concentrations used were set according to the recommendations provided by the EUCAST and CLSI and following the same criteria used for the initial selection for AMX and CTX.

Statistical analysis

The chi-square test was used as a paired statistical test for discrete variables to find statistical differences between the prevalence of the genes screened and phenotypical resistance to the antibiotics tested among the identified bacterial species of this study. *p*-values of <0.05 were accepted for statistical significance.

Results

One hundred and thirty subgingival samples were obtained from patients with generalized periodontitis stage III or IV. Patients were between the ages of 24 and 82 years old (mean of 51.3) and showed a mean probing depth of 6.6 ± 1.8 mm, a mean clinical attachment loss of 7.6 ± 2.1 mm, and 92.1% of gingival sites with bleeding on probing. From the 130 samples, 63 (48.5%) and 33 (25.4%) samples had AMX-resistant isolates in anaerobic (ARIA) and in microaerophilic (ARIM) conditions, respectively, while 98 (75.4%) and 70 (53.6%) samples had CTX-resistant isolates in anaerobic (CRIA) and in microaerophilic (CRIM) conditions, respectively. Twenty-

eight (21.5%) samples grown in anaerobiosis and 53 (40.8%) samples grown in microaerophilic conditions did not present any β-lactam-resistant isolates. Twenty-two samples (16.9%) did not present any β-lactam-resistant isolate in either microaerophilia or anaerobiosis. Samples grown in blood agar without antibiotics showed a mean bacterial load of 7.3 log₁₀ colony-forming units per milliliter (cfu/ml) (± 1.3) in anaerobic conditions and 7.1 log₁₀ cfu/ml (± 0.9) in microaerophilic conditions. The number of β-lactam-resistant bacteria averaged a 1 logarithmic reduction (Table 2).

The subgingival samples yielded 181 ARIAs, 84 ARIMs, 293 CRIAs, and 179 CRIMs, making a total of 737 isolates. Isolated bacteria were identified by the sequencing of their 16S rRNA gene, and β-lactam resistance genes were screened by PCR. Additionally, phenotypic resistance to CHL, STR, ERY, TET, and KAN was determined. Furthermore, AMX and CTX resistance was also tested depending on which antibiotic the isolates were selected for (Table 3). Data regarding the species detected, their phenotypic resistance, and their screened genes is shown in the Supplementary data (Table S1). Bacteria from the genus *Prevotella* were the most frequently isolated (*n* = 213), mainly the species *Prevotella nigrescens* (*n* = 70) and *Prevotella intermedia* (*n* = 65), followed by the genus *Streptococcus* (*n* = 153) with a wide variety of species within this genus (see Table S1). The genus *Prevotella* was significantly (*p* < 0.01) more prevalent in the ARIAs, while the genus *Veillonella* was more prevalent in the CRIAs (*p* < 0.01). Regarding bacteria grown in microaerophilic conditions, the genus *Neisseria* was significantly more prevalent in ARIMs (*p* < 0.05), while the genus *Micrococcus* was more prevalent in CRIMs (*p* < 0.01). More than 12% (12.1%) of the isolates were identified at a genus level, and 8% could not be identified at all (Tables 3 and S1).

Regarding the *bla* genes, *bla*_{CR_A} was the most prevalent gene (24.8%), followed by *bla*_{TEM} (12.9%), *bla*_{CepA/CbIA} (1.1%), and *bla*_{SHV} (0.8%). The *bla*_{CTX-M₁}, *bla*_{OXA₁}, and *bla*_{ampC} genes were not detected. A significantly higher (*p* < 0.01) percentage of *bla*_{CR_A} was observed in those isolates grown in anaerobic conditions compared to those grown in microaerophilic conditions.

Phenotypic resistance to other antibiotics was observed in 599 isolates (81.3%). These isolates were resistant to, at least, one antimicrobial besides the β-lactam for which they were previously selected. Fifty-six point eighty-five percent (56.9%) of the isolates showed resistance to KAN, 54.6% to ERY, 29.4% to TET, 27.7% to STR, and 9.9% to CHL. Isolates selected for AMX resistance showed resistance to CTX more frequently (53.6%) than conversely (32.2%). Most of the MDR isolates were resistant to 1–3 antimicrobials (22.2%, 26.4%, and 25.7%, respectively), and 15 isolates (2.5%) were resistant to the 6 antimicrobials tested (Table 4). Statistical differences were observed between the percentage of ARIAs and ARIMs resistant to CHL and KAN

Table 2 Bacterial counts expressed in colony-forming units per milliliter

	Anaerobic			Microaerophilic		
	AMX-resistant	CTX-resistant	Total bacteria	AMX-resistant	CTX-resistant	Total bacteria
Bacterial counts	1.3×10^6	2.3×10^6	2.0×10^7	1.3×10^6	1.2×10^6	1.4×10^7
Resistance %	6.5	11.6	–	9.6	8.8	–

AMX amoxicillin, CTX cefotaxime

and between the percentage of CRiAs and CRiMs resistant to AMX and KAN.

Discussion

This study analyzed the β -lactam-resistant subgingival microbiota isolated from patients with severe forms of periodontitis. Bacteria were isolated based on their resistance to AMX or to CTX. AMX was chosen for being the first-choice β -lactam for many bacterial infections including periodontitis [2, 32, 33]. The use of CTX, as a third-generation cephalosporin, is much more restricted, and therefore, resistance to this antibiotic should be scarcer. However, ESBLs such as CTX-M, which are active against it, are prevalent worldwide [34, 35], making them interesting targets to study when analyzing β -lactam resistance. An average of 7.8% of the culturable microbiota isolated in this study was resistant to AMX, slightly higher than what a previous study found in Spanish samples comparing subgingival microbiota from Spain and the Netherlands [36]. In our study population, CTX resistance turned out to be more prevalent, with 82.3% of the patients having at least one resistant isolate, than AMX resistance (55.4%). We detected a large amount of *Veillonella* isolates resistant to CTX ($n=76$) and very few resistant to AMX ($n=5$), which might be an explanation for the higher prevalence of CTX resistance. Previous studies have already shown that the genus *Veillonella* has a low susceptibility for β -lactams, probably due to the presence of penicillin-binding proteins with lower affinity for β -lactams [37–40]. Furthermore, other studies analyzed *Veillonella* isolates and found higher MICs of ceftioxin than AMX and ampicillin [38, 39], suggesting that *Veillonella* spp. might be more resistant to cephalosporins than aminopenicillins. *P. nigrescens* ($n=70$), *P. intermedia* ($n=65$), and *Veillonella parvula* ($n=60$) were the species most often isolated. This agrees with previous reports of *Prevotella* being the main genus in the oral environment expressing β -lactam resistance [41–43]. Most of the studies analyzing β -lactam resistance have based their selection of isolates on the production of β -lactamases, and therefore, despite being β -lactam-resistant, the *Veillonella* genus has been ruled out because it does not produce β -lactamases [37, 39, 44].

In this study, MDR was analyzed in each isolate using breakpoint concentrations suggested by the EUCAST and the CLSI. All the isolates that grew on agar plates with antibiotics were considered resistant. Of the 737 β -lactam-resistant isolates, 81.3% were MDR. From these, 63.3% were selected for CTX resistance and 36.7% for AMX resistance, these values being very similar to the percentage of total CTX- and AMX-resistant isolates obtained (64% and 35%, respectively) with little difference regarding whether they were cultured in anaerobic or in microaerophilic conditions; this suggests that MDR does not depend on the initial AMX or CTX selection. Few differences were observed between the 4 groups of isolates, except for KAN, CHL, and AMX resistance. Kanamycin resistance showed a higher prevalence in anaerobic isolates due mainly to the inherent resistance of anaerobic bacteria to this antibiotic [45] and to the *Prevotella* isolates, which are known to present a higher tolerance to kanamycin than other oral bacteria [46]. Chloramphenicol resistance was observed in higher percentages in microaerophilic isolates due mainly to the *Pseudomonas* isolates, which are able to exhibit high resistance levels thanks to their multidrug efflux pumps [47, 48]. On the other hand, AMX resistance was less often observed in the CTX microaerophilic isolates, probably due to the lack of *Prevotella* isolates, which increased the prevalence of AMX resistance in the CTX-resistant anaerobic group.

Fifteen isolates were resistant to the 7 antibiotics tested in this study and were all obtained from different patients. The isolates identified were *V. parvula* ($n=3$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n=2$), *Acinetobacter guillouiae* ($n=3$), and *Stenotrophomonas maltophilia* ($n=1$). Of the 15 isolates, 6 could not be identified through 16S rRNA gene sequencing. It has been reported that *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Stenotrophomonas* genera are rich in efflux pumps, which confer on them resistance to multiple antimicrobials [49]. Furthermore, tetracycline, kanamycin, and erythromycin resistance can be linked to the presence of transposons of the Tn916/1545 family, which are ubiquitous in the oral microbiota and carry genes that confer resistance to these antibiotics [50, 51]. These transposons have been described in *Veillonella* [52, 53], which might be responsible for the observed MDR.

The *bla*_{CTXA} gene was detected in 24.8% of the isolates, of which 71.0% ($n=136$) were bacteria from the *Prevotella*

Table 3 Number (N) of β -lactam-resistant bacteria isolated from subgingival microbiota in patients with periodontitis, classified by the culture conditions in which they grew and the genus to which they pertained

Genera	Antimicrobial resistance													
	N	bla _{TEM}	bla _{SIV}	bla _{CTXM}	bla _{CTSA}	bla _{CspA/CBA}	bla _{OXA}	bla _{ampC}	TET	CTX/AMX	CHL	STR	ERY	KAN
Amoxicillin anaerobiosis[§]														
<i>Actinomyces</i> sp.	4	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4
<i>Allpreviella</i> sp.	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Anaerococcus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>Eikenella</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Escherichia</i> sp.	4	2	2	0	0	0	0	2	2	2	1	1	3	3
<i>Fusobacterium</i> sp.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	1
<i>Klebsiella</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
<i>Lepiostichia</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Prevotella</i> sp.	106	14	0	0	66	1	0	42	71	1	25	47	80	8
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus</i> sp.	5	0	0	0	1	0	0	1	3	1	5	5	2	2
<i>Streptococcus</i> sp.	29	2	0	0	1	0	0	16	7	0	2	21	24	0
<i>Veillonella</i> sp.	5	1	0	0	1	0	0	0	2	0	4	5	0	0
Not determined	15	3	0	0	5	0	0	2	5	0	3	5	5	5
Total	181	23	2	0	75	1	0	64	96	4	47	95	125	0
Amoxicillin microaerophilic[§]														
<i>Actinobacter</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	4	0	0
<i>Actinomyces</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Bacillus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Capnocytophaga</i> sp.	5	1	0	0	4	0	0	0	5	1	1	1	0	5
<i>Dermacoccus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Haemophilus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
<i>Neisseria</i> sp.	13	3	0	0	0	2	0	2	1	0	1	12	1	1
<i>Paenibacillus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
<i>Pantoea</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	10	0	1	0	0	0	0	7	10	10	1	10	0	0
<i>Roseomonas</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Sphingomonas</i> sp.	3	0	0	0	0	0	0	0	3	1	3	3	3	3
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	3	0	0	0	0	0	0	3	3	1	3	3	3	3
<i>Streptococcus</i> sp.	22	1	0	0	0	0	0	5	3	3	1	8	16	5
Not determined	13	1	0	0	0	0	0	5	9	1	6	6	5	5
Total	84	8	1	0	4	2	0	22	46	19	20	47	31	0
Cefotaxime anaerobiosis[§]														
<i>Actinobacter</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i> sp.	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3
<i>Campylobacter</i> sp.	9	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	7	1	1
<i>Capnocytophaga</i> sp.	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	3
<i>Dialister</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Klebsiella</i> sp.	2	0	2	0	0	0	0	2	2	0	1	2	0	0

Table 3 (continued)

Genera	Antimicrobial resistance													
	N	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{ICA}	<i>bla</i> _{CPB} [†]	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{ampC}	TET	CTX/ AMX	CHL	STR	ERY	KAN
<i>Morganella</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
<i>Olsenella</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	6	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	3	4
<i>Prevotella</i> sp.	107	11	0	0	70	3	0	0	33	75	5	28	42	81
<i>Pseudomonas</i> sp.	6	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	0	3	4
<i>Rothia</i> sp.	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>Serratia</i> sp.	4	0	0	0	0	0	0	0	3	3	1	2	3	1
<i>Staphylococcus</i> sp.	11	3	0	0	4	0	0	0	4	5	4	3	9	5
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> sp.	47	2	1	0	5	0	0	0	22	8	5	11	27	43
<i>Veillonella</i> sp.	74	19	0	0	7	1	0	0	12	16	4	39	69	43
Not determined	11	2	0	0	0	0	0	0	3	1	0	4	3	3
Total	293	43	3	0	89	4	0	0	85	121	22	96	170	194
Cefoxime microaerophilic [‡]														
<i>Acinetobacter</i> sp.	7	0	0	0	0	0	0	0	4	4	3	5	5	3
<i>Capnocytophaga</i> sp.	10	0	0	0	8	0	0	0	0	2	0	1	0	10
<i>Corynebacterium</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2
<i>Dermacoccus</i> sp.	6	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	2	3	2
<i>Haemophilus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
<i>Lactobacter</i> sp.	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i> sp.	27	3	0	0	0	0	0	0	0	0	5	9	7	4
<i>Neisseria</i> sp.	13	3	0	0	0	0	0	0	4	2	0	1	1	1
<i>Paenibacillus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	11	0	0	0	0	1	0	0	5	8	7	3	10	2
<i>Roscomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Rothia</i> sp.	8	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sphingomonas</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0
<i>Staphylococcus</i> sp.	8	1	0	0	1	0	0	0	2	4	0	0	2	1
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	2	2
<i>Streptococcus</i> sp.	55	7	0	0	4	0	0	0	18	1	1	9	28	32
<i>Veillonella</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2
Not determined	19	0	0	0	1	0	0	0	5	4	5	5	11	7
Total	179	21	0	0	15	1	0	0	46	31	28	41	90	69

[†] Amoxicillin-resistant isolates grown in anaerobic conditions. [‡] Amoxicillin-resistant isolates grown in microaerophilic conditions. [§] Cefoxime-resistant isolates grown in anaerobic conditions.

[¶] Cefoxime-resistant isolates grown in microaerophilic conditions

^{**} TET tetracycline, CTX cefoxime, AMX amoxicillin, CHL chloramphenicol, STR streptomycin, ERY erythromycin, KAN kanamycin

Table 4 Number of isolates resistant to other antimicrobials

N° of antibiotics	MDR isolates				Total
	CRIA	CRIM	ARIA	ARIM	
0	47	46	37	8	138
1	37	56	16	24	133
2	70	29	33	26	158
3	73	23	49	9	154
4	39	11	28	9	87
5	26	6	18	2	52
6	1	8	0	6	15
Total	293	179	181	84	737

CRIA cefotaxime-resistant isolates in anaerobic conditions, CRIM cefotaxime-resistant isolates in microaerophilic conditions, ARIA amoxicillin-resistant isolates in anaerobic conditions, ARIM amoxicillin-resistant isolates in microaerophilic conditions, MDR multidrug-resistant

genus. This genus has been previously associated with the bla_{CRA} gene, acquiring resistance to a variety of penicillins and cephalosporins [54]. As previously reported by other studies [12, 13, 55], we observed a high prevalence of bla_{CRA} in isolates of the *Capnocytophaga* genus (83.3%). To our knowledge, this is the first report of bla_{CRA} in the *Staphylococcus*, *Alloprevotella*, *Streptococcus*, and *Veillonella* genera. Since oral biofilm is a favorable environment for horizontal gene transfer [56, 57], it might be possible for bla_{CRA} to have been transferred from the *Prevotella* or *Capnocytophaga* genera, which are usual carriers of the gene [13]. The bla_{TEM} gene was found in 23.1% of the samples and in 12.9% of the isolates, mainly in *Veillonella* spp. and *Prevotella* spp. The prevalence of this gene in our samples was low when compared to the study conducted by Ioannidis et al. which observed a prevalence of between 46.2 and 72.7% of bla_{TEM} in subgingival and tongue samples from Greek subjects [58]. These differences might be related to the higher consumption of β -lactams by the Greek population according to the European Centre for Disease Prevention and Control [59], or methodologically related, since the detection of bla_{TEM} was done from a pool of subgingival bacteria in each sample, regardless of their resistance patterns or ability to grow in isolation. The detection of the genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , and bla_{CRA} in streptococci is noteworthy, given that there is some controversy about the presence of *bla* genes in this genus. Although it has been suggested that streptococci are unable to acquire foreign *bla* genes [60], at least two studies have reported the presence of these genes in *Streptococcus pneumoniae* [61, 62]. The detection of bla_{TEM} by Ding et al. was questioned due to possible contamination of the Taq polymerase used in the reaction [63]; however, in our study, the negative controls did not suggest the presence of any contamination. Therefore, it would be interesting to conduct further studies to analyze the presence of *bla* genes among oral streptococci. Both bla_{CRA}

and bla_{SHV} were found in low numbers as observed by the previous studies [13, 43, 64], suggesting that they may not play a critical role in β -lactam resistance in the oral environment.

With the data obtained in this study, we conclude that β -lactam resistance is widespread among the subgingival bacteria of Spanish patients with periodontitis. *Prevotella*, *Veillonella*, and *Streptococcus* were the genera with the highest number of β -lactam-resistant isolates, suggesting that in this population, oral commensal microbiota might be a reservoir of β -lactam resistance. Of special importance is the presence of β -lactamases that are coded in transferable genes such as bla_{CRA} and bla_{TEM} , which could transfer to other oral or transient bacteria. Moreover, a high prevalence of MDR was observed, constraining the number of antibiotics available against bacterial infections, where these to be needed. Despite the reports warning about increasing antimicrobial resistance, antimicrobials are usually prescribed in the clinical practice without studying microbial profiles and without performing antibiograms, a practice that favors the spread of antimicrobial resistance. The above, together with the high percentages of β -lactam resistance observed in this study, underlines the risk of a currently successful antibiotic treatment becoming ineffective.

Funding information No external funding, apart from the support of the authors' institution, was available for this study.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Universitat Internacional de Catalunya research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Meyle J (2000) Chapple I (2015) molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 69:7–17. <https://doi.org/10.1111/pd.12104>
2. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 29:136–159. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.29.s3.8.x>
3. Matesanz-Pérez P, García-Gargallo M, Figuero E, Bascones-Martínez A, Sanz M, Herrera D (2013) A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the

- treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 40:227–241. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12026>
4. Rabelo CC, Feres M, Gonçalves C, Faver M, Tu Y-K, Chambrone L (2015) Systemic antibiotics in the treatment of aggressive periodontitis. A systematic review and a Bayesian Network meta-analysis. *J Clin Periodontol* 42:647–657. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12427>
 5. Pretzl B, Sälzer S, Ehmke B, Schlagenhaut U, Dannewitz B, Dommisch H, Eickholz P, Jockel-Schneider Y (2019) Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy—a consensus report. *Clin Oral Invest* 23:3073–3085. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2727-0>
 6. Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA (2004) β -Lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 19:303–308. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2004.00159.x>
 7. Jacoby GA (2009) AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22: 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
 8. Perez F, Endimiani A, Hujer K, Bonomo R (2007) The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 7:459–469. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.08.003>
 9. Danziger LH, Pendland SL (1995) Bacterial resistance to β -lactam antibiotics. *Am J Heal Pharm* 52:S3–S8. https://doi.org/10.1093/ajhp/52.6.Suppl_2.S3
 10. Lee JH, Bae IK, Hee Lee S (2012) New definitions of extended-spectrum β -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Med Res Rev* 32:216–232. <https://doi.org/10.1002/med.20210>
 11. Turner PJ (2005) Extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis* 41:S273–S275. <https://doi.org/10.1086/430789>
 12. Handal T, Giraud-Morin C, Caugant DA, Madinier I, Olsen I, Foote T (2005) Chromosome- and plasmid-encoded β -lactamases in *Campylobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3940–3943. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3940-3943.2005>
 13. Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA (2005) Detection and characterization of β -lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiol Lett* 242: 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.023>
 14. Kim S-M, Kim HC, Lee S-WS (2011) Characterization of antibiotic resistance determinants in oral biofilms. *J Microbiol* 49:595–602. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0519-1>
 15. Søråas A, Olsen I, Sundsfjord A, Handal T, Bjørang O, Jennum PA (2014) Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria are not detected in supragingival plaque samples from human fecal carriers of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. *J Oral Microbiol* 6:24026. <https://doi.org/10.3402/jom.v6.24026>
 16. Olsen I, Tribble GD, Fiehn NE, Wang BY (2013) Bacterial sex in dental plaque. *J Oral Microbiol* 5:1. <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.20736>
 17. Roberts AP, Mullany P (2010) Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 8:1441–1450. <https://doi.org/10.1586/eri.10.106>
 18. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), and EMA (European Medicines Agency) (2017) ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals - joint interagency antimicrobial consumption and resistance analysis (JIACRA) report. EFSA J 15:4872–5007. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4872>
 19. Armitage GC (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4:1–6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
 20. Caion JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Komman KS, Mealey BL, Papanou PN, Sanz M, Tonetti MS (2018) A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 45:S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
 21. Silness J, Løe H (1964) Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 22:121–135. <https://doi.org/10.3109/00016356408993968>
 22. Loesch WJ, Syed SA, Stoll J (1987) Trypsin-like activity in subgingival plaque. *J Periodontol* 58:266–273. <https://doi.org/10.1902/jop.1987.58.4.266>
 23. CLSI (2017) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (27th ed). Wayne, PA
 24. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2018) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints
 25. Shigematsu T, Hayashi M, Kikuchi I, Ueno S, Masaki H, Fujii T (2009) A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment. *FEMS Microbiol Lett* 293:240–247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01536.x>
 26. Fosse T, Madinier I, Hannoun L, Giraud-Morin C, Hitzig C, Charbit Y, Ourang S (2002) High prevalence of *efxA* β -lactamase in aminopenicillin-resistant *Prevotella* strains isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* 17:85–88. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2001.00096.x>
 27. Bou G, Martinez-Beltran J (2000) Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:428–432. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.2.428-432.2000>
 28. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM (1995) OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1881–1884. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.8.1881>
 29. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA, International *Klebsiella* Study Group (2003) Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3554–3560. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3554-3560.2003>
 30. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (2004) Complete nucleotide sequence of a 92-Kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum Beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3758–3764. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3758-3764.2004>
 31. Monstein H-J, Östholm-Balkhed Å, Nilsson MV, Nilsson M, Dombusch K, Nilsson LE (2007) Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 115:1400–1408. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x>
 32. Slots J (2012) Low-cost periodontal therapy. *Periodontol* 2000(60): 110–137. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00429.x>
 33. Segura-Egea JJ, Velasco-Ortega E, Torres-Lagares D, Velasco-Ponferrada MC, Monsalve-Guil L, Llamas-Carreras JM (2010) Pattern of antibiotic prescription in the management of endodontic infections amongst Spanish oral surgeons. *Int Endod J* 43:342–350. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01691.x>
 34. Paterson DL, Bonomo RA (2005) Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18:657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
 35. D'Andrea MM, Arena F, Pallicchi L, Rossolini GM (2013) CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int*

- J Med Microbiol 303:305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>
36. Van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, Dellemijn-Kippuw N, Vanden-broucke-Grauls CMJE, Sanz M (2000) Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis: a comparison between the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 27:79–86. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2000.027002079.x>
 37. Ready D, Bedi R, Mullany P, Wilson M (2012) Penicillin and amoxicillin resistance in oral *Veillonella* spp. *Int J Antimicrob Agents* 40: 188–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.007>
 38. Nyfors S, Kónönen E, Bryk A, Syrjänen R, Jousimies-Somer H (2003) Age-related frequency of penicillin resistance of oral *Veillonella*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 46:279–283. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00082-8)
 39. Reig M, Mir N, Baquero F (1997) Penicillin resistance in *Veillonella*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1210. <https://doi.org/10.1128/aac.41.5.1210>
 40. Theron MM (2003) Penicillin-binding proteins involved in high-level piperacillin resistance in *Veillonella* spp. *J Antimicrob Chemother* 52:120–122. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg297>
 41. Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, Yamamoto E, Karasawa T (2007) Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* 22:285–288. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00365.x>
 42. van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 32:893–898. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00782.x>
 43. Fernández-Canigia L, Cejas D, Gutkind G, Radice M (2015) Detection and genetic characterization of β -lactamases in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from oral cavity infections and peritonsillar abscesses. *Anaerobe* 33:8–13. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.01.007>
 44. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ (2013) Prevalence of β -lactamase-producing bacteria in human periodontitis. *J Periodontol Res* 48:493–499. <https://doi.org/10.1111/jre.12031>
 45. Pancoast SJ (1988) Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *Med Clin North Am* 72:581–612
 46. Holbrook WP, Ogston SA, Ross PW (1978) A method for the isolation of *Bacteroides melaninogenicus* from the human mouth. *J Med Microbiol* 11:203–207. <https://doi.org/10.1099/00222615-11-2-203>
 47. McCarthy K (2015) *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and implications for therapy. *Semin Respir Crit Care Med* 36:044–055. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1396907>
 48. Puzari M, Chetia P (2017) RND efflux pump mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. *World J Microbiol Biotechnol* 33:24. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2190-5>
 49. Dougherty TJ, Pucci MJ (2012) Antibiotic discovery and development. Springer US, Boston
 50. Roberts AP, Mullany P (2011) Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:856–871. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00283.x>
 51. Santoro F, Vianna ME, Roberts AP (2014) Variation on a theme; an overview of the Tn916/Tn1545 family of mobile genetic elements in the oral and nasopharyngeal streptococci. *Front Microbiol* 5:1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00535>
 52. Ready D, Pratten J, Roberts AP, Bedi R, Mullany P, Wilson M (2006) Potential role of *Veillonella* spp. as a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2866–2868. <https://doi.org/10.1128/AAC.00217-06>
 53. Clewell DB, Flanagan SE, Jaworski DD, Clewell DB (1995) Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* 3:229–236. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88930-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88930-1)
 54. Edwards R, Beringer R, Greenwood D (1996) Characterization of β -lactamases of *Prevotella* species. *Anaerobe* 2:217–221. <https://doi.org/10.1006/anae.1996.0030>
 55. Ehrmann E, Handal T, Tamanai-Shacoori Z, Bonnaure-Mallet M, Fosse T (2014) High prevalence of β -lactam and macrolide resistance genes in human oral *Capnocytophaga* species. *J Antimicrob Chemother* 69:381–384. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt350>
 56. Kolenbrander PE (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 54:413–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.413>
 57. Roberts AP, Kreth J (2014) The impact of horizontal gene transfer on the adaptive ability of the human oral microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* 4:1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00124>
 58. Ioannidis I, Sakellari D, Spala A, Arsenakis M, Konstantinidis A (2009) Prevalence of *tetM*, *tetQ*, *nim* and *bla*_{TEM} genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *J Clin Periodontol* 36:569–574. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01425.x>
 59. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2014) Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2012>
 60. Haenni M, Lupo A, Madee J-Y (2018) Antimicrobial resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiol Spectr* 6:1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017>
 61. Ding Y, Zhang J, Mi Z, Qin L, Tao YZ, Qi X (2004) Study on the molecular epidemiology of beta-lactamase TEM gene in isolated *Streptococcus pneumoniae*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 25:970–972
 62. Chang C-Y, Lin H-J, Li B-R, Li Y-K (2016) A novel metallo- β -lactamase involved in the ampicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49136 strain. *PLoS One* 11:e0155905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155905>
 63. Koncan R, Valverde A, Morosini M-I, Garcia-Castillo M, Cantón R, Cornaglia G, Baquero F, del Campo R (2007) Learning from mistakes: *Taq* polymerase contaminated with β -lactamase sequences results in false emergence of *Streptococcus pneumoniae* containing TEM. *J Antimicrob Chemother* 60:702–703. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm239>
 64. Naito M, Sato K, Shoji M, Yukitake H, Ogura Y, Hayashi T, Nakayama K (2011) Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. *Microbiology* 157:2022–2032. <https://doi.org/10.1099/mic.0.047803-0>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Artículo enviado a la revista *Frontiers in Microbiology*, avalado por los revisores y pendiente de aceptación por el editor.

Tetracycline and multidrug resistance in oral microbiota: differences between healthy subjects and patients with periodontitis

Alexandre Arredondo^{1,2}, Vanessa Blanc¹, Carolina Mor³, José Nart³ and Rubén León¹

¹Department of Microbiology, Dentaïd Research Center, Cerdanyola del Vallès, Spain.

²Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

³Department of Periodontology, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain.

Correspondence:

Corresponding Author

leon@dentaïd.es

Keywords: antibiotic resistance, tetracycline, periodontitis, subgingival microbiota, multidrug resistance

This manuscript consists of 3334 words and includes 3 tables and 1 figure.

ABSTRACT

Antibiotic resistance has been spreading and increasing worldwide due to the abuse and misuse of antibiotics. Nowadays, antibiotic resistance can be widely found even among bacterial populations that have not been exposed to selective pressure by any antibiotic. This is the case of tetracyclines, a class of once frequently used antibiotics, which now show significant numbers of resistant strains. In this study we analyzed the tetracycline resistant subgingival microbiota of healthy subjects and of patients with periodontal disease, comparing the prevalence of *tet* genes and their multidrug resistance profiles. Samples from 259 volunteers were analyzed, obtaining 813 tetracycline resistant isolates. The prevalence of 12 antibiotic resistance genes was assessed by PCR, and multidrug profiles were built by growing each isolate in media containing breakpoint concentrations of each of the 6 antibiotics tested. Each isolate was identified to the species level by 16S rRNA sequencing. *tet(M)* was the most frequently detected *tet* gene (52.03%), followed by *tet(32)* (8.24%) and *tet(O)* (7.75%), and we noticed significant differences between the prevalences of *tet(M)*, *tet(W)*, *tet(O)*, *tet(32)* and *tet(L)* in the two populations studied. Multidrug resistance was largely observed, with resistance to kanamycin being the most commonly detected (83.64%), followed by erythromycin (67.16%) and streptomycin (20.66%) resistance. There were significant differences between the populations in terms of the prevalence of kanamycin, chloramphenicol and cefotaxime resistance. Finally, differences were also observed concerning the species identified. Although the prevalence of tetracycline resistant streptococci was similar in both groups, species such as *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguinis* were detected more often in samples from healthy subjects, while *Streptococcus anginosus* and *Streptococcus constellatus*, among others, were detected more often in samples from subjects with periodontitis. Our results showed that tetracycline resistance was similarly prevalent in the microbiota of both populations, although significant differences could be detected when analyzing the species that shape that microbiota, as well as the genes they carry and their multidrug resistance profiles.

INTRODUCTION

Antibiotics have been used in clinical practice since their discovery, saving countless lives. Tetracycline was one of the first antibiotics to be discovered, in the 1940s, and its broad-spectrum activity and relatively few side effects made it a widely used antibiotic. Its appealing properties led to extensive use, exerting a great deal of selective pressure on bacteria, which did not take long to become resistant. Despite the rise of resistance, tetracyclines were and still are used in the treatment of some human infections (1), and especially in the cattle industry as growth promoters due to their anti-inflammatory effects on the gastrointestinal tract of the animals (2). It has been reported that the use of antimicrobials in the cattle industry has an impact on the microbiota that lives in soils or sediments where all the wastes of such industry are left, increasing the prevalence of antimicrobial resistance genes in bacterial populations that had previously had little or no contact with antibiotics (3). This abuse and misuse of antimicrobials may have repercussions on human health, increasing people's chances of carrying antimicrobial resistant bacteria without having been exposed to the antimicrobials in question. Such is the case of the oral environment, in which bacteria carrying tetracycline resistance genes have been previously detected (4, 5). Antibiotics have been used as adjuvants in certain dental treatments such as the treatment of periodontitis, which has been reported to benefit from the action of antimicrobials (6, 7). Currently the main antibiotics used in periodontal treatment are amoxicillin and metronidazole (8), however, tetracyclines have been widely used in the past and there are reports of tetracycline resistance in the oral microbiota (5, 9).

Resistance to tetracycline can be expressed through efflux pumps, ribosomal protection proteins (RPPs) and inactivation enzymes. Tetracycline resistance genes code for these mechanisms and are widespread among oral bacteria, where *tet(M)* is the most common (10). Other genes coding for RPPs have been described in the oral environment, such as *tet(Q)*, *tet(O)*, *tet(S)* and *tet(W)* (10), and genes that code for efflux pumps such as *tet(B)*, *tet(32)*, *tet(K)* and *tet(L)* can also be found within the oral microbiota (10). Several genes, including *tet(37)* and *tet(X)*, have been described as genes coding for inactivating enzymes, but so far only *tet(37)* has been found in the oral environment (11, 12).

Furthermore, the strong presence of Tn916/1545 family transposons in the oral microbiota, which can carry tetracycline, macrolide and/or aminoglycoside resistance genes, among others (13), means that those tetracycline resistant microorganisms may also be resistant to other antimicrobials. Multidrug resistance is an increasingly troubling issue for the health authorities (14), and although multiple efforts are being made in order to provide more information, little is known regarding multidrug resistance in the oral environment.

It has been widely described that the subgingival microbiota of patients with periodontitis differs from that of healthy subjects (15) and therefore, the prevalence of antimicrobial resistance genes and the prevalence of multidrug resistance among these bacterial populations could be

different. The objective of this study was to compare the prevalence of 11 *tet* genes in tetracycline resistant subgingival microbiota isolated from 129 healthy volunteers and 130 patients with periodontitis. Moreover, the isolates were identified to a species level, and their multidrug resistance profiles were assessed.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sample collection and culture

The samples included in this work were part of two previous studies, whose research protocols were approved by the Ethics Committee of the Universitat Internacional de Catalunya (UIC), (Barcelona, Spain) with study numbers: PER-ECL-2011-06-NF and ODO-2014-01. Both research protocols complied with the principles of the Declaration of Helsinki. Subgingival samples were taken from 259 volunteers including 129 periodontally healthy subjects, averaging 21.5 years of age, and 130 subjects with periodontal disease averaging 51.25 years of age. Samples were obtained at the department of periodontology of the UIC. All volunteers signed an IRB-approved informed consent form. Patients with periodontal disease were diagnosed with generalized severe chronic periodontitis (16) or stage III or IV generalized grade B or C periodontitis (17). To be included in the study, periodontally healthy subjects had to have at least 6 teeth per quadrant, probing depths ≤ 3 mm and absence of moderate or severe gingivitis. Smokers of more than 5 cigarettes per day, wearers of orthodontic appliances and pregnant or breastfeeding women were not included in the study. None of the volunteers took antibiotics at least 3 months prior to the sampling.

Subgingival samples were taken by placing two sterile paper points in the deepest site of each quadrant for 20 seconds and stored in 2 ml of reduced transport fluid without EDTA (18). Vials with the paper points were sent to the laboratory at 4°C to be processed within the same day. Subgingival samples were dispersed by vortex for 60 seconds. Serial dilutions of each sample were plated on blood agar plates (Blood agar base No. 2; Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) containing 5% horse blood, hemin (5 mg/L) and menadione (1 mg/L) and on blood agar plates with and without 8 µg/ml tetracycline. All plates were incubated in anaerobic conditions (10% H₂, 10%CO₂ and 80% N₂) at 37°C for 72 hours. All of the different colony morphologies were isolated and replated to obtain pure cultures that were preserved at -80°C in a 30% glycerol solution.

2.2 *In vitro* antibiotic resistance testing

Resistance to 6 other antibiotics was tested using blood agar plates containing 1 µg/ml of erythromycin (ERY), 64 µg/ml of kanamycin (KAN), 8 µg/ml of chloramphenicol (CHL), 128 µg/ml of streptomycin (STR), 2 µg/ml of cefotaxime (CTX) and 8 µg/ml of AMX (all antimicrobials were obtained as pure powder from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Antimicrobial breakpoint concentrations were set according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (19) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (20). However, most of the species present in the oral environment are not covered by any of these organizations. Therefore, antibiotic concentrations were chosen based on taxonomic relatedness to oral bacteria, using the higher concentration of antibiotics when in doubt (Table S2). Incubation was performed at 37°C in anaerobic conditions for 72 hours.

2.3 DNA extraction

DNA extraction was performed on each isolate using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions with some modifications. Cells were suspended in 180 µl of a 20 mg/ml lysozyme solution (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100) and incubated for 30 min at 36°C. Then, 200 µl of Buffer AL (provided in the kit), 10 µl of RNase A (20 mg/ml) and 10 µl of proteinase K (20 mg/ml) were added and incubated for 30 min at 56°C. Further steps were conducted according to the manufacturer's protocol. Lastly, DNA was re-suspended in 100 µl of buffer AE (provided in the kit), visualized in a 0.5% agarose gel and quantified using a Nanodrop 2000C UV-vis spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

2.4 Sequencing of the 16S rRNA gene

The 16S rRNA gene was amplified by PCR using universal primers 27F and 1544R (Table 1). PCR amplification was carried out using a T3000 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany) under the following conditions: 5 min at 95°C, followed by 35 cycles at 95°C for 60 sec, 57°C for 60 sec and 72°C for 60 sec; followed by another 10 min at 72°C. Sequencing of the gene 16S rRNA was performed in Macrogen, Inc. (Amsterdam, The Netherlands). The sequences obtained were aligned to form a single contig and were identified by comparison with those available at the National Center for Biotechnology Information database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BLAST software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Only sequences with >99% of similarity were accepted to identify isolates at species level and the 16S rRNA sequences were deposited in GenBank (accession numbers MT807114-MT807900).

2.5 Detection of antibiotic resistance genes

For the detection of antibiotic resistance genes, 4 multiplex-PCR were performed using 4 sets of primers (Table 1) as previously described (4). The amplified products were evaluated by electrophoresis using a 2% agarose gel. Some of these amplified products were sequenced

(Macrogen, Inc., Amsterdam, The Netherlands), and used as positive controls. The GenBank accession numbers for the positive controls are available in the supplementary material.

2.6 Statistical analysis

Qualitative results were obtained when screening for genes and when testing the ability of the isolates to grow in media containing a breakpoint antimicrobial concentration. Isolates were considered resistant to the antimicrobial if they were able to grow in the medium containing antibiotic and susceptible if they were not. To compare the prevalence of antibiotic resistance and of antibiotic resistance genes in both healthy subjects and subjects with periodontal disease, data were analyzed using the chi-square test, and a nominal significance level of 5% ($p < 0.05$) was applied.

RESULTS

Samples from subjects with periodontal disease (SSPD) grown on blood agar showed a mean bacterial load of $6.54 \log_{10}$ cfu/ml (± 0.91), while samples from periodontally healthy subjects (SPHS) showed a mean bacterial load of $5.64 \log_{10}$ cfu/ml (± 0.8). When grown on media with tetracycline, SSPD showed a mean of $4.87 \log_{10}$ cfu/ml (± 2.09) versus the $3.66 \log_{10}$ cfu/ml (± 1.63) for SPHS. Eighty-six point eighty-two percent (86.82%) ($n=112$) of SPHS and 86.15% ($n=112$) of SSPD harbored tetracycline resistant bacteria, from which we obtained a total of 813 isolates, belonging 448 to SPHS and 365 to SSPD.

Streptococcus sp. was the most frequently isolated genus, representing 75.62% in SSPD and 75.89% in SPHS. In both groups, *Streptococcus oralis* was the most frequently isolated species ($n=83$), followed by other streptococcal species such as *Streptococcus mitis* ($n=81$), *Streptococcus intermedius* ($n=79$) and *Streptococcus constellatus* ($n=58$). The most frequently isolated non-streptococcal species was *Prevotella intermedia* ($n=31$) followed by *Prevotella nigrescens* ($n=25$).

When comparing the prevalence of certain species between the two groups of subjects, significant differences were observed: *Gemella haemolysans* (5-fold), *S. oralis* (3-fold), *Streptococcus pneumoniae* (4-fold) and *Streptococcus sanguinis* (4-fold) were more prevalent in SPHS, while *Streptococcus anginosus* (2-fold), *S. constellatus* (6-fold), *Streptococcus gordonii* (2-fold), *Streptococcus parasanguinis* (3-fold) and *S. tigurinus* (7-fold) were more prevalent in SSPD (Table S1).

A lists of the identified genera of the tetracycline resistant microorganisms isolated in this study, the prevalence of the antibiotic resistance genes screened and the multidrug resistance profile for the 6 antibiotics tested is displayed in the Table 2. The genes *tet(M)* (52.03%), *tet(32)* (8.24%) and *tet(O)* (7.75%) were the most frequently detected *tet* genes. The *intTn* gene, which

codes for an integrase located in transposons of the family Tn916/1545 was widely detected (79.58%), being more prevalent in SPHS (81.92%) than in SSPD (76.71%).

Moreover, we found that ninety-one percent of all the isolates were resistant to other antibiotics besides tetracycline (Table 3). Resistance to KAN was the most frequently observed (83.64%), followed by ERY (67.16%), STR (20.66%), CTX (18.08%), AMX (15.50%) and CHL (14.64%). Prevalence and significant differences of the studied genes and resistances between the two groups are shown in Figure 1.

All the identified species and their prevalence of the antibiotic resistance genes screened and the resistance to 6 antibiotics are presented in Table S1.

DISCUSSION

Tetracyclines are a class of antimicrobial whose use has become limited due to the rise of resistant bacteria. Nevertheless, they are still being used as local therapy antimicrobials (21–23), as systemic antimicrobials to treat some diseases (24–27) and also for other clinical and animal husbandry uses (28, 29). Despite this, tetracycline resistant bacteria are still isolated in subjects that have not received therapy with this antibiotic and therefore should not have been exposed to selective pressure (30). In this study, we compared the tetracycline resistant microbiota isolated from periodontally healthy subjects and that taken from subjects with periodontal disease.

Bacterial counts, both total and that of resistant bacteria, were ten times higher in SSPD than in SPHS. This agrees with previous studies (31, 32), in which the bacterial load in the periodontal pocket of patients with periodontitis was higher than that observed from periodontally healthy subjects. A higher percentage of tetracycline resistant bacteria was also observed in SSPD, probably due to the higher bacterial load of those samples.

Although percentages of total tetracycline resistant streptococci were similar in both groups of subjects, differences were observed at species level (Table S1). *S. sanguinis*, *S. oralis* and *S. pneumoniae*, which in our study were significantly more prevalent in SPHS, have been previously associated to commensal biofilms (33, 34), while *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. gordonii* and *S. tigurinus* and *S. parasanguinis*, which in our study were significantly more prevalent in SSPD, have been related to a periodontitis-associated microbiota (35–39). However, the role of these species in periodontal disease is not yet clear (40, 41).

The prevalence of *G. haemolysans* was significantly higher in SPHS. This species has been described by metagenomic studies as an early colonizer of the oral biofilm (42, 43) and therefore as part of the commensal microbiota. However, it has also been linked to opportunistic infections (44).

Isolates of the genus *Prevotella* were significantly more prevalent in SSPD (2-fold). The increased richness of *Prevotella* species in SSPD was responsible for this, increasing the total

number of *Prevotella* isolates in SSPD. However, *P. intermedia* and *P. nigrescens*, two *Prevotella* species that were present in both populations, did not show significantly different prevalences. The genus *Prevotella* has been linked to the progression of periodontal disease, and therefore, a higher prevalence of this genus was expected in SSPD. However, the increased richness of tetracycline resistant *Prevotella* species observed in SSPD is worth mentioning, since most reports have focused their attention on *P. intermedia* and *P. nigrescens* (45, 46), and little is known about the prevalence of tetracycline resistance in other oral *Prevotella* species.

In this study we found the genes *tet(W)*, *tet(O)*, *tet(32)*, *tet(B)*, *tet(Q)* and *tet(K)*, distributed among the genera *Eubacterium*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Butyrivibrio* and *Prevotella* which, according to the tetracycline resistance genes database available at <http://faculty.washington.edu/marilynr/>, had not been previously reported (Table 2). However, further studies are needed to confirm these results. For instance, the detection of the gene *tet(B)* in streptococci, as recently described (47), or new *tet* genes being described in the oral environment (48) show that there is still much to be unveiled regarding tetracycline resistance genes. The prevalence of the gene *tet(M)* among the SPHS of our study was similar (65.85%) to what has been previously described (5, 30). Nevertheless, the prevalence of this gene in SSPD was much lower (35.07%) than what other authors found in Greek and US subjects with periodontitis (30, 49), but similar to the percentages found in Dominican patients (4). These differences might be explained by the geographical constraints of the populations involved in the studies or due to their methodological approaches, such as pooling the samples, the DNA or different selection criteria of the isolates. As previously discussed, the streptococcal species were significantly different between SPHS and SSPD, which might be the cause for the differences in prevalence of *tet(M)* between the two groups studied. While 73.53% of the streptococci isolated from SPHS showed *tet(M)*, only 42.02% of the streptococci isolated from SSPD did, indicating that those streptococci associated to a healthy biofilm might be more susceptible to carry *tet(M)*. In our study, the prevalence of *tet(32)* was higher in SSPD, as previously described (4), which might be due to the increased prevalence of this gene in periodontitis associated species such as *S. constellatus* and *P. intermedia*, although other authors have also detected this gene in some commensal bacteria (50). The gene *tet(W)* can be frequently detected in the DNA from pooled saliva and plaque samples (5, 51, 52), but its distribution within the subgingival biofilm has only been studied by Collins *et al.* (4). In said study, *tet(W)* was, on average, twice as prevalent in SSPD than in SPHS. In our study, *tet(W)* was more ubiquitous in SPHS, since *S. intermedius* and *S. oralis*, which were more prevalent in SPHS, were some of the species that carried *tet(W)* most often.

Transposons of the Tn916/1545 family are frequently found in oral microbiota (53). These transposons usually carry tetracycline resistance genes, and in some cases, genes that confer resistance to macrolides and/or aminoglycosides (54, 55). In order to estimate the presence

of these transposons among the isolates, we used PCR to screen the *intTn* gene, which codes for an integrase located at the 3'- ends of these transposons (13), the *tet(M)* gene, and the *erm(B)* gene, which confers resistance to macrolides and is often found in these conjugative elements (56). The results showed a high prevalence of both genes in both groups, although they were significantly more prevalent in SPHS. The different combinations of the genes *intTn*, *erm(B)* and *tet(M)* and the phenotypical resistance to KAN and ERY were significantly more prevalent in SPHS, except for the combination of the genes *intTn*, *tet(M)* and the phenotypical resistance to ERY, which was more prevalent, though not statistically significant, in SSPD. The previously discussed differing prevalence of streptococcal species when comparing SPHS and SSPD might be the reason for these differences, given that the streptococci of this study showed different profiles of antibiotic resistance genes. These results suggest a high prevalence of transposons of the Tn916/1545 family in the tetracycline resistant oral microbiota of healthy subjects and patients with periodontitis.

Most of the tetracycline resistant isolates obtained in this study showed resistance to other antibiotics. Resistance to 2 antimicrobials besides tetracycline was the most common pattern, and a large part of this multidrug resistance was to KAN and ERY, which could be linked to the presence of the previously mentioned transposons (54). When assessing resistance to 6 different antimicrobials, a significant difference was found between groups where the SSPD group showed three times more isolates. Significant differences were also observed between the isolates for susceptibility to all the antimicrobials, where SPHS isolates showed two times higher susceptibility. Despite these differences, levels of multidrug resistance were high and similar in both populations, showing that tetracycline resistant subgingival microbiota is an important reservoir of antimicrobial resistance, which might be specially striking in subjects who have received little or no antibiotic therapy. The high prevalence of isolates resistant to antibiotics not commonly used, and therefore not exposed to selective pressure, might be due to the low fitness costs associated with the acquisition and maintenance of some mobile genetic elements that carry antibiotic resistance genes (57, 58).

As previously discussed, resistance to KAN and ERY was largely observed (Figure 1), while resistance to other antimicrobials was observed less frequently. Significant differences were found when testing KAN and CHL resistance between both types of populations. The former was observed to be more prevalent in SSPD isolates than in the SPHS isolates, where the contrary was observed for the latter. *Streptococcus* spp. and *Prevotella* spp. isolates might be accountable for these differences, since the *Prevotella* genus, which is known to show resistance to β -lactams and KAN (59), was twice as prevalent in SSPD compared to SPHS. On the other hand, the differences on CHL resistance might be due to the unequal distribution of CHL resistance among streptococcal species, resulting in different percentages of this resistance between both

populations (Table S1). The highest ratio of *P. intermedia* and *P. nigrescens* and the high prevalence of *S. constellatus* CTX-resistant in SSPD were determinant for the higher prevalence of CTX resistance in SSPD. Although the genus *Prevotella* is already known for its β -lactam resistance, high prevalence of CTX resistance among oral streptococci has not been previously reported, thus it might pose a serious health issue, even more when considering their multidrug resistance capabilities.

This study has demonstrated high prevalence of multidrug resistance and a variety of tetracycline resistance genes present in Spanish SPPDs and SPHSs. However, significant differences were detected between the two groups in terms of i) bacterial species resistant to tetracycline; ii) prevalence of the screened genes and iii) multidrug resistance profiles. Moreover, the presence of some *tet* genes was detected in certain bacterial genus, which had not been previously described. In conclusion, we found that in Spanish subjects, despite not having taken tetracycline for many years now, subgingival bacteria are a reservoir of tetracycline resistance genes and multidrug resistance, which, coupled with the high prevalence of conjugative transposons in the oral environment, might foster further increased spread of antimicrobial resistance.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to the all the volunteers that participated in the study and would also like to Ann Bangle for editing the manuscript.

BIBLIOGRAPHY

1. Grossman T.H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6:4. doi: 10.1101/cshperspect.a025387
2. Broom, L.J. (2017). The sub-inhibitory theory for antibiotic growth promoters. *Poult Sci.* 96:9, 3104–3108. doi: 10.3382/ps/pex114
3. Lu, L., Liu, J., Li, Z., Liu, Z., Guo, J., Xiao, Y., et al. (2018). Occurrence and Distribution of Tetracycline Antibiotics and Resistance Genes in Longshore Sediments of the Three Gorges Reservoir, China. *Front Microbiol.* 9:1911. doi: 10.3389/fmicb.2018.01911
4. Collins, J.R., Arredondo, A., Roa, A., Valdez, Y., León, R., Blanc, V. (2016). Periodontal pathogens and tetracycline resistance genes in subgingival biofilm of periodontally healthy and diseased Dominican adults. *Clin Oral Investig.* 20:2, 349–356. doi: 10.1007/s00784-015-1516-2
5. Villedieu, A., Diaz-Torres, M.L., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D.A., Wilson, M., et al. (2003). Prevalence of Tetracycline Resistance Genes in Oral Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3, 878–882. doi: 10.1128/AAC.47.3.878-882.2003
6. Herrera, D., Alonso, B., León, R., Roldán, S., Sanz, M. (2008). Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol.* 35, 45–66. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01260.x
7. Goodson, J.M., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Kent, R., Teles, R., Hasturk, H., et al. (2012). Control of periodontal infections: A randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. *J Clin Periodontol.* 39:6, 526–536. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01870.x
8. Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I., Roldán, S. (2002). A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 29:S3, 136–159. doi: 10.1034/j.1600-051X.29.s3.8.x
9. Olsvik, B., and Tenover, F.C. (1993). Tetracycline Resistance in Periodontal Pathogens. *Clin Infect Dis.* 16:S4, 310–313. doi: 10.1093/clinids/16.Supplement_4.S310
10. Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:2, 232–260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
11. Diaz-Torres, M.L., McNab, R., Spratt, D.A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M., et al. (2003). Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:4, 1430–1432. doi: 10.1128/AAC.47.4.1430-1432.2003
12. Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G.D. (2010). The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci.* 67:3, 419–431. doi: 10.1007/s00018-009-0172-6
13. Roberts, A.P., and Mullany, P. (2009). A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol.* 17:6, 251–258. doi: 10.1016/j.tim.2009.03.002
14. Long, K.S., and Vester, B. (2012). Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:2, 603–612. doi: 10.1128/AAC.05702-11
15. Diaz, P.I., Hoare, A., Hong, B-Y. (2016). Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *J Calif Dent Assoc.* 44:7,421–35.
16. Armitage, G.C. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol.* 4:1, 1–6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1

17. Caton, J.G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I.L.C., Jepsen, S., Kornman, K.S., et al. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 45:S20, S1–S8. doi: 10.1111/jcpe.12935
18. Syed, S.A., and Loesche, W.J. (1972). Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol.* 24:4, 638–44.
19. Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (27th ed). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
20. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2018). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0. https://eucast.org/clinical_breakpoints/
21. Gilbert, A. (2004). Local tetracycline is an effective adjunct in the treatment of chronic periodontitis. *Evid Based Dent.* 5:3, 67–67. doi: 10.1038/sj.ebd.6400275
22. Pavia, M., Nobile, C.G.A., Angelillo, I.F. (2003). Meta-Analysis of Local Tetracycline in Treating Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 74:6, 916–932. doi: 10.1902/jop.2003.74.6.916
23. Jung, D-Y., Park, J-C., Kim, Y-T., Yon, J-Y., Im, G-I., Kim, B-S., et al. (2012). The clinical effect of locally delivered minocycline in association with flap surgery for the treatment of chronic severe periodontitis: a split-mouth design. *J Clin Periodontol.* 39:8, 753–759. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01908.x
24. Inglesby, T.V., O’Toole, T., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., et al. (2002). Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA.* 287:17, 2236–2252. doi: 10.1001/jama.287.17.2236
25. Smith, M.D., Vinh, D.X., Nguyen, T.T., Wain, J., Thung, D., White, N.J. (1995). In vitro antimicrobial susceptibilities of strains of *Yersinia pestis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:9, 2153–2154. doi: 10.1128/aac.39.9.2153
26. Prohl, A., Lohr, M., Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Schroedl, W., et al. (2015). Evaluation of antimicrobial treatment in a bovine model of acute *Chlamydia psittaci* infection: tetracycline versus tetracycline plus rifampicin. *Pathog Dis.* 73:1, 1-12. doi: 10.1111/2049-632X.12212
27. Zaenglein, A.L., Pathy, A.L., Schlosser, B.J., Alikhan, A., Baldwin, H.E., Berson, D.S., et al. (2016). Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* 74:5, 945-973.e33. doi: 10.1016/j.jaad.2015.12.037
28. Carmeli, E., Kodesh, E., Nemcovsky, C. (2009). Tetracycline therapy for muscle atrophy due to immobilization. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 9:2, 81–88.
29. National Research Council (US), Committee on Drug Use in Food Animals. (1999). The use of drugs in food animals : benefits and risks. Washington, (DC): National Academy Press.
30. Ioannidis, I., Sakellari, D., Spala, A., Arsenakis, M., Konstantinidis, A. (2009). Prevalence of *tetM*, *tetQ*, *nim* and *bla_{TEM}* genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 36:7, 569–574. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01425.x
31. Abusleme, L., Dupuy, A.K., Dutzan, N., Silva, N., Burtson, J.A., Strausbaugh, L.D., et al. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 7:5, 1016–1025. doi: 10.1038/ismej.2012.174
32. Checchi, L., Gatto, M.R., Checchi, V., Carinci, F. (2016). Bacteria prevalence in a large Italian population sample: a clinical and microbiological study. *J Biol Regul Homeost Agents.* 30:S2,

- 199–208.
33. Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Rickard, A.H., Jakubovics, N.S., Chalmers, N.I., Diaz, P.I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000. 42:47–79. doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x
 34. Vieira Colombo, A.P., Magalhães, C.B., Hartenbach, F.A., Martins do Souto, R., Maciel da Silva-Boghossian, C. (2016). Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog*. 94, 27–34. doi:10.1016/j.micpath.2015.09.009
 35. Chávez de Paz, L., Svensäter, G., Dahlén, G., Bergenholtz, G. (2005). Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 100:2, 232–241. doi:10.1016/j.tripleo.2004.10.008
 36. Rams, T.E., Feik, D., Mortensen, J.E., Degener, J.E., van Winkelhoff, A.J. (2014). Antibiotic Susceptibility of Periodontal *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius* Clinical Isolates. *J Periodontol*. 85:12, 1792–1798. doi:10.1902/jop.2014.130291
 37. Abiko, Y., Sato, T., Mayanagi, G., Takahashi, N. (2010). Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodontal Res*. 45:3, 389–395. doi:10.1111/j.1600-0765.2009.01250.x
 38. Dhotre, S.V., Mehetre, G.T., Dharne, M.S., Suryawanshi, N.M., Nagoba, B.S. (2014). Isolation of *Streptococcus tigurinus* - a novel member of *Streptococcus mitis* group from a case of periodontitis. *FEMS Microbiol Lett*. 357:2, 131-135. doi:10.1111/1574-6968.12519
 39. Fine, D.H., Markowitz, K., Fairlie, K., Tischio-Bereski, D., Ferrendiz, J., Furgang, D., et al. (2013). A Consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* Is Present in Sites Prior to Bone Loss in a Longitudinal Study of Localized Aggressive Periodontitis. *J Clin Microbiol*. 51:9, 2850–2861. doi:10.1128/JCM.00729-13
 40. Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., Dewhirst, F.E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 43:11, 5721–5732. doi:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
 41. Zbinden, A., Bostanci, N., Belibasakis, G.N. (2015). The novel species *Streptococcus tigurinus* and its association with oral infection. *Virulence*. 6:3, 177–182. doi:10.4161/21505594.2014.970472
 42. Heller, D., Helmerhorst, E.J., Gower, A.C., Siqueira, W.L., Paster, B.J., Oppenheim, F.G. (2016). Molecular Characterization of the Microbial Diversity in the Early, *In Vivo*-Formed, Dental Biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 82:6, 1881-1888. doi:10.1128/AEM.03984-15
 43. Kirst, M.E., Li, E.C., Alfant, B., Chi, Y-Y., Walker, C., Magnusson, I., et al. (2015). Dysbiosis and Alterations in Predicted Functions of the Subgingival Microbiome in Chronic Periodontitis. *Appl Environ Microbiol*. 81:2, 783–793. doi:10.1128/AEM.02712-14
 44. García López, E., and Martín-Galiano, A.J. (2020). The Versatility of Opportunistic Infections Caused by *Gemella* Isolates Is Supported by the Carriage of Virulence Factors From Multiple Origins. *Front Microbiol*. 11:524. doi:10.3389/fmicb.2020.00524
 45. Larsen, J.M. (2017). The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 151:4, 363–374. doi:10.1111/imm.12760
 46. de Aquino, S.G., Abdollahi-Roodsaz, S., Koenders, M.I., van de Loo, F.A.J., Pruijn, G.J.M., Marijnissen, R.J., et al. (2014). Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune Experimental Arthritis by Inducing a TLR2- and IL-1-Driven Th17 Response. *J Immunol*. 192:2, 4103–4111. doi:10.4049/jimmunol.1301970

47. Arredondo, A., Álvarez, G., Nart, J., Mor, C., Blanc, V., León, R.. (2019). Detection and expression analysis of *tet(B)* in *Streptococcus oralis*. *J Oral Microbiol.* 11:1. doi:10.1080/20002297.2019.1643204
48. Warburton, P.J., Ciric, L., Lerner, A., Seville, L.A., Roberts, A.P, Mullany, P., et al. (2013). TetAB(46), a predicted heterodimeric ABC transporter conferring tetracycline resistance in *Streptococcus australis* isolated from the oral cavity. *J Antimicrob Chemother.* 68:1, 17–22. doi:10.1093/jac/dks351
49. Kim, S-M., Kim, H.C., Lee, S-WS. (2011). Characterization of antibiotic resistance determinants in oral biofilms. *J Microbiol.* 49:4, 595–602. doi:10.1007/s12275-011-0519-1
50. Lancaster, H., Bedi, R., Wilson, M., Mullany, P. (2005). The maintenance in the oral cavity of children of tetracycline-resistant bacteria and the genes encoding such resistance. *J Antimicrob Chemother.* 56:3, 524–531. doi:10.1093/jac/dki259
51. Seville, L.A., Patterson, A.J., Scott, K.P., Mullany, P., Quail, M.A., Parkhill, J., et al. (2009). Distribution of Tetracycline and Erythromycin Resistance Genes Among Human Oral and Fecal Metagenomic DNA. *Microb Drug Resist.* 15:3, 159–166. doi:10.1089/mdr.2009.0916
52. Diaz-Torres, M.L., Villedieu, A., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D.A., Allan, E., et al. (2006). Determining the antibiotic resistance potential of the indigenous oral microbiota of humans using a metagenomic approach. *FEMS Microbiol Lett.* 258:2, 257–262. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00221.x
53. Roberts, A.P., Cheah, G., Ready, D., Pratten, J., Wilson, M., Mullany, P. (2001). Transfer of Tn916-Like Elements in Microcosm Dental Plaques. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:10, 2943–2946. doi:10.1128/AAC.45.10.2943-2946.2001
54. Cochetti, I., Fili, E., Mingoia, M., Varaldo, P.E., Montanari, M.P. (2008). *erm(B)*-Carrying Elements in Tetracycline-Resistant Pneumococci and Correspondence between Tn1545 and Tn6003. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:4, 1285–1290. doi:10.1128/AAC.01457-07
55. Roberts, A.P., and Mullany, P. (2011). Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 35:5, 856–871. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00283.x
56. Santoro, F., Vianna, M.E., Roberts, A.P. (2014). Variation on a theme; an overview of the Tn916/Tn1545 family of mobile genetic elements in the oral and nasopharyngeal streptococci. *Front Microbiol.* 5:535. doi:10.3389/fmicb.2014.00535
57. Pallecchi L, Bartoloni A, Paradisi F, Rossolini GM. 2008. Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6:725–732.
58. Roberts, A.P., and Mullany, P. (2010). Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 8:12, 1441–1450. doi:10.1586/eri.10.106
59. Holbrook, W.P., Ogston, S.A., Ross, P.W. (1978). A method for the isolation of *Bacteroides melaninogenicus* from the human mouth. *J Med Microbiol.* 11:2, 203–207. doi:10.1099/00222615-11-2-203
60. Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol.* 67:1, 22–32. doi:10.1128/AEM.67.1.22-32.2001
61. Warburton, P.J., Palmer, R.M., Munson, M.A., Wade, W.G. (2007). Demonstration of in vivo transfer of doxycycline resistance mediated by a novel transposon. *J Antimicrob Chemother.* 60:5, 973–980. doi:10.1093/jac/dkm331
62. Melville, C.M., Scott, K.P., Mercer, D.K., Flint, H.J. (2001). Novel Tetracycline Resistance

- Gene, *tet(32)*, in the *Clostridium*-Related Human Colonic Anaerobe K10 and Its Transmission In Vitro to the Rumen Anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:11, 3246–3249. doi:10.1128/AAC.45.11.3246-3249.2001
63. Ng, L-K., Martin, I., Alfa, M., Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes.* 15:4,209–215. doi:10.1006/mcpr.2001.0363
64. Manch-Citron, J.N., Lopez, G.H., Dey, A., Rapley, J.W., MacNeill, S.R., Cobb, C.M. (2000). PCR monitoring for tetracycline resistance genes in subgingival plaque following site-specific periodontal therapy. A preliminary report. *J Clin Periodontol.* 27:6, 437–46. doi:10.1034/j.1600-051x.2000.027006437.x
65. Bojesen, A.M., Bager, R.J., Ifrah, D., Aarestrup, F.M. (2011). The rarely reported *tet(31)* tetracycline resistance determinant is common in *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol.* 149(3-4), 497–499. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.015
66. Shigematsu, T., Hayashi, M., Kikuchi, I., Ueno, S., Masaki, H., Fujii, T. (2009). A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment. *FEMS Microbiol Lett.* 293:2, 240–247. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01536.x

Table 1. List of primers used in this study.

Primers	Sequence 5'-3'	Size (bp)	Tm	Tm Multiplex	Multiplex group	Ref.
tetMF	GCG TAC AAG CAC AGA CTC GT	1142	61			(4)
tetMR	AGC CAT AGC GTA TCC CCT CC					
tetWF	GAG AGC CTG CTA TAT GCC AGC	168	64	64	1	(60)
tetWR	GGG CGT ATC CAC AAT GTT AAC					
intF	GGC TAC AGA CCG AGT ACC AGC	684	61			(4)
intR	GGA ACT TGA CGT TCG CCA CT					
ermBF	GGT AAA GGG CAT TTA ACG AC	494	55			(61)
ermBR	CGA TAT TCT CGA TTG ACC CA					
tetQF	AGA ATC TGC TGT TTG CCA GTG	167	50	60	2	(60)
tetQR	CGG AGT GTC AAT GAT ATT GCA					
tet32F	GAA CCA GAT GCT GCT CTT	620	57			(62)
tet32R	CAT AGC CAC GCC CAC ATG AT					
tetLF	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC	267	55			(63)
tetLR	GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG					
tetOF	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC	515	55			(64)
tetOR	TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA					
tetSF	GAA AGC TTA CTA TAC AGT AGC	168	50	58	3	(60)
tetSR	AGG AGT ATC TAC AAT ATT TAC					
tet31F	CAA TCA CGC CCA AAA GAA	564	53			(65)
tet31R	TGT GCC ATC CCA GTT TGT					
tetBF	AAT AGC CAC TAA ATG GGG CG	243	58			(4)
tetBR	ATA ACA CCG GTT GCA TTG GT					
tetKF	TCG ATA GGA ACA GCA GTA	169	52.8	56.5	4	(63)
tetKR	CAG CAG ATC CTA CTC CTT					
tet37F	ATG GTT CGC TAT TAC TCT AAC	170	50			(4)
tet37R	ATC AGT CTC ATA TTT CGA CA					
27F	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	approx. 1500	57	-	-	(66)
1544R	AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC					

Table 2. Genera identified from SPHS and SSPD and the number of isolates carrying each antimicrobial resistance gene and their phenotypical resistance. The asterisk indicates significant differences between SPHS and SSPD isolates. AMX: amoxicillin, CTX: cefoxime, CHL: chloramphenicol, STR: streptomycin, ERY: erythromycin, KAN: kanamycin.

Genera	N	Antimicrobial resistance genes										Antimicrobial resistance								
		<i>int1</i>	<i>tn</i>	<i>tet(W)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(S)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(37)</i>	<i>ter(K)</i>	<i>erm(B)</i>	AMX	CTX	CH	STR	ERY	KA	
<i>Actinomyces</i> sp.	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>Bacteroides</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	2	2
<i>Genella</i> sp. *	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	2
<i>Granulicatella</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lachnospira</i> sp.	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	0	2	2	2
<i>Mogibacterium</i> sp.	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
<i>Neisseria</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0
<i>Peptoniphilus</i> sp.	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella</i> sp. *	48	16	0	0	3	0	18	7	0	0	27	0	2	3	28	36	2	15	24	42
<i>Proteus</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pseudomonas</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2
<i>Rothia</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
<i>Stacta</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> sp.	276	248	0	18	116	0	31	0	12	0	3	0	0	128	20	56	29	48	188	271
<i>Veillonella</i> sp.	6	6	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	4	0	4	5	2
Not identified	10	2	0	0	2	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	2	1	1	3	4
<i>Abiotrophia</i> sp.	5	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	5	2
<i>Bacillus</i> sp.	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>Butyrivibrio</i> sp.	4	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	2	1	4
<i>Eubacterium</i> sp.	3	2	1	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	3	3
<i>Genella</i> sp. *	13	13	1	0	8	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	4	0	5	4
<i>Granulicatella</i> sp.	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Haemophilus</i> sp.	4	2	1	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	4	1
<i>Neisseria</i> sp.	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	2	0
<i>Prevotella</i> sp. *	25	0	0	0	0	0	1	3	0	0	16	0	1	0	16	15	4	13	18	22
<i>Rothia</i> sp.	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
<i>Staphylococcus</i> sp.	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	3	3	2	3	4	0
<i>Streptococcus</i> sp.	340	305	44	42	250	0	12	2	0	1	5	0	0	218	39	12	68	59	227	283
<i>Veillonella</i> sp.	12	11	5	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	5	2	4	12	6
Not identified	27	24	3	0	17	0	0	0	0	0	3	0	0	7	0	3	7	27	20	20

SSPD

SPHS

Table 3. Number of isolates resistant to other antimicrobials. The asterisk indicates significant differences between SPHS and the SSPD isolates. In parentheses, the percentage of isolates over the total number of isolates from each population.

Number of other antimicrobials	SPHS isolates (%)		SSPD isolates (%)	
0*	48	(10.71)	21	(5.75)
1	82	(18.30)	68	(18.63)
2	179	(39.96)	140	(38.36)
3	93	(20.76)	77	(21.10)
4	31	(6.92)	37	(10.14)
5	12	(2.68)	13	(3.56)
6*	3	(0.67)	9	(2.47)

Figure 1. Prevalence (%) of *tet*, *int* and *erm(B)* genes and the prevalence (%) of subgingival isolates resistant to different antimicrobials (KAN: kanamycin, ERY: erythromycin, STR: streptomycin, CHL: Chloramphenicol, AMX: Amoxicillin, CTX: cefotaxime). The asterisk indicates significant differences between SPHS and SSPD isolates.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
 TERMS AND CONDITIONS
 Aug 03, 2020

This Agreement between Mr. Alexandre Arredondo ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4881390586587
License date	Aug 03, 2020
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Oral Diseases
Licensed Content Title	Azithromycin and erythromycin susceptibility and macrolide resistance genes in <i>Prevotella</i> from patients with periodontal disease
Licensed Content Author	Rubén León, José Nart, Carolina Mor, et al
Licensed Content Date	Feb 7, 2019
Licensed Content Volume	25
Licensed Content Issue	3
Licensed Content Pages	8
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title	Prevalencia y caracterización de genes de resistencia a antibióticos en bacterias orales
Institution name	Universitat Autònoma de Barcelona
Expected presentation date	Nov 2020
	Mr. Alexandre Arredondo Ronda Can Fatjó 10
Requestor Location	Cerdanyola del Valles, 08290 Spain Attn: Mr. Alexandre Arredondo
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions

apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest

to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not

operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\)License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Aug 03, 2020

This Agreement between Mr. Alexandre Arredondo ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4881390852247
License date	Aug 03, 2020
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Clinical Oral Invstigations
Licensed Content Title	Resistance to β -lactams and distribution of β -lactam resistance genes in subgingival microbiota from Spanish patients with periodontitis
Licensed Content Author	Alexandre Arredondo et al
Licensed Content Date	Jun 3, 2020
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	50000 or greater
Author of this Springer Nature content	yes
Title	Prevalencia y caracterización de genes de resistencia a antibióticos en bacterias orales
Institution name	Universitat Autònoma de Barcelona
Expected presentation date	Nov 2020
Requestor Location	Mr. Alexandre Arredondo Ronda Can Fatjó 10
	Cerdanyola del Valles, 08290 Spain Attn: Mr. Alexandre Arredondo
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Springer Nature Customer Service Centre GmbH
Terms and Conditions

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

1. Grant of License

1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.
2. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).
3. If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Scope of Licence

1. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.
2. A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.
3. Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
4. Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
5. An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

• Duration of Licence

1. A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months
Presentations	12 months
Books and journals	Lifetime of the edition in the language purchased

- **Acknowledgement**

1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

- **Restrictions on use**

1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.
2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.
3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

- **Ownership of Rights**

1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

- **Warranty**

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- **Limitations**

1. **BOOKS ONLY:** Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).

- **Termination and Cancellation**

1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).
2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

Appendix 1 — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc) [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.2

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.