

Resistencia a la Amoxicilina y producción de betalactamasas de cepas de *Streptococcus mutans* aislados de pacientes sanos, que acuden a tratamiento endodóntico en la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana



**KARINA AGUILAR VILLA
LAURA GÓMEZ MEJÍA**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
BACTERIOLOGA**

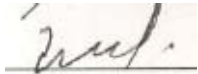


**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA DE BACTERIOLOGIA
Bogotá D.C.
Mayo 18 de 2012.**


Resistencia a la Amoxicilina y producción de betalactamasas de cepas de *Streptococcus mutans* aislados de pacientes sanos, que acuden a tratamiento endodóntico en la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana

**KARINA AGUILAR VILLA
LAURA GÓMEZ MEJÍA**

APROBADO



**DR. HUGO DIEZ ORTEGA, PhD
BACTERIÓLOGO
DIRECTOR**



**DRA. ALBA ALICIA TRESPALACIOS, PhD
BACTERIÓLOGA
JURADO**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por la fortaleza y sabiduría que nos brindó durante el desarrollo de este trabajo.
- A nuestros padres y hermanos, por su apoyo, amor incondicional y por motivarnos para continuar con nuestras metas a pesar de los momentos difíciles.
- A Dr. Hugo Diez, por su excelente dirección, apoyo, conocimiento, compromiso y confianza, que nos brindó en todo momento.
- A Dr. Margarita Chaves por su compromiso, conocimiento y apoyo incondicional, su confianza, sus palabras de aliento y amor que nos brindó desde el inicio hasta el final de este trabajo.
- A nuestras amigas que ocupan un lugar en nuestro corazón pues fueron de vital importancia en este proceso. Gracias por su paciencia, amor, amistad, y compañía.
- Al Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) por permitirnos desarrollar nuestra tesis, a la Dr. Azucena Arévalo por su guía y apoyo en el laboratorio.
- A la Pontificia Universidad Javeriana por proporcionarnos las condiciones necesarias para desarrollar nuestras metas.

Contenido

RESUMEN	7
1. JUSTIFICACION-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
2.INTRODUCCIÓN	8
3.MARCO TEORICO	9
4.OBJETIVOS	11
4. 1 Objetivo general.....	11
4. 2 Objetivos específicos.....	11
5.METODOLOGÍA	11
5. 1 Muestra	11
5.2 Aislamiento e identificación de <i>S. mutans</i>	11
5.3 Prueba de resistencia	11
5.4 Detección de la enzima betalactamasa.....	11
6. Resultados	12
6.1 Aislamiento e identificación de <i>S. mutans</i>	12
6. 2 Prueba de resistencia	13
7. Discusión.....	14
8. Conclusión y Recomendaciones.....	15
9. Referencias Bibliográficas.....	15

RESUMEN

La cavidad oral constituye el reservorio natural de alrededor de 300 especies bacterianas dentro de ellos los estreptococos como *S. mutans*, bacteria inicialmente considerada no patógena y sensible a los antibióticos. Actualmente, está implicada en procesos locales y sistémicos que pueden comprometer la vida del paciente y se observa un incremento en la resistencia a antibióticos como la amoxicilina, antibiótico que es utilizado de rutina en la mayoría de protocolos estandarizados para infecciones odontogénicas. **Objetivo:** Identificar la resistencia a la amoxicilina a través de la producción de betalactamasas, en cepas de *S. mutans* aislados de cavidad oral en individuos sistémicamente sanos. **Métodos:** 150 cepas de *S. mutans* aisladas de individuos sanos fue evaluada su sensibilidad ante amoxicilina según normas CLSI utilizando una concentración de antibiótico de 10 µg. Aquellas cepas que fueron resistentes se les determinó la producción de betalactamasas por el método cefalosporina cromógena nitrocefina. **Resultados:** 0.75% de las cepas aisladas mostraron resistencia a la amoxicilina, no asociada a producción de betalactamasas. **Conclusión:** Las cepas de *S. mutans* aisladas de individuos sanos presentan un bajo índice de resistencia bacteriana a la amoxicilina no asociado a producción de betalactamasas. Futuras investigaciones sobre mecanismos de resistencia de los estreptococos de la cavidad bucal son necesarias para conocer las posibilidades futuras de resistencia a estos medicamentos.

Palabras Claves: Resistencia bacteriana, *Streptococcus mutans*, amoxicilina, betalactamasas.

Resistance of *Streptococcus mutans* to amoxicillin and beta-lactamase production.

Abstract:

The oral cavity is the natural reservoir of about 300 bacterial species within them as *S. mutans* streptococci, bacteria initially considered non-pathogenic and sensitive to antibiotics. *S. mutans* is involved in local and systemic processes that can compromise the patient's life and there was an increase in resistance to antibiotics such as amoxicillin, an antibiotic that is used routinely in all standardized protocols for dental infections. **Objective:** To identify resistance to amoxicillin by production of beta-lactamases in strains of *S. mutans* isolated from oral cavity in individuals systemically healthy. **Methods:** 150 strains of *S. mutans* isolated from systemically healthy individuals evaluated their sensitivity to amoxicillin, according to CLSI standards concentration 10,0 µg. The lactamase production by chromogenic cephalosporin nitrocefin method was determined in resistant strains. **Results:** 0.75% of the isolates showed resistance to amoxicillin, not associated with beta-lactam production. **Conclusion:** The strains of *S. mutans* isolated from healthy individuals show a low rate of bacterial resistance to amoxicillin not associated with beta-lactamase production. Future research on resistance mechanisms of streptococci from the oral cavity are necessary to understand the future possibilities of resistance to these drugs.

Keywords: Bacterial resistance, *Streptococcus mutans*, Amoxicillin, beta-lactamase

1. JUSTIFICACION-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento de la resistencia a antibióticos que presentan las bacterias dentro de ellas los microorganismos que no presentaban estos comportamientos como los de cavidad oral, se constituye en uno de los nuevos problemas en salud pública, razón por la cual es necesario analizar y evaluar los protocolos odontológicos para el uso de antibióticos con el fin de tratar de disminuir la refractariedad a los tratamientos. El desarrollo de resistencia a los antibióticos en la comunidad de individuos sanos incluye un amplio espectro de factores como son el uso inadecuado, dosificación incorrecta, masificación de antibióticos en productos alimenticios del área agroveterinaria, la automedicación y la propagación de bacterias resistentes facilitada por el hacinamiento, saneamiento e higiene deficientes (Rodríguez, *et al.*, 2009). La cavidad oral constituye un reservorio de especies bacterianas que implican el desarrollo de diferentes patologías odontogénicas en procesos sistémicos tales como mediastinitis, abscesos cerebrales, sepsis y endocarditis bacteriana en pacientes con elementos prótesis valvulares, fácilmente colonizables por bacterias como *S. mutans* entre otros (Maruyama, *et al.*, 2009). En estos procesos el odontólogo debe formular antibióticos siendo la Amoxicilina el antibiótico de primera elección. Sin embargo, diferentes estudios clínicos reportan resistencia del microorganismo al antibiótico tradicionalmente sensibles como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Acinetobacter baumannii* y microorganismos que tradicionalmente eran sensibles como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* habitantes de la cavidad oral (Klimiene, *et al.*, 2011). La resistencia a Amoxicilina está caracterizada por la presencia de betalactamasas razón por la cual se tienen como alternativas antibióticas Amoxicilina unida a ácido clavulónico y segunda instancia Clindamicina. Sin embargo, el cambiar de antibiótico no debe ser la alternativa a utilizarse pues esto podría generar nuevas resistencias ya sea a betalactámicos de segunda o tercera generación. Este riesgo es agravado debido a que la resistencia se ha observado en la comunidad y no en infecciones intrahospitalarias, motivo por el cual es importante detectar la presencia del microorganismo y su resistencia en la población ambulatoria que potencialmente puede acudir a la prestación de servicios odontológicos. Con el fin de evaluar protocolos de prevención y justificar la formulación de amoxicilina para el tratamiento y la profilaxis en infecciones donde se encuentra involucrado el *S. mutans*, es importante conocer dentro de la población sana la presencia de cepas resistentes a Amoxicilina y caracterizar la producción de betalactamasas, aspecto que será abordado en esta investigación.

2. INTRODUCCIÓN

La resistencia antibiótica es un problema de salud pública que requiere iniciativas y medidas para disminuir su incremento cada vez mas alarmante. Dentro de los factores que globalizan la resistencia antibiótica están las migraciones, el comercio y los viajes que facilitan la propagación de bacterias y residuos de antibióticos entre diferentes poblaciones, países y continentes. Entre los factores que influyen en el desarrollo de resistencia a los antibióticos en la comunidad podemos citar el uso inadecuado de antibióticos, la autoformulación, dosificación incorrecta, uso intensivo de antibióticos en el sector veterinario, la ganadería y la agricultura, antibióticos de baja calidad, comercialización y rentabilidad por la industria farmacéutica, y la propagación de bacterias resistentes facilitada por el

hacinamiento, saneamiento e higiene deficientes (Rodríguez, *et al.*, 2009). Estos factores hacen que la bacteria tenga contacto con el antibiótico y se estimule la producción de los mecanismos de resistencia. Entre ellos podemos citar la inhibición enzimática, la alteración de sitios de unión de la molécula blanco y/o proteínas ligadoras de penicilinas, la restricción de la entrada del antibiótico a la célula, y la expulsión activa del antibiótico de la célula entre otros. Todos estos mecanismos conllevan así a la refractariedad del tratamiento en el paciente incluyendo los tratamientos para las infecciones odontológicas (Segura, *et al.*, 2010)

A nivel odontológico, la cavidad oral constituye un reservorio de especies bacterianas que implican riesgos de abscesos dentoalveolares crónicos o agudos que al progresar invaden espacios vecinos que comprometen la vida del paciente. Dentro de la flora oral se encuentra el *S. mutans* uno de los elementos etiológicos de la triada de Keyes necesarios para la producción de caries pero que igualmente ha sido asociado a otras patologías como mediastinitis, abscesos cerebrales, sepsis y endocarditis (Maruyama, *et al.*, 2009). En los procesos orales como pulpitis irreversible, abscesos dentoalveolares agudos ó crónicos, pericoronitis, entre otros, además de la eliminación de la causa, el odontólogo debe iniciar antibióticoterapia que permita la resolución del proceso infeccioso. La amoxicilina ha demostrado un buen espectro de actividad dada su potencia relativa. Sin embargo, el temor de su uso es el desarrollo de resistencia bacteriana lograda por dosis muy bajas, y la posibilidad de transmisión horizontal inter o intraespecie, constituyen un serio problema en la cavidad oral (Weerasuriya, *et al.*, 2010).

Sabiendo que los protocolos odontológicos en la práctica clínica se fundamentan en el uso de amoxicilina, que *S. mutans* resistente está presente en diversas infecciones odontogénicas y sistémicas así como en individuos sanos, el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) ve como necesidad verificar la presencia del microorganismo en la población flotante que acude a consulta odontológica en la Pontificia Universidad Javeriana; evaluar la resistencia a la concentración estandar de antibiótico utilizada en los tratamientos, y empezar a explorar al menos por uno de los posibles mecanismos de resistencia involucrados como es la producción de betalactamasas. Estos datos servirán para analizar la necesidad de evaluar la formulación de amoxicilina para el tratamiento y la profilaxis en infecciones donde se encuentra involucrado el *S. mutans*. Al determinar la producción de betalactamasas, se tendrán herramientas sólidas para fundamentar la terapéutica actual con inhibidores de betalactamasas o solicitar cambio por otras alternativas antibióticas. Debe aclararse que este trabajo se efectúa en paralelo con otros trabajos que investigan en *S. mutans* la inducción de la resistencia a dosis subclínicas y análisis molecular de las PBPs así como la resistencia de otros microorganismos importantes en infecciones odontogénicas como Enterococos en Endodoncia y *Porphyromonas* en patologías orales.

3. MARCO TEORICO

Los estreptococos del grupo viridans son bacterias habitantes normales de la cavidad bucal humana, formando parte de la placa bacteriana o biofilm dental. Cumplen un importante papel como flora comensal que previene la colonización de patógenos potenciales al competir metabólicamente con ellos por sustratos, mantienen el equilibrio de la flora normal y bloquean receptores celulares para patógenos orales. Dentro del grupo viridans se encuentran los estreptococos del grupo mutans que a su vez incluyen las especies *S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. sobrinus*, *S. ferus*, *S. downei* y *S. macacae* que son un grupo de bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, agrupadas en parejas o cadenas, con la capacidad de producir ácido láctico a través de la fermentación de la glucosa. Su importancia clínica está ligada a su capacidad patogénica de adherirse a superficies, ser acidogénica especialmente para ácido láctico, acidúrico que resiste las disminuciones de pH subsecuentes, contribuyendo a la formación de placa dentobacteriana, desmineralización y el desarrollo del evento cariogénico. En su estructura antigénica hay que destacar que posee polisacáridos parietales y proteínas asociadas a la mureina conocida como proteína de adherencia celular (PAC). Estas proteínas son adhesinas que interactúan con receptores de la película adquirida y glucosiltransferasas y receptoras de glucanos en fenómenos agregativos y coagregativos entre bacterias que colonizan los dientes. Adicionalmente, están involucrados en procesos infecciosos como gingivitis, abscesos periapicales, pulpitis, celulitis y, a nivel sistémico, en procesos de endocarditis infecciosa cuando se produce su diseminación por vía hematogena desde un foco infeccioso en la cavidad oral (Liébana, Rodríguez, 2002). El tratamiento de

las infecciones odontogénicas se fundamenta en dos pilares: el mecánico-quirúrgico y la antibioticoterapia. Tradicionalmente se aplican tratamientos antibióticos de forma empírica, basados en el cuadro clínico que presenta el paciente y su gravedad. Esto ha supuesto que los tratamientos han sido en muchas ocasiones inadecuados, lo cual ha comportado la aparición de microorganismos resistentes o incluso multiresistentes a los antibióticos (Dubreil,1994). Los antibióticos de elección para estos tratamientos empíricos son los betalactámicos: Amoxicilina, Amoxicilina- clavulánico y como alternativa Clindamicina. (Rodríguez,*et al.*,2009). Sin embargo, la amoxicilina, presenta buena actividad frente a patógenos aerobios facultativos y anaerobios por lo que se considera el antibiótico de elección en las infecciones de la cavidad bucal. (Rodríguez,*et al.*,2009) y dado que la amoxicilina, presenta un espectro mayor que la penicilina y una mejor absorción entérica que la ampicilina y su asociación con un inhibidor de betalactamasas como el ácido clavulánico muestran una gran actividad bactericida, ha pasado a ser el fármaco de elección en un gran número de estos procesos infecciosos (Mainjot,*et al.*,2009, Segura,*et al.*, 2010).

S. mutans tradicionalmente ha sido considerado como sensible a antibióticos betalactámicos, sin embargo, a nivel mundial, se ha venido informando en cepas del grupo viridans, al cual pertenece el *S. mutans*, un aumento en la resistencia a diversos antibióticos entre ellos a la Amoxicilina penicilina (esto es, CIM > 4µg/mL) (Lee y col, 1998). En Colombia son pocos los estudios que se han realizado y no existe reportes registrados que permitan conocer la realidad nacional y magnitud del problema a nivel de Salud Oral. Las bacterias han desarrollado resistencia al antibiótico ya sea por factores intrínsecos como la transferencia entre células bacterianas de genes determinantes o por factores extrínsecos que inducen la resistencia como es la presión de selección que ejercen los antibióticos que permiten la supervivencia de cepas resistentes que portan genes de resistencia. Aunque existe un número de más de 900 β lactamasas todas presentan como dato común la hidrólisis del anillo β lactámico (Julian,*et al.*,2010). Las bacterias productoras de betalactamasa se aíslan cada vez con mayor frecuencia en infecciones odontogénicas de pacientes que han recibido previamente tratamiento con betalactámicos, y cuanto mayor es la duración de tales tratamientos, mayor es el número de cepas bacterianas resistentes aisladas (Rodríguez,*et al.*,2009). Otro mecanismo es modificar la diana del antibiótico a nivel de un aminoácido generando un blanco diferente y así disminuyen la afinidad de unión por el antimicrobiano. En el caso de *S.mutans* y Amoxicilina hay modificación de PBP (penicillin-binding-protein) que es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias. Si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los beta-lactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos (Gaetti,*et al.*,2007). Debemos considerar la importancia que tienen en la práctica diaria los distintos tipos y mecanismos de resistencia que presenta *S. mutans* frente a amoxicilina, y tenerlos en cuenta a la hora de instaurar un tratamiento odontológico debido a que las bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, y costos clínicos. Igualmente, el problema de la resistencia al antibiótico es la refractariedad que las personas sanas de la comunidad pueden presentar en un futuro cuando están siendo tratados ante una infección odontogénica o en caso extremo cuando por consecuencia del proceso dental invasivo y teniendo un factor de riesgo desarrollan endocarditis infecciosa (EI). Si bien los lineamientos para la prevención y tratamientos de la E.I relacionada a factores odontológicos han sido definidos por sociedades médicas como la American Heart Association (AHA), la Sociedad Europea de Cardiología (ESC), la Sociedad Española de Cardiología (SEC) y las asociaciones de cardiología en cada uno de los países, estos lineamientos empiezan a ser reevaluados debido al impacto clínico que está produciendo la presencia de cepas resistentes dentro de la flora normal y transitoria en boca, como a la capacidad de las bacterias sensibles de adquirir mecanismos de resistencia antibiótica a través de los diferentes mecanismos de transferencia genética (Carmona, 2003, Wilson, 2007). Es por ello, que para poder evaluar el verdadero impacto de la resistencia antibiótica a *S.mutans* en cavidad oral es necesario empezar determinando la presencia de *S.mutans* amoxicilino resistente en población saludable para hacer una aproximación hacia la realidad nacional en Colombia, determinar en las cepas aisladas el tipo y grado de resistencia con el fin de formular recomendaciones especiales para mejorar la prevención y tratamiento a seguirse en pacientes portadores que acuden a citas odontológicas de manera habitual, objetivo que será evaluado por el grupo del Centro de Investigaciones odontológicas (CIO) en cepas de *S.mutans* aisladas de una población de adultos sanos que asisten a consulta odontológica en las clínicas de la facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ).

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar la frecuencia de *S.mutans* resistente a la amoxicilina en un grupo de individuos sanos que acuden a consulta odontológica en la facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana

4.2 Objetivos específicos

- Identificar microbiológicamente *Streptococcus mutans* en cavidad oral de un grupo de individuos sanos que acuden a consulta odontológica en la facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana.
- Determinar la frecuencia de cepas *Streptococcus mutans* resistentes a la amoxicilina.
- Evaluar la producción de betalactamasas en las cepas de *Streptococcus mutans* resistentes a Amoxicilina.

5.METODOLOGÍA

5.1 Muestra

Se realizó un estudio de tipo observacional descriptivo en el que se utilizaron 150 muestras provenientes de mucosa oral de individuos sanos, que acudieron a tratamiento endodóntico en la Facultad de Odontología; que no se encontraban en tratamiento con antibióticos y aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

5.2 Aislamiento e identificación de *S. mutans*

A cada individuo se le tomó muestra de la mucosa oral con un escobillón estéril, y se utiliza como medio de transporte caldo tioglicolato. El aislamiento se realizó en Agar Mitis Salivarius con Bacitracina y Telurito de potasio, incubado durante 48 horas a 37°C en atmósfera anaerobia. De las 150 muestras aisladas en agar Mitis Salivarius se observó crecimiento presuntivo de *Streptococcus mutans* en 123 de ellas y 27 muestras no presentaron colonias sugestivas de *S.mutans*. De las 123 sugestivas se tomaron 4 colonias de cada uno, quedando así un total de 492 colonias sugestivas de *S.mutans*. A cada una de estas 492 se les realizó pruebas bioquímicas como Inulina, Sorbitol, Rafinosa, Manitol y Esculina para identificar *S.mutans*.

5.3 Prueba de resistencia

De las 492 analizadas se efectuó prueba de resistencia a la amoxicilina a 400 colonias que fueron identificadas como *S.mutans*. Cada colonia de un cultivo de dos días de incubación, se sembró masivamente en medio Agar Mueller-Hinton y se aplicó un disco de papel de filtro (6mm), de amoxicilina de 10 microgramos(OXOID). Se incubaron a 37oC durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se estableció la resistencia mediante la formación de un halo de inhibición alrededor del disco de amoxicilina, donde un halo menor a 7 mm se consideró como resistencia, un halo entre 10 y 18 mm se consideró intermedio y un halo mayor a 18 mm se consideró sensible, lo cual indicaba ausencia de crecimiento bacteriano.

5.4 Detección de la enzima betalactamasa

A aquellas cepas que dieron resistentes a la prueba anterior se les realizó la detección de la enzima betalactamasa mediante disco rehidratado de Taxo Cefinasa (Becton Dickinson).

Análisis de resultados:

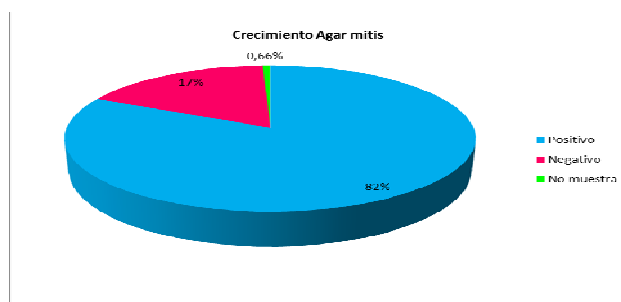
Los datos tabulados se presentan de manera descriptiva y en porcentajes. Estableciendo frecuencias relativas y absolutas para resistencia, sensibilidad, producción de betalactamasas teniendo en cuenta la identificación de *S.mutans* y su producción de betalactamasas.

6. Resultados

6.1 Aislamiento e identificación de *S. mutans*.

Tabla1. Identificación presuntiva de *S.mutans*: se evidencia que de las 150 muestras sembradas el 82% (123) tuvo crecimiento en Agar Mitis salivarius; mientras que el 17% (26) de 150 muestras no crecieron el 0.66% (1)

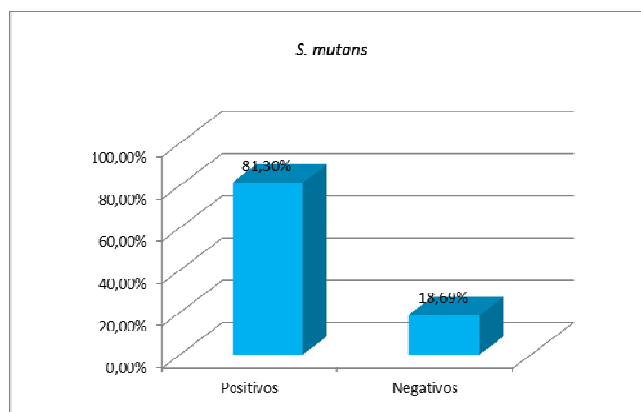
Muestras Positivas	123	82%
Muestras Negativas	26	17%
No Muestras	1	0,66%



Gráfica 1. Crecimiento presuntivo de *Streptococcus mutans* en agar Mitis Salivarius.

Tabla2. Identificación confirmatoria de *S.mutans*: se observa la identificación de cepas *Streptococcus mutans* a partir de 492 colonias mediante pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas		Cepa <i>Streptococcus mutans</i>
Inulina, sorbitol, bilis esculina, Manitol	Positivo (400)	81,30%
	Negativas(92)	18,69%



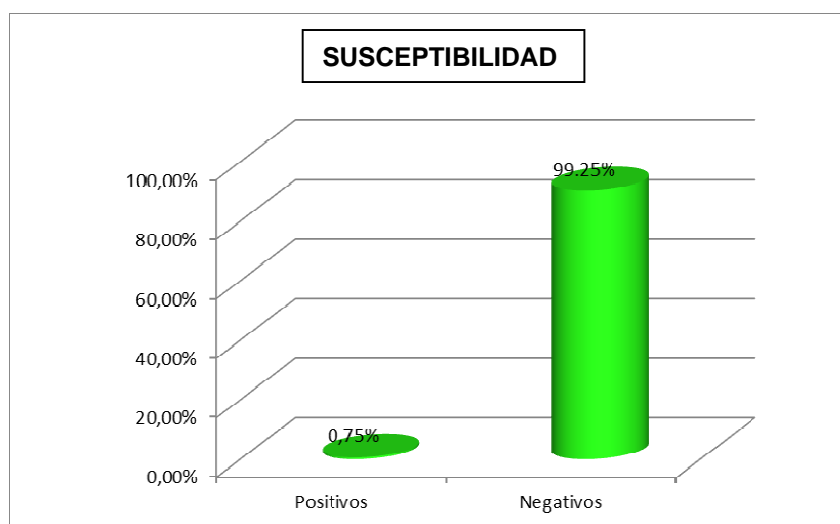
Gráfica 2. Identificación de *S. mutans*: el 81,30% (400) de las cepas de *Streptococcus mutans* se confirmaron positivas; 18,69% (92) restante fueron negativas para dichas pruebas; confirmando negatividad para *Streptococcus mutans*.

6.2 Prueba de resistencia

De las 400 cepas positivas para *S. mutans* 0,75% (3 cepas) fueron resistentes a amoxicilina a una concentración estándar de 10 microgramos (OXOID)

Tabla 2. Resistencia a amoxicilina: en esta tabla se observa la identificación de cepas *Streptococcus mutans* a partir de 492 muestras mediante pruebas bioquímicas.

Susceptibilidad	Números de cepas	Porcentaje
Resistente	3	0.75%
Sensible	397	99.25%



Gráfica 3. Resistencia a amoxicilina: en esta tabla se observan las cepas de *Streptococcus mutans* aisladas, donde el 99,25% son sensibles a la amoxicilina; el 0,75% son resistentes a este betalactámico.

6.3 DETECCIÓN DE LA ENZIMA BETALACTAMASA

Al 0,75% (3 cepas) de los resistentes se les realizó la prueba de detección de betalactamasa por Cefinasa (Becton Dickinson) siendo la prueba negativa para las tres cepas, indicando que la resistencia no estaba asociada a la producción de beta lactamasas

Tabla 4: Producción de betalactamasas: en esta tabla se observa que de las tres cepas resistentes a amoxicilina el 100% (3 cepas) no presentaron producción de betalactamasas.

Producción de enzimas betalactamasas	Numero de cepas	Porcentaje
Positivo	0	0%
negativo	3	100%

7. Discusión

La resistencia es el resultado biológico natural generado por la exposición de la bacteria ante el antibiótico y entre mayor sea el contacto y la interacción más posibilidad se tiene de desarrollar la resistencia, razón por la cual es importante detectar estos mecanismos en las cepas de la población sana como sucede en los pacientes odontológicos (Rodríguez, *et al.*, 2009). La amoxicilina es el antibiótico tradicionalmente usado dentro de los protocolos clínicos en la práctica odontológica especialmente en los tratamientos endodónticos por su carácter invasivo y patologías orales anexas (Mainjot, *et al.*, 2009) El principal mecanismo de resistencia a la amoxicilina está dado por la presencia de enzimas β lactamasas las cuales actúan hidrolizando el anillo β lactámico de estos compuestos entre los átomos de C y N, inactivándolos (Gaetti, *et al.*, 2007). Este proceso se produce incluso cuando la concentración de β lactámicos baja del nivel necesario para inhibir la actividad de las proteínas ligadoras de penicilina. La producción de dichas enzimas en Gram positivos es inducida por la presencia del antibiótico, siendo secretadas al medio externo en gran cantidad, produciendo su detoxificación, por lo que la resistencia tiene un efecto poblacional (André, *et al.*, 2008), razón por la cual es necesario evaluar la resistencia tanto a la dosis estándar normalmente usada en los tratamientos odontológicos como a diferentes dosis subclínicas. En ese sentido este trabajo evaluó la dosis estándar y un trabajo paralelo evaluó las dosis subclínicas.

Los estreptococos del grupo *mutans* son bacterias relacionadas principalmente a la producción de caries dada su capacidad para adherirse a superficies y producir ácidos, en especial láctico, y resistir las disminuciones de pH subsecuentes, contribuyendo a la formación de placa dentobacteriana, pero igualmente está involucrado en otros procesos infecciosos tales como gingivitis, abscesos periapicales, pulpitis, celulitis y, a nivel sistémico, en procesos de endocarditis infecciosa cuando se produce su diseminación por vía hematogena desde un foco infeccioso en la cavidad oral, patologías en las que es necesaria la aplicación de un antibiótico. La evolución de especies bacterianas entre ellas *Streptococcus* han permitido evidenciar que como mecanismo de supervivencia han desarrollado resistencia a los antibióticos. Se han logrado identificar péptidos involucrados en la habilidad de algunas especies de *streptococcus* para tomar ADN del ambiente y sufrir transformaciones en su genoma que les dan la capacidad de resistencia a antibióticos, capacidad de formar exopolisacáridos que los protegen de la opsonización y fagocitosis y algunos péptidos como el 21-CSP están involucrados en la inducción de competencia, formación de biofilm y actividad antimicrobiana (Munro, 1993. Petersen, 2006).

Este trabajo mostró un muy bajo porcentaje de resistencia de cepas de *S. mutans* ante la amoxicilina, indicando que probablemente el mecanismo no es la producción de betalactamasas e influenciado porque el grupo de estudio fueron personas sistémicamente sanas que no han consumido antibióticos sistemáticamente como para lograr la inducción a la resistencia. Por dicha razón, los siguientes estudios deben ir enfocados al análisis de otros mecanismos como es la modificación del sitio blanco de antibiótico, en este caso las proteínas de unión a penicilinas (PBP), además de una probable asociación a las diferentes especies bacterianas involucradas en la flora oral normal en un individuo sano. La alteración de éstas proteínas asociadas con la membrana de la célula bacteriana, evitan la formación de complejos estables con los β lactámicos y la consecuente inactivación del crecimiento y la división celular, así como la producción de defectos en la pared bacteriana que llevan a su muerte por osmólisis (Naoki, *et al.*, 1995). En relación a los mecanismos intrínsecos que pudieran estar involucrados en la producción de resistencia bacteriana de las cepas de *S. mutans* aisladas, es importante considerar en primer lugar, la producción de mutaciones espontáneas, inducidas y/o cromosómicas las cuales podrían disminuir la permeabilidad de las cepas, dificultando así el ingreso del antibiótico. Al respecto, Naoky y

cols afirman que las bacterias con características fenotípicas adquiridas a través de mutaciones en su estructura genética, tienen mayor probabilidad de que se produzcan mutaciones. Finalmente, la adquisición de material genético de otro microorganismo que codifica resistencia bacteriana a través de procesos de transformación, transducción y conjugación, deben mantenerse muy en cuenta como posible mecanismo intrínseco de resistencia bacteriana. Así, la combinación de material genético intra y extracromosomal, contenido éste último principalmente en plásmidos y trasposones, dan a las bacterias una versatilidad genética que aumenta la posibilidad de desarrollar resistencia a antibióticos y nueva patogenicidad. Además, esta nueva resistencia puede ser transmitida de célula madre a célula hija (Naoky, *et al.*, 1995).

La importancia del trabajo está en que los datos encontrados unidos a otros proyectos desarrollados de manera simultánea en el CIO permiten ver que *S. mutans* muestran resistencia a amoxicilina no solo en pacientes que usan habitualmente el antibiótico sino que es factible encontrarlo en individuos sanos, y aunque está en muy bajo porcentaje, es una alerta epidemiológica pues con la facilidad de los mecanismos de transmisión genética entre bacterias si no se toman medidas preventivas a tiempo, en una década en Colombia ya podemos estar hablando de patrones de resistencia característicos para *S. mutans* (Gaitan 2009 y Lee 1998). Prueba de ello son los diferentes estudios realizados en Singapur donde cepas como el *S. pneumoniae* hace 25 años sensible a todo, empezó en 1997 a reportarse resistencia a una gran gama de antibióticos hasta llegar al 2008 a tener una resistencia a de 69,5% a penicilina, 78% para eritromicina, 45,8% para clindamicina y 67,8% para tetraciclina (vasoo, *et al.*, 2011), modelo biológico que en unos años podremos tenerlo en *S. mutans*.

8. Conclusión y Recomendaciones

Los resultados sugieren que las cepas de *S. mutans* aisladas de individuos sanos presentan una bajo índice de resistencia bacteriana a la amoxicilina asociado a producción de betalactamasas.

Debe realizarse investigaciones similares pero en pacientes sistémicamente comprometidos, con alto consumo de antibióticos, y las futuras investigaciones sobre mecanismos de resistencia de los estreptococos de la cavidad bucal deben involucrar análisis de las PBP y análisis de Biofilm, dado que este puede ser un mecanismo de resistencia *In vivo* que impide la entrada del antibiótico.

Para verificar los mecanismos de resistencia debe incluirse un panel completo de antibióticos e involucrar las herramientas de biología molecular para su estudio.

9. Referencias Bibliográficas

- André Z, Contreras C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and b-lactam resistance. FEMS Microbiol 2008;32:361-385.
- Brescó-Salinas M, Costa-Riu N, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E70-5
- CARMONA T, DIZ P, LIMERES J, OUTUMURO M, CAAMAÑO F, FERNÁNDEZ J, VÁZQUEZ E. Pautas de profilaxis antibiótica de Endocarditis Bacteriana, recomendadas por los odontólogos en España. Med Oral 2004; 9:56-62
- Dubreuil L, Bascones A. Infecciones periodontales: papel de los anaerobios estrictos, importancia de las betalactamasas, elección de un antibiótico. Av Periodon 1994;6:99-108.
- Gaetti E, Landucci L, Lins S, Vieira E, de Oliveira S. Susceptibility of strict and facultative anaerobes isolated from endodontic infections to metronidazole and beta-lactams. J Appl Oral Sci 2007;15(6):539-545.
- Julian D, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology And Molecular Biology Reviews 2010:417-433.

- Klimiene I, Ruzauskas M, Spakauskas V, Matusevicius A, Mockeliūnas R, Pereckiene A, Butrimaite-Ambrozeviciene C, Virgailis M. Antimicrobial resistance patterns to beta-lactams of gram-positive cocci isolated from bovine mastitis in Lithuania. *Pol J Vet Sci.* 2011;14(3):467-72.
- Lee-Jene Teng, Po-Ren Hsueh, Yu-Chi chen, Shen-Wu Ho and Kwen-Tay Luh. Antimicrobial susceptibility of viridans group streptococci in Taiwan with an emphasis on the high rates of resistance to penicillin and macrolides in *Streptococcus oralis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1998) 41, 621–627
- Liébana J, Castillo A, Rodríguez-Avial C. Género *Streptococcus*. *Microbiología Oral*. Liébana J. (ed.). McGraw Hill Interaericana, 2002.
- Mainjot A, D'hoore W, Vanheusden A, Van Nieuwenhuysen G. Antibiotic prescribing in dental practice in Belgium. *J.-P. International Endodontic Journal* 2009;42(12):1112-1119.
- Maruyama F, Kobata M, Kurokawa K, Nishida K, Sakurai A, Nakano K, et al. Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content *BMC Genomics* 2009;10(358).
- Munro C, Macrina F. Sucrose-derived exopolysaccharides of *Streptococcus mutans* V403 contribute to infectivity in endocarditis. *Molecular Microbiology* 1993;8(1):133-142. (17)
- Naoky Horiba, Tsutomu Yoshida, Kasuyoshi Susuki. Isolation of methicillin resistant *Staphylococci* in the dental operator. *Journal of endodontics.* 1995. (21) 1;21-25
- Petersen F, Fimland G, Scheie A. Purification and functional studies of a potent modified quorum-sensing peptide and a two-peptide bacteriocin in *Streptococcus mutans*. *Molecular Microbiology* 2006 2006;61(5):1322-1334.
- Rodríguez E, Rodríguez M, Tratamiento Antibiótico de la Infección Ontogénica. *Revista terapéutica*, 2009, 33 (3): 67-79.
- Rodríguez-Núñez A, Cisneros-Cabello R, Velasco-Ortega E, Llamas-Carreras Jm, Tórrres-Lagares D, Segura-Egea J. Antibiotic use by members of the Spanish Endodontic Society. *J Endod.* 2009 Sep;35(9):1198-203. Epub 2009 Jul 22.
- Rodríguez-Núñez A, Cisneros-Cabello R, Velasco-Ortega E, Llamas-Carreras Jm, Tórrres-Lagares D, Segura-Egea J. Antibiotic use by members of the Spanish Endodontic Society. *J Endod.* 2009 Sep;35(9):1198-203. Epub 2009 Jul 22.
- Sandra L. Gaitán C., Paula A. Espinal M. y Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana, Región Caribe. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Rev Chil Infect* 2009; 26 (3): 239-246.(22)
- Segura J, Velasco E, Torres D, Velasco M, Monsalve L, Llamas C. Pattern of antibiotic prescription in the management of endodontic infections amongst Spanish oral surgeons. *J. M. International Endodontic Journal* 2010;43(4):342-350.
- Vasoo S, Singh K, Hsu LY, Chiew YF, Chow C, Lin RT, Tambyah PA. Increasing antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* colonizing children attending day care centres in Singapore. *Respirology.* 2011 Aug 17. doi: 10.1111/j.1440-1843.2011.02036.x
- Weerasuriya K, Stelling J, O'Brien TF. Containing antimicrobial resistance: a renewed effort. *Bull World Health Organ.* 2010 Dec 1;88(12):878
- WILSON W, TAUBERT KA, GEWITZ M, LOCKHART PB, BADDOUR LM. Prevention of Infective Endocarditis. Guidelines From the American Heart Association. A Guideline From the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation.* *Journal of the American Heart Association.* *Circulation* published online Apr 19, 2007: [www.http://circ.ahajournals.org](http://circ.ahajournals.org).