

**Susceptibilidad Antimicrobiana de Anaerobios Aislados de Infecciones Endodónticas
Primarias y su Asociación con los Parámetros Clínicos**

Luis Felipe Upegui Jiménez.

**Trabajo de investigación para optar al título de Magister en Microbiología y
Bioanálisis**

Tutor

Doctor Javier Enrique Botero T. Ph. D. Ciencias Biomédicas,

Profesor Facultad de Odontología

Universidad de Antioquia

Escuela de Microbiología

Medellín

2016

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3. OBJETIVOS	14
4. MARCOS DEL TRABAJO	15
5. METODOLOGÍA	21
6. RESULTADOS	23
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIONES	32
9. AGRADECIMIENTOS	34
10. BIBLIOGRAFÍA	35
ANEXOS	43

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características clínicas de los pacientes	25
Tabla 2. Numero de bacterias aisladas en cada caso	26
Tabla 3. Puntos de corte para amoxicilina y metronidazol según CLSI y EUCAST	27
Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias aisladas	27

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Método de dilución en agar	40
Figura 2. Colonia <i>Propionibacterium acnes</i>	41
Figura 3. Toma de muestra microbiológica	42

ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Formato recolección de datos	43
Anexo 2. Consentimiento informado	45
Anexo 3. Método de susceptibilidad antimicrobiana por dilución en agar	52

GLOSARIO

Anaerobio estricto: microorganismo que crece y se multiplica en ausencia total de oxígeno, logrando obtener energía libre y sintetizar todos sus componentes estructurales sin ayuda del oxígeno.

Aerotolerante: microorganismo que puede sobrevivir a la presencia de oxígeno durante breves periodos.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): la menor concentración de un agente antimicrobiano que impide el crecimiento visible de un microorganismo en una prueba de susceptibilidad en dilución en agar o caldo.

Susceptible: implica que los aislados son inhibidos por las concentraciones conseguidas del agente antimicrobiano, cuando se usa la dosis recomendada para tratar el sitio de la infección.

Intermedio: incluye aislados con CIM del agente antimicrobiano que alcanzan los niveles usuales en sangre y tejido y para los cuales la tasa de respuesta puede ser menor que para los susceptibles. Implica eficacia clínica en el sitio del cuerpo donde la droga está concentrada fisiológicamente, o cuando una dosis mayor que la normal se puede usar.

Resistente: implica que los aislados no son inhibidos por la concentración usualmente conseguida del agente a una régimen de dosis normal y/o demuestra que los diámetros de la zona de inhibición o la CIM de los aislados, caen en los rangos donde mecanismos específicos de resistencia microbiana son probables y la eficacia clínica del agente no se ha demostrado confiablemente en los estudios.

RESUMEN

Objetivo: describir la composición de la microbiota anaerobia estricta/aerotolerante en infecciones endodónticas primarias, su susceptibilidad antimicrobiana, y la asociación con los parámetros clínicos.

Métodos: se tomaron muestras de siete pacientes con necrosis pulpar sintomática o asintomática. Se utilizaron técnicas para la conservación, cultivo, incubación e identificación de anaerobios estrictos/aerotolerantes. Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana a amoxicilina y metronidazol, se utilizó el método de dilución en agar.

Resultados: Se aislaron un total de 32 cepas, 20 (62.5%) fueron anaerobios estrictos/aerotolerantes, y 8 (25%) anaerobios facultativos. El microorganismo anaerobio estricto/aerotolerante más frecuente fue *Fusobacterium nucleatum*, en tres casos, todos con algún tipo de dolor, en dos casos estuvo relacionado con *Prevotella* spp. Se encontró una colonia de *F. nucleatum* resistente a amoxicilina y con producción de β -lactamasa, y otra de *F. nucleatum* resistente a metronidazol. Una colonia de *P. propionicum/avidus* presentó resistencia intermedia a amoxicilina y con producción de β -lactamasa.

Conclusiones: Se encontró la presencia de bacterias anaerobias estrictas/aerotolerantes en los pacientes con infecciones endodónticas primarias. Existen algunos microorganismos relacionados con algún tipo de dolor, como *F. nucleatum* y *P. micra*. Los hallazgos muestran presencia de *F. nucleatum* resistentes a los antimicrobianos evaluados.

Palabras claves: periodontitis periapical, necrosis pulpar, farmacorresistencia bacteriana.

Abstract:

Objective: to describe the composition of the obligate / aerotolerant anaerobic microbiota in primary endodontic infections, antimicrobial susceptibility and its association with clinical parameters.

Methods: samples were taken from seven patients with symptomatic or asymptomatic pulp necrosis. Techniques for the culture and identification of obligate / aerotolerant anaerobic were used. The agar dilution method was used to determine the antimicrobial susceptibility to amoxicillin and metronidazole of the clinical isolates.

Results: A total of 32 strains were isolated of which 20 (62.5 %) corresponded to obligate / aerotolerant anaerobes and 8 (25%) facultative anaerobes. The most frequent obligate anaerobe / aerotolerant was *Fusobacterium nucleatum* and was associated with pain in three cases. In two cases, pain was associated with the presence of *Prevotella* spp. A colony of *F. nucleatum* was resistant to amoxicillin and produced β -lactamase. A colony of *F. nucleatum* was resistant to metronidazole. *P. propionicum* / *avidus* provided intermediate resistance to amoxicillin and produced of β -lactamase.

Conclusions: the presence of obligate anaerobic / aerotolerant bacteria in patients with primary endodontic infections was found. The presence of *F. nucleatum* and *P. micra* was associated with pain. Findings show the presence of strains of microorganisms resistant to amoxicillin and metronidazole.

Keywords: periapical periodontitis, dental pulp necrosis, drug resistance, bacterial

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones endodónticas son infecciones del sistema de conductos radiculares, que se desarrollan cuando este carece del tejido pulpar y de su sistema de defensas, como consecuencia de una necrosis pulpar o remoción de la pulpa para el tratamiento. El hábitat endodóntico provee un ambiente adecuado para el establecimiento de una microbiota mixta, predominantemente anaerobia, donde las bacterias son los principales microorganismos implicados. Las bacterias y sus productos con sus propiedades patogénicas, pueden llegar al tejido periradicular a través del agujero apical y conductos laterales, creándose una serie de reacciones inmunológicas, e inflamatorias, entre las bacterias y el sistema de defensa del hospedero, cuyo resultado es la destrucción del tejido periapical y la formación de la periodontitis periapical, que dependiendo de varios factores relacionados con el hospedero y con las bacterias puede ser sintomática o asintomática (1,2).

Las infecciones endodónticas se pueden clasificar de acuerdo a la localización anatómica, en intraradiculares o extraradiculares.

Infecciones intraradiculares: son aquellas en las que los microorganismos colonizan el sistema de conductos radiculares. Se dividen en:

A) Infección primaria: es la causada por microorganismos que inicialmente invaden y colonizan el tejido pulpar necrótico.

B) Infección secundaria: es la causada por microorganismos que no estuvieron presentes durante la infección primaria pero invadieron el conducto radicular después de la intervención del profesional.

C) Infección persistente: cuando los microorganismos comprometidos en la infección primaria o secundaria de alguna manera resisten los procesos antimicrobianos en el conducto y perduran por tiempo en los conductos tratados. Las infecciones secundarias y persistentes la mayoría de las veces no se pueden diferenciar clínicamente.

Infección extraradicular: cuando hay invasión de los microorganismos hacia el tejido periradicular como consecuencia de la infección intraradicular (1).

Todas las bacterias de la cavidad oral tienen las mismas posibilidades de llegar al conducto radicular, pero solo lo consigue un grupo restringido de especies, ya que es un ambiente único, donde la falta de oxígeno, la interacción entre los factores microbianos y la disponibilidad de nutrientes son los factores que definen la composición microbiana (3). Las diferencias que se pueden encontrar entre los diferentes estudios sobre cuáles son las especies más prevalentes, se deben a varios factores como: sensibilidad y especificidad en el método de identificación, técnica para obtener la muestra, el lugar geográfico, el régimen de prescripción, y divergencias en el diagnóstico clínico (1). No se puede considerar a una especie como el principal patógeno endodóntico, múltiples combinaciones de bacterias son las que actúan como las causantes de la periodontitis periapical. Las infecciones endodónticas se componen por una microbiota mixta, con diferencias en las bacterias más prevalentes de acuerdo al tipo de infección; en las infecciones primarias los hallazgos han mostrado un predominio de bacterias anaerobias estrictas/aerotolerantes, mientras que en las secundarias/persistentes hay mayor prevalencia de anaerobios facultativos, especialmente *Enterococcus faecalis*. También se han encontrado diferencias en la composición de la microbiota endodóntica entre los pacientes sintomáticos y los asintomáticos. En los pacientes con infecciones endodónticas sintomáticas se ha encontrado una mayor diversidad bacteriana, que las asintomáticas, con un predominio de bacterias anaerobias estrictas/aerotolerantes gramnegativas (4).

El tratamiento de las infecciones endodónticas consiste en eliminar la infección del sistema de conductos radiculares y prevenir su reinfección proporcionando un sello del espacio del conducto radicular, el cual se logra con la endodoncia (2). La mayoría de las infecciones endodónticas se curan con el tratamiento endodóntico, sin embargo hay casos en los que las bacterias y sus productos salen al tejido periapical, y otros órganos del cuerpo, produciendo abscesos, celulitis, infecciones en los espacios profundos del cuello, endocarditis bacteriana en pacientes de riesgo, incluso se ha reportado casos de abscesos cerebrales originados en infecciones odontológicas, hasta amenazar la vida del paciente; en estos casos es necesaria

la ayuda de agentes antimicrobianos, además de la endodoncia y el drenaje del tejido periapical para el tratamiento (5,6).

La escogencia del antimicrobiano apropiado, debe ser lo más racional posible, basándose en el conocimiento de los microorganismos causantes y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos, para que el tratamiento sea exitoso (7). Los agentes antimicrobianos de primera elección recomendados para el tratamiento de infecciones endodónticas son la penicilina y amoxicilina. Se prefiere la amoxicilina por su rápida absorción, vida media prolongada, lo que permite intervalos de dosis más largos, y buena tolerancia (8). El metronidazol es un agente que se ha encontrado efectivo solamente contra microorganismos anaerobios, como las infecciones endodónticas primarias están constituidas principalmente por este tipo de microorganismos, es que se recomienda para su tratamiento (9).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde que Fleming descubrió la penicilina advirtió sobre el desarrollo de resistencia antimicrobiana (10). Cuando un microorganismo está expuesto a presiones químicas o de otro tipo que amenacen su vida, desarrolla diferentes tipos de mecanismos, como lo es la resistencia antimicrobiana, para poder sobrevivir, esta evolución es ayudada por las pobres prácticas terapéuticas (11). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Dental Americana (ADA) han advertido sobre la presencia cada vez mayor de resistencia antimicrobiana, llegando a considerarla como un problema de salud pública. La selección de cepas resistentes esta facilitado por factores como, el uso inapropiado de los antimicrobianos, la terapia empírica con antibióticos de amplio espectro y sin pruebas de susceptibilidad, el régimen de prescripción utilizado, la venta de antimicrobianos sin formula, y pacientes que no terminan la dosis. Además el no conocer los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, lleva al uso de terapias inadecuadas y falla del tratamiento con consecuencias no solo para la salud del paciente, sino también económicas para el sistema de salud como son: el aumento en los costos de la terapia, mayor tiempo de hospitalización y pérdida de productividad por incapacidad (12,13).

Los estudios han demostrado que la resistencia antimicrobiana en las especies anaerobias estrictas/aerotolerantes presentes en infecciones endodónticas primarias ha aumentado con el paso del tiempo (9,14,15), una de las causas es que los odontólogos prescriben grandes cantidades de antimicrobianos cada año, muchas veces innecesariamente (16)

Se ha reportado que la microbiota es diferente en cada región, aunque esas diferencias se pueden atribuir a variaciones en la técnica de identificación, los hallazgos indican que la prevalencia de algunas especies en las infecciones endodónticas pueden ser significativamente diferentes de un lugar geográfico a otro (17,18). Estudios demuestran que en nuestro medio es común la automedicación y la falta de control a la venta de antibióticos, por lo que se podría pensar en la presencia de algunas cepas resistentes (19,20). El CLSI (21) recomienda monitoréos periódicos de los cambios en la resistencia

antimicrobiana, en Colombia, en odontología no se hacen estudios de vigilancia epidemiológica sobre la evolución de la resistencia antimicrobiana. Por todo lo anterior es prudente estudiar la composición de la microbiota endodóntica y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en nuestro medio para conocer sus niveles de resistencia, y así utilizar la terapia apropiada cuando sea necesario.

3. OBJETIVOS

El objetivo del estudio es describir la composición de la microbiota anaerobia estricta/aerotolerante en infecciones endodónticas primarias, su susceptibilidad antimicrobiana a dos antibióticos, y su asociación con los parámetros clínicos.

Objetivos específicos:

- Describir la composición de la microbiota anaerobia en infecciones endodónticas primarias.
- Describir la susceptibilidad antimicrobiana a amoxicilina y metronidazol de los microorganismos anaerobios aislados de infecciones endodónticas primarias
- Analizar la asociación de la microbiota anaerobia y la susceptibilidad antimicrobiana con los parámetros clínicos.

4. MARCOS DEL TRABAJO

Antecedentes

El primero que observo la presencia de bacterias en el sistema de conductos radiculares fue el Holandés Antoine van Leeuwenhoek en el siglo 17(22). Casi doscientos años después se encontró una relación causa efecto entre las bacterias y periodontitis apical, cuando Miller reportó su trabajo en 1894, la mayoría de las bacterias que observó no pudieron ser cultivadas con la tecnología de la época, presumiéndose que eran anaerobios estrictos. Kakehashi et al., confirmo los hallazgos de Miller al encontrar la relación entre la necrosis pulpar y la periodontitis apical en ratas convencionales, mientras en las pulpas de ratas libres de gérmenes, no solo permanecían vitales sino que también se formaba un tejido duro de reparación(23). El importante papel de las bacterias en la etiología de la periodontitis apical fue luego confirmado en otro estudio clásico por Sundqvist en 1976(24).

Vías de infección

Bajo condiciones normales el sistema de conductos radiculares es estéril y está aislado de la cavidad oral por el esmalte y el cemento, en el momento en que se pierda la integridad de uno de estos tejidos, los microorganismos de la cavidad oral van a invadir el tejido pulpar, esto puede ser como resultado de traumas, caries, procedimientos restaurativos, alisados radiculares, atrición, abrasión, y en pacientes con enfermedad periodontal a través de los túbulos dentinarios(1). La ruta de infección más común de la pulpa dental es a través de una caries, la gran mayoría de las bacterias presentes en el proceso carioso son inmóviles, ellas van invadiendo la dentina por divisiones celulares repetidas las cuales empujan las células en la dentina, también pueden ser empujadas en los túbulos dentinales por la presión hidrostática ejercida durante la masticación. Si la pulpa está vital, no puede ser infectada ya que esta puede eliminar y remover los productos bacterianos(25). Para el establecimiento de una infección endodóntica primaria es requisito que la pulpa está necrótica y así puede ser fácilmente infectada debido a la ausencia de defensas en el hospedero. Cuando se está realizando un tratamiento el hospedero también está desprovisto

de defensas, por lo que los microorganismos pueden invadir el sistema de conductos radiculares causando una infección secundaria(1).

Métodos identificación

Las infecciones endodónticas han sido estudiadas por medio de métodos de cultivo tradicionalmente. Con estos estudios se ha logrado establecer un grupo de especies que desempeñan un papel importante en la patogénesis de la periodontitis apical, recientemente con las técnicas moleculares, no solo se ha logrado confirmar lo encontrado con las técnicas de cultivo, sino que se ha complementado con el hallazgo de nuevos patógenos endodónticos, la lista de los posibles patógenos endodónticos se ha expandido incluyendo especies difíciles de cultivar o no cultivables, que nunca habían sido encontradas por los métodos de cultivo, como consecuencia la microbiota endodóntica se ha redefinido por los métodos moleculares (26).

Datos de estudios por cultivos y moleculares han revelado que casi 800 taxa de bacterias distintas pueden vivir en la cavidad oral, no todas ellas están presentes en el mismo individuo al mismo tiempo, un solo individuo puede alojar entre 100 a 200 de esos 800 taxa, indicando que hay una gran diversidad entre cada persona(27).las bacterias detectadas en la cavidad oral están en 13 phyla separados: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Synergistes*, SR1, TM7, *Chlorofexi*, *Deinococcus*, *Acidobacteria* y *Cyanobacteria*. Este número podría ser mayor, ya que un estudio reciente sugiere que cuatro miembros de otros phyla (*Aquificae*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, y *Thermomicrobia*) pueden ser representantes orales aunque ninguno ha sido identificado todavía(28).

Microbiota endodóntica

En infecciones endodónticas se han encontrado pocos representantes de los dominios *Archaea* y *Eukarya* y reportes indican la ocurrencia de herpesvirus (cytomegalovirus y Epstein-Barr), siendo el dominio *Bacteria* el más dominante y diverso(29). Estudios publicados muestran que 468 taxa bacterianos únicos se han encontrado en infecciones

endodónticas, la gran mayoría de esos taxa caen en 100 generos mientras que 22 taxa permanecer sin definir y fueron asignados a nivel de familia o phylum. Los géneros más representativos son: *Prevotella* (39 taxa), *Eubacterium* (27 taxa), *Streptococcus* (26 taxa), y *Lactobacillus* (21 taxa). De todos los taxa bacterianos detectados en infecciones endodónticas se ha encontrado que 9 pertenecen a los 13 phyla representativos de la cavidad oral (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Synergistes*, SR1, TM7)(30).

Las infecciones endodónticas se caracterizan por una comunidad mixta dominada por bacterias anaerobias. Un conducto infectado puede alojar entre 10^3 a 10^8 células bacterianas y un promedio de 17 especies. El tamaño de la lesión periapical va a ser directamente proporcional a la densidad y diversidad bacteriana(31). Las especies bacterianas detectadas en infecciones endodónticas primarias, incluyendo periodontitis apical aguda y crónica pertenecen a los siguientes géneros gramnegativos: *Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* y *Veillonella*. Y grampositivos: *Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, y *Eubacterium* (32), (33), (3). Las especies más prevalentes reportadas en infecciones endodónticas primarias varían entre estudios, esto se puede deber a varios factores como: la sensibilidad y especificidad del método de identificación, técnica de la muestra, localización geográfica y divergencia o precisión en la clasificación y diagnóstico clínico(1).

Infecciones endodóntica primarias

En las infecciones endodónticas primarias por métodos de cultivo y moleculares se han detectado 391 bacterias, 4 hongos, y 1 archa. Por métodos moleculares se han identificado 271 taxa y por cultivo 216. Se ha identificado un grupo diverso de gramnegativos y grampositivos, entre los más frecuentes están anaerobios gramnegativos como *Prevotella* que incluye las especies *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *P. baroniae*, y *P. denticola*. Y *Porphyromonas*, especies como *P. endodontalis*, *P. gingivalis*(32), (34). *Tannerella forsythia* un anaerobio estricto que no se había detectado por cultivos en

conductos radiculares, es un miembro común de la microbiota asociada con diferentes tipos de infecciones primarias incluyendo abscesos(35). *Dialister* son cocobacilos gramnegativos anaerobios estrictos asacarolíticos, solo identificados con métodos moleculares, en infecciones endodónticas sintomáticas y asintomáticas se han descrito *D. pneumosintes* y *D. invisus*. Una de las bacterias más comunes es *Fusobacterium nucleatum*, un bacilo gramnegativo anaerobio estricto, detectado en infecciones primarias y abscesos endodónticos(8). Espiroquetas son bacterias móviles observadas en muestras de infecciones endodónticas, las más frecuentes son *T. denticola* y *T. socranskii* (36). Aunque las bacterias anaerobias gramnegativas son las más comunes en infecciones endodónticas primarias, varios grampositivos también se han encontrado, entre los que están, *Pseudoramibacter alactolyticus* (37). *Filifactor alocis* es un bacilo anaerobio estricto detectado con métodos moleculares en la mitad de las infecciones endodónticas primarias(38). *Actinomyces* se encuentran en el 10% de las infecciones del conducto radicular, se han asociado con fallas en el tratamiento endodóntico(39). *Propionibacterium propionicum* otra especie que participa en la actinomicosis, se ha detectado comúnmente en infecciones endodónticas primarias(40). *Olsenella* un bacilo gramnegativo estricto detectado solo con técnicas moleculares(41). Cocos grampositivos especialmente peptostreptococos y streptococos son frecuentes en infecciones endodónticas primarias, *Parvimonas micra* un coco grampositivo anaerobio se ha detectado en un tercio de las infecciones endodónticas primarias, se ha visto una alta prevalencia en infecciones sintomáticas(9). Los streptococos más prevalentes son los miembros del grupo *Streptococcus anginosus*, también se han reportado *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguinis*(39).

Patogenicidad

Cualquier microorganismo que infecte la pulpa tiene el potencial de iniciar una inflamación periapical, la virulencia y patogenicidad de cada especie varía considerablemente y puede estar afectada en la presencia de otro microorganismo. Aunque las especies individuales de la microbiota endodóntica tienen poca virulencia sus propiedades de supervivencia y patogenicidad están influenciadas por varios factores: interacción microbiana para el desarrollo de sinergismo, la capacidad para interferir y evadir las defensas del hospedero, la

liberación de lipopolisacáridos y otras moléculas bacterianas, y la síntesis de enzimas que dañan los tejidos del hospedero(2).

5. METODOLOGÍA

Se realizó una serie de casos en un estudio de tipo transversal

2.1. Selección de los pacientes

Se atendieron un total de siete (7) pacientes, que asistieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia, con necesidad de tratamiento endodóntico. Los pacientes firmaron consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología antes de su atención. A cada paciente se le realizó una historia dental detallada.

2.2. Criterios de inclusión y exclusión

Los pacientes debían estar en buenas condiciones de salud, no haber recibido terapia antibiótica en los últimos 3 meses, mayores de 18 años, con diagnóstico de necrosis pulpar sintomática o asintomática y la cámara pulpar intacta. Se excluyeron pacientes con enfermedad sistémica, sondaje mayor a 3 mm, dientes con ápice inmaduro, mujeres en embarazo y dientes que no se pudieran aislar con el dique de goma.

2.3. Características clínicas

Se registraron las siguientes características clínicas para correlacionar con los hallazgos microbiológicos: edad, género, diente, diagnóstico pulpar, tipo y características del dolor, presencia de dolor previo, percusión, palpación, tracto sinuoso, edema, movilidad, sondaje, tamaño de la imagen radiolúcida periapical, estado del conducto (húmedo o seco), tipo de exudado, y fiebre.

2.4. Toma de muestra

Las muestras se tomaron bajo estrictas condiciones de asepsia (Fig. 3). Se limpió el diente con piedra pómez para proceder hacer el aislamiento con el dique de goma. El diente y el campo se limpiaron con peróxido de hidrogeno al 30%, y se descontaminó con hipoclorito de sodio al 5%, por 30 segundos cada uno. La solución se inactivó con tiosulfato de sodio

al 5%. La apertura se realizó con fresa estéril, usando irrigación manual con solución salina estéril. Se tomó muestra del campo operatorio para verificar su esterilidad. Se utilizó una técnica aséptica para la instrumentación, remoción del contenido de la cámara pulpar y la toma de la muestra. Con una lima de acuerdo al diámetro del conducto se realizó instrumentación mínima para desorganizar el contenido del conducto y romper la biopelícula, sin el uso de irrigante químico. Se introdujo una punta de papel estéril, por 60 segundos, hasta el tercio apical del conducto, previa determinación de la longitud por medio de la radiografía, si el conducto estaba seco se humedeció la punta con solución salina. La lima se cortó y junto con la punta de papel se introdujeron inmediatamente al medio de transporte Viability Medium Goteborg Agar III (VMGA III), y llevada al laboratorio en menos de 1 hora para la siembra en la cámara de anaerobiosis (42).

2.4. Análisis microbiológico

Dentro de la cámara de anaerobiosis, el medio de transporte fue homogenizado en vórtex por 60 segundos. Se hicieron diluciones seriadas 1×10^{-1} hasta 1×10^{-5} en tubos con caldo tioglicolato, se sembraron 50 μ L en agar brucella (BD, USA) con sangre desfibrinada de cordero al 5%, 1 mL/L de hemina (Alfa Aesar, United States) y 1 mL/L de vitamina K, con asa Digrafsky asegurando homogeneidad, este medio es empleado para cultivar anaerobios facultativos, y anaerobios estrictos/aerotolerantes. Se incubaron a 37°C en atmosfera de 5% de H₂, 5% de CO₂, y 90% de N₂. Se realizaron lecturas diarias por 14 días para verificar crecimiento bacteriano. La dilución de 1×10^{-2} se incubó en aerobiosis, para la prueba de aerotolerancia.

2.5. Identificación

Se hizo caracterización preliminar de las colonias microbianas basada en las características de las colonias, bajo estereomicroscopio (tamaño, color, forma, altura, consistencia superficie, brillo, y hemolisis) y conteo. Las colonias fueron aisladas puras para subcultivar, tinción de Gram, y aerotolerancia. Basados en esta información se procedió a la identificación de anaerobios estrictos/aerotolerantes con el sistema Vitek 2 (BioMérieux SA) y API 20 A (BioMérieux SA, Marcy.l'Etoile, France). Las cepas control fueron

Bacteroides ovatus American Type Culture Collection (ATCC) BAA-1296 y *Clostridium septicum* ATCC 12464

2.6. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Se utilizó el método de dilución en agar, prueba de referencia recomendada por Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) para determinar la susceptibilidad antimicrobiana en anaerobios. Las bacterias fueron evaluadas contra amoxicilina (MP Biomedicals, LLC) y metronidazol (MP Biomedicals, LLC), se compararon los puntos de corte de CLSI y European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Los microorganismos se sembraron durante 48 horas a 37 °C en agar brucella suplementado con hemina y vitamina k, en la cámara de anaerobiosis. Se realizó control de la viabilidad de las bacterias. Las soluciones stock de antibiótico se prepararon a concentraciones de al menos 1000 µg/mL o diez veces la concentración más alta a ser evaluada. Se prepararon diluciones dobles de 0.016 µg/mL hasta 128 µg/mL, con sus respectivos controles, bajo estrictas condiciones de asepsia. Se mezclaron 6 ml de agar con 700µl de antibiótico y 300 µl de sangre para servir en las cajas de Petri, se dejaron secar por 2 horas. Se midió turbidez con un tamaño de inóculo de Mc Farland 0.5 y se sembraron 2 µl de cada microorganismo en las cajas de Petri, se dejaron secar, se invirtieron las cajas y se incubaron. Las lecturas se hicieron a las 24 y 48 horas. Se consideró la CIM aquella a la concentración en la cual ocurría una marcada reducción en el crecimiento de los microorganismos de las placas evaluadas. Las cepas ATCC control utilizadas fueron *Clostridium difficile* 700057 y *Bacteroides fragilis* 25285. Para la prueba de β-lactamasa se utilizó un disco de nitrocefín, los discos se observaron durante 30 minutos para ver si presentaban cambio de color, si cambiaba a rojo se consideraba positivo para β-lactamasa. Como control positivo se utilizó *Bacteroides fragilis* ATCC 25285(21).

6. RESULTADOS

Los resultados de los controles negativos no presentaron ningún crecimiento bacteriano. De siete pacientes con infecciones endodónticas primarias, 4 fueron mujeres y 3 hombres, con edades entre 18 y 47 años. Cuatro estaban sin dolor y tres con algún tipo de dolor, uno tenía dolor espontáneo, los otros dos dolor provocado. Tres casos tenían historia de dolor previo. Tres pacientes presentaban tracto sinuoso en el momento de la toma de la muestra, ninguno presentó edema. Se diagnosticaron tres casos con absceso apical crónico, dos con necrosis pulpar con periodontitis apical sintomática y dos con necrosis pulpar con periodontitis apical asintomática. Las piezas dentales estudiadas fueron: tres molares, dos incisivos superiores, un canino inferior y un premolar superior. Se encontró percusión positiva grado tres en dos casos y en otros dos grado uno, en el resto la percusión fue negativa. Un caso presentaba movilidad grado dos, los otros seis casos movilidad grado uno. Los siete casos presentaron imagen radiolúcida periapical en la radiografía. El estado del conducto fue: seco en cinco casos, húmedo en uno y purulento en otro (Tabla 1). Se aislaron un total de 32 cepas, (4 no se pudieron recuperar), 20 (62.5%) fueron microorganismos anaerobios estrictos/aerotolerantes, y 8 (25%) anaerobios facultativos, pertenecientes a 10 géneros y 13 especies bacterianas. Siete especies anaerobias estrictas/aerotolerantes diferentes estuvieron presentes en los pacientes que presentaron dolor y nueve en los que no presentaron dolor. De las bacterias aisladas, 68.75% eran grampositivas y 31.25% gramnegativas. Los anaerobios estrictos/aerotolerantes más comunes fueron: *Fusobacterium nucleatum* tres (15%), seguido por *Parvimonas micra* dos (10%), *Propionibacterium acnés* dos (10%), *Anaerococcus prevotii* dos (10%), *Prevotella oralis* dos (10%), y *Propionibacterium propionicum/avidus* dos (10%). El máximo de especies aislada por diente fue 7 y el mínimo 2, con un máximo de 1.2×10^8 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y un mínimo de 1×10^4 UFC por especie. (Tabla 2).

De las tres cepas de *F. nucleatum* aisladas dos estuvieron en pacientes con algún tipo de dolor, y también había presencia de *Prevotella* spp. Las dos cepas de *P. micra* se aislaron

en pacientes sin dolor. Las dos cepas de *P. propionicum/avidus* y de *P. acnes*, se encontraron en pacientes sin dolor y en las dos cepas de *P. acnés* había presencia de tracto sinuoso. En el único paciente con dolor severo, se encontraron *P.intermedia/nigrescens* y *F. nucleatum*. Hubo tres pacientes con tracto sinuoso en el momento de la toma de la muestra, en los tres se identificaron *Prevotella* spp. de los cuales dos presentaron exudado por el conducto (Tablas 1 y 2).

En el método de dilución por agar, los resultados de los controles con *B. fragilis* (ATCC 25285) y *C. difficile* (ATCC 700057) dieron dentro de los niveles de las cepas referencia conforme al valor establecido por CLSI (21). El método utilizado para la detección de β -lactamasa fue con discos de nitrocefín, como lo recomienda CLSI (19). Todos los controles dieron positivos. De acuerdo a los puntos de corte de CLSI y EUCAST (Tabla 3), se encontró una cepa de *F. nucleatum* resistente a amoxicilina y con producción de β -lactamasa, y otra cepa de *F. nucleatum* resistente a metronidazol. Una cepa de *P. propionicum/avidus* fue intermedio a amoxicilina y con producción de β -lactamasa, según los puntos de corte de CLSI, según EUCAST es susceptible. De acuerdo a los puntos de corte de EUCAST, *Lactobacillus gasseri* fue resistencia a metronidazol, de acuerdo a CLSI es susceptible, presentó una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 8 μ g/mL. (Tabla 4).

Tabla 1 Características clínicas de los pacientes							
Caso	1	2	3	4	5	6	7
Edad	47	41	46	27	44	46	18
Genero	M	M	F	M	F	F	F
Diente	46	21	14	16	26	11	43
Presencia de dolor	Leve	No	Mod	Sev	No	No	No
Tipo dolor	Esp	x	Pro	Pro	x	x	x
Dolor Previo	Si	No	Si	No	No	Si	No
Percusión	1	No	3	3	No	No	1
Dolor palpación	No	Leve	Mod	Sev	No	No	No
Tracto sinuoso	Si	Si	No	No	No	Si	No
Edema	No	No	No	No	No	No	No
Movilidad	2	1	1	1	1	1	1
Imagen radiolúcida	Si	Si	Si	1	Si	Si	Si
Estado conducto	Pur	Hum	Seco	Seco	Seco	Seco	Seco
Diagnóstico	3	3	2	2	1	3	1
M= Masculino, F = Femenino, Mod = Moderado, Sev = Severo, Esp = Espontaneo							
Pro = Provocado, Pur = Purulento, Hum = Humedo,							
1 = Necrosis pulpar con periodontitis apical asintomática							
2 = Necrosis pulpar con periodontitis apical sintomática							
3 = Absceso apical crónico							
Terminología Diagnóstica Recomendada por la Asociación Americana de Endodoncistas (AAE) (43)							

Tabla 2. Bacterias aisladas								
Caso	1	2	3	4	5	6	7	Total
Total aislados	6	6	2	2	5	4	7	32 (100%)
Anaerobios estrictos/aerotolerantes	6	3	1	2	2	2	4	20 (62.5%)
Anaerobios Facultativos			1		3	1	3	8(25%)
Grampositivas	4	4	2	0	4	2	6	22(68.75)
Gramnegativas	2	2	0	2	1	2	1	10(31.25)
<i>F. nucleatum</i>	x			x	x			3 (15%)
<i>P. micra</i>	x		x					2 (10%)
<i>P. acnes</i>		x				x		2 (10%)
<i>P. oralis</i>	x	x						2 (10%)
<i>A. prevotii</i>	x						x	2 (10%)
<i>P. propionicum/avidos</i>		x			x			2 (10%)
<i>P. intermedia/nigrescens</i>				x				1 (5%)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>							x	1 (5%)
<i>P. buccae</i>						x		1 (5%)
<i>S. sacharoliticcus</i>	x							1 (5%)
<i>Lactobacillus gasseri</i>							x	1 (5%)
<i>Grupo Clostridium</i>							x	1 (5%)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	x							1 (5%)
Perdidas		3				1		4/12.5%

Tabla 3 Puntos de corte							
ANTIBIOTICO	Puntos de corte CLSI			Puntos de corte EUCAST			
	SUSCEPTIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE
Amoxicilina*	≤ 0.5 µg/mL	1µg/mL	≥ 2 µg/mL	0,5 µg/mL †	2 µg/mL †	4 µg/mL ‡	8 µg/mL ‡
Metronidazol	≤ 8 µg/mL	16 µg/mL	≥ 32 µg/mL	4 µg/mL †	4 µg/mL †	4 µg/mL ‡	4 µg/mL ‡
* Se considera que la CIM es igual a Ampicilina							
† Anaerobios gramnegativos							
‡ Anaerobios grampositivos							
CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute							
EUCAST:European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing							

Tabla 4 susceptibilidad antimicrobiana											
Especie	Nº especies	CLSI						EUCAST			
		Amoxicilina			Metronidazol			Amoxicilina		Metronidazol	
		S	I	R	S	I	R	S	R	S	R
<i>F. nucleatum</i>	3	2	0	1	2	0	1	2	1	2	1
<i>P. micra</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>P. acnes</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>P. propionicum/avidus</i>	2	1	1	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>A. prevotii</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>P. oralis</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>P. intermedia</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>P. gingivalis</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>P. buccae</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>S. sacharoliticus</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>L. gasseri</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>A. naeslundii</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>Grupo Clostridium</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
R = Resistente											
I = Intermedio											
S = Susceptible											

7. DISCUSIÓN

Se presenta una serie de casos de la cual se hará una descripción de los hallazgos encontrados, que servirían para proponer hipótesis para estudios posteriores, y como fuente de información con propósitos educativos, que facilite el aprendizaje sobre la microbiota endodóntica y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en nuestro medio (44).

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó con el método de dilución en agar, que es método de referencia para anaerobios recomendado por CLSI (21). La ventaja de los estudios por cultivos es que se pueden realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, e identifican una gran variedad de especies en una muestra, incluyendo las que no se están buscando. Entre sus limitaciones están que son muy laboriosas, baja sensibilidad, y hay muchos microorganismos que no se pueden cultivar. Las técnicas moleculares tienen la ventaja de su alta sensibilidad, son rápidas, y detectan bacterias que no se pueden cultivar. Entre sus desventajas está el que con algunas técnicas, especies no identificadas o sin blanco no se pueden detectar, y no distinguen entre células viables o muertas, lo que sería conveniente por un lado porque permiten detectar bacterias que pudieron haber muerto durante la toma de muestra o el transporte, y por otra parte, podría ser una desventaja ya que las bacterias que habían muerto en el sitio de la infección, pueden ser detectadas, dando una falsa presunción de su papel en el proceso infeccioso (45). Lo ideal para un estudio de perfiles de susceptibilidad antimicrobiana sería correlacionar la parte genética con el fenotipo de susceptibilidad, porque la presencia de un gen de resistencia antimicrobiana no necesariamente indica que la bacteria sea resistente al antimicrobiano ya que este podría no expresarse (42).

Se encontraron microorganismos cultivables en todos los pacientes, con una prevalencia de 2 a 7 por diente, al igual que en otros estudios (14,46,47). Entre las especies aisladas, hubo predominio de los microorganismos anaerobios estrictos/aerotolerantes (62.5%) sobre anaerobios facultativos, particularmente grampositivos (68.76%), confirmando los

hallazgos de Munson M. A. (41) y de Sousa E. (48), mientras que Li X, (49) encontró predominio de gramnegativos.

El microorganismo aislado en mayor cantidad fue *F. nucleatum*, el cual estaba relacionado con *Prevotella* spp, en los pacientes que presentaban algún tipo de dolor. Se sugiere que *F. nucleatum* tiene un papel en la patogenia de las infecciones endodónticas primarias, ha sido aislado frecuentemente, especialmente en casos sintomáticos y posee la capacidad de coagregarse, actuando como puente entre los primeros colonizadores y los últimos, durante la formación de la biopelícula. Se ha reportado asociado a *Prevotella* spp, *P. intermedia*, *P. oralis* y *Eubacterium* spp. Se cree que *Prevotella* spp. tienen capacidad proteolítica y generan nutrientes que son utilizados por otras especies incluyendo *F. nucleatum*, de otra parte *F. nucleatum* produce proteasas que aumentan la capacidad de degradación proteolítica de *P. gingivalis*. También se ha reportado que las especies gramnegativas en especial *Fusobacterium* spp y *Prevotella* spp, contienen endotoxinas que pueden estimular la producción de bradiquinina, un potente mediador del dolor. Estas dos especies también se han reportado en casos que presentan tracto sinuoso, al igual que en estos casos (8,32,50).

Todos los microorganismos anaerobios estrictos/aerotolerantes aislados en estos casos se han reportado en infecciones endodónticas primarias (42,46), *Staphylococcus sacharolyticus*, el cual hace parte de la flora residente en piel, aunque es poco común, se ha encontrado en infecciones endodónticas primarias(33), se han reportado casos de infecciones de la médula ósea (51), neumonía (52), y endocarditis de válvulas protésicas causadas por este microorganismo (53)

El propósito del tratamiento de las infecciones endodónticas primarias es impedir la diseminación de la infección a otras partes del cuerpo. Sin embargo la terapia antimicrobiana puede ser útil como tratamiento adjunto en casos de pacientes con síntomas de infección o pacientes de alto riesgo, y en tal caso la terapia antimicrobiana se debe enfocar contra los patógenos más comunes. A veces se dificulta determinar cuándo y cual antimicrobiano se debe administrar, la escogencia del antimicrobiano apropiado debe ser lo

más racional posible, basándose en el conocimiento de los microorganismos causantes y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos. La estrategia terapéutica debería ser un agente con el menor espectro posible, para disminuir el riesgo de desarrollar cepas resistentes (14).

La resistencia de *F. nucleatum* a amoxicilina es poco común, como lo reporta el estudio de Jacinto (8). En estos casos una de tres cepas de *F. nucleatum* fue resistente a amoxicilina y con producción de β -lactamasa, y otra a metronidazol. Debido a que la resistencia es diferente de acuerdo al lugar, estos hallazgos nos advierten sobre la posible presencia de resistencia de *Fusobacterium nucleatum* en nuestro medio. Se considera que la producción de β -lactamasa es la mayor causa de resistencia antibacteriana a los β -lactámicos. Una cepa de *P. propionicum/avidus* de dos resultó intermedio según CLSI con producción de β -lactamasa. Sousa (48) evaluó la producción de β -lactamasa a seis bacterias anaerobias estrictas, encontrando que ninguna de ellas era positiva para β -lactamasa. Mientras que Kuriyama (54) encontró que 34% de las cepas de *Prevotella* spp. eran resistentes a amoxicilina y todas producían β -lactamasa, y en el 4.8% de las cepas susceptibles se detectó la producción de β -lactamasa; a pesar de las diferencias en los hallazgos ambos recomiendan terapia combinada de amoxicilina con un inhibidor de β -lactamasa, como el ácido clavulánico.

Se ha reportado que el metronidazol es efectivo contra anaerobios estrictos/aerotolerantes (9). De tres cepas de *F. nucleatum*, una fue resistente a metronidazol, según los puntos de corte de CLSI y EUCAST. Se cultivó una cepa de *L. gasseri* que resultó resistente a metronidazol según EUCAST, según CLSI tenía una CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$, que es el límite de susceptibilidad. Skucaite (14) encontró que el 55.6 % de los anaerobios aislados eran resistentes al metronidazol, y Khemaleelakul (9) reportó un 12% de los anaerobios estrictos. En casos de infecciones mixtas se recomienda combinar metronidazol con una penicilina para obtener un efecto terapéutico que cubra los microorganismos sobre los que no tiene efecto el metronidazol (55). Se considera que *P. acnés* es intrínsecamente resistentes a metronidazol (56), lo que coincide con los hallazgos en estos casos.

El comportamiento de la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos puede cambiar por factores como el régimen de prescripción, la droga que se escoja, la adaptabilidad del paciente, el lugar geográfico, la automedicación, y la falta de control a la venta de los medicamentos. (15). En nuestro medio es común la automedicación y la falta de control a la venta de antibióticos, por lo que se podría pensar que exista resistencia a algunas cepas. Un estudio en Medellín reportó que el 73.2 % de las personas había tomado un medicamento no prescrito en el último año, y el 57.3 % en el último mes (19) En Bogotá se estableció la norma para restringir la venta de antibióticos solo con fórmula médica, el estudio buscaba determinar la aplicación de la restricción, encontrándose que el 80.3 % de las farmacias no lo cumplían a 5 años de establecida la norma (20).

Cada día es mayor el aumento de la resistencia a los agentes antimicrobianos prescritos en odontología, como lo demuestra los hallazgos de Gomes B. (15) y determinar si los pacientes están adquiriendo o presentan patógenos resistentes representa un área de investigación constante. En odontología en Colombiano no se realizan controles de vigilancia epidemiológico sobre resistencia, CLSI recomienda monitoréos periódicos de la tendencia en resistencia regional y en instituciones de los aislados relevantes, para guiar la terapia empírica antimicrobiana de las infecciones (21).

Por los hallazgos encontrados en estos casos, es recomendable hacer estudios en nuestro medio, sobre la microbiota endodóntica en infecciones endodónticas por métodos de cultivos y moleculares y su susceptibilidad antimicrobiana a los diferentes antibióticos prescritos y la correlación entre el genotipo y el fenotipo de resistencia antimicrobiana para realizar una terapia adecuada, evitándose la selección de cepas resistentes.

8. CONCLUSIONES

Se encontró la presencia de bacterias anaerobias estrictas/aerotolerantes en los pacientes con infecciones endodónticas primarias, principalmente *F. nucleatum*, *Prevotella* spp. *P. micra*, *P. acnés*, *P. propionicum/avidus*, *A. prevotii*.

Se encontraron algunos microorganismos relacionados con pacientes sintomáticos.

Los hallazgos muestran presencia de algunos microorganismos anaerobios estrictos/aerotolerantes resistentes a los antimicrobianos evaluados, y con producción de β -lactamasa.

Según lo encontrado se advierte la posibilidad de no utilizar terapia combinada de amoxicilina con metronidazol, si no buscar otra alternativa terapéutica, debido a la presencia de cepas resistentes a ambos antimicrobianos. Se necesitan estudios que demuestren esta resistencia

Para el manejo de las infecciones endodónticas, el uso de los antimicrobianos se debe justificar en un correcto diagnóstico microbiológico y análisis clínico para evitar la selección de cepas resistentes.

Limitaciones del estudio

En el presente estudio durante la toma de muestra microbiológica, se realizó limado de las paredes del conducto para tratar de desprender la biopelícula, lográndose recoger cepas plantónicas suspendidas en el conducto y adheridas a las paredes de la dentina, se sabe que algunas bacterias pueden colonizar los túbulos dentinales o las irregularidades del conducto lo que hace imposible su recolección.

Debido a que la mayoría de las infecciones por anaerobios son polimicrobianas y el éxito del tratamiento depende de varios factores como, el drenaje y el uso de terapia antimicrobiana, la importancia relativa de la susceptibilidad a un solo microorganismo para predecir un resultado clínico favorable es difícil de determinar.

Se utilizaron métodos de cultivos para el aislamiento de los microorganismos, por lo que algunos microorganismos que no son cultivables no se pudieron aislar.

9. AGRADECIMIENTOS

Al tutor Dr. Javier E Botero

Al comité tutorial integrado por la Dra. María Cecilia Martínez y Clara Lina Salazar

Agradecimientos a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de esta investigación.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Siqueira JF. Treatment of Endodontic Infections. Berlin: Quintessence; 2011.
2. Nair P. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(6):348–81.
3. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. *Endod Top.* 2003;6:3–28.
4. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *J Endod.*
5. Caplan D, Chasen J, Krall E, Cai J, Kang S, Garcia R, et al. Lesions of Endodontic Origin and Risk of Coronary Heart Disease. *J Dent Res.* 2006;85(11):996–1000.
6. Corson M a, Postlethwaite KP, Seymour R a. Are dental infections a cause of brain abscess? Case report and review of the literature. *Oral Dis.* 2001;7(1):61–5.
7. Poeschl PW, Crepaz V, Russmueller G, Seemann R, Hirschl AM, Ewers R. Endodontic pathogens causing deep neck space infections: clinical impact of different sampling techniques and antibiotic susceptibility. *J Endod*
8. Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FGC, Almeida GC, Gomes BPF a. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. [Internet]. *Journal of endodontics.* 2008. p. 1451–6.
9. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [Internet]. 2002 Dec 10. Fleming A. Nobel Lecture, December 11, 1945. 1945;
11. Goodman & Gilman`s. The Phrmacological Basis of Therapeutics. 12 Edition. Laurence L. Bruton, editor. New York: Mc Graw Hill; 2011.
12. ADA. Council on Scientific Affairs. Antibiotics use in denstry. *J Am Dent Assoc.* 1997;128:648.
13. WHO. ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance 2014. World Heal Organ. 2014;

14. Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, MacHiulskiene V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J Endod* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;36(10):1611–6.
15. Gomes BPPA, Jacinto C, Montagner F, Sousa ELR, Ferraz CCR. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod*
16. Sweeney LC, Dave J, Chambers P a, Heritage J. Antibiotic resistance in general dental practice--a cause for concern? *J Antimicrob Chemother*. 2004;53(4):567–76.
17. Baumgartner JC, Siqueira JF, Xia T, Ro IN. Endodontic Infections Using Polymerase Chain Reaction. 2004;30(3).
18. Siqueira JF, Jung I-Y, Rôças IN, Lee C-Y. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 May
19. Martínez GI, Martínez LM. Características del consumo de medicamentos de venta libre en una población de adultos de la ciudad de Medellín (Colombia) Characteristics of the consumption of non- prescription drugs in a population of adults in the city of Medellin (Colombia). *Salud uninorte*. 2013;29(3):360–7.
20. Vacca CP, Niño CY, Reveiz L. Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia: estudio descriptivo. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;3030(66):586–91.
21. CLSI. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial. 2015.
22. Dobell C, Leeuwenhoek A. Staples Press Limited. 1932.
23. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc*. 1966;34(9):449–51.
24. Sundqvist G. Bacteriological Studies of Necrotic Dental Pulp. Univ Umea Odontol Diss. 1976;1–93.
25. Michelich V, Schuster G, Pashley D. Bacterial penetration of human dentin in vitro. *J Dent Res*. 1980;59:1398–403.
26. Siqueira JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 2005;31(7):488–98.

27. Paster B, Olsen I, Aas J, Dewhirst F. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006;42:80–7.
28. Huyghe A, Francois P, Charbonnier Y, Tangomo-bento M, Bonetti E, Paster BJ, et al. Novel Microarray Design Strategy To Study Complex Bacterial Communities □. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(6):1876–85.
29. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. Identification and Quantification of Archaea Involved in Primary Endodontic Infections. *J Clin Microbiol*. 2006;44(4):1274–82.
30. Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res* 2009 Nov
31. Rôças IN, Siqueira JF. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3599–606.
32. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod*. 1999;25(6):413–5.
33. Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SSM, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(4):266–71.
34. Sundqvist Göran, Johansson Eva SU. Prevalence of Black-pigmented Bacteroides Species in Root Canal Infections. *J Endod*. 1989;15(1):13–9.
35. Siqueira JF, Rôças IN. Bacteroides forsythus in primary endodontic infections as detected by nested PCR. *J Endod*. 2003;29:390–3.
36. Baumgartner JC, Khemaleelakul S, Xia T. identification of spirochetes (treponema) in endodontic infections. *J Endod*. 2003;29:794–793.
37. Siqueira JF, Rôças IN. Pseudoramibacter alactolyticus in primary endodontic infections. *J Endod*. 2003;29:735–8.
38. Gomes B, Jacinto RC, Pinheiro ET, Souza E, Zaia AA, Ferraz CC. Molecular analysis of Filifactor alocis, Tannerella forsythia, and Treponema denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod*. 2006;32:937–40.
39. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7:257–62.

40. Siqueira JF, Rocas IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2003;96:215–22.
41. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002;81(11):761–6.
42. Jungermann GB, Burns K, Nandakumar R, Tolba M, Venezia R a, Fouad AF. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. *J Endod* 2011 Oct;37(10):1337–44.
43. AAE. AAE Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology. *J Endod.* 2009;35(12):1625–33.
44. Pertuzé R J. Criterios para publicar casos clínicos. *Rev Chil enfermedades Respir.* 2006;22(2):105–7.
45. Siqueira JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):411–23.
46. Łysakowska ME, Sienkiewicz M, Sokołowski J, Banaszek K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals , their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. 2015;1–9.
47. Jacinto RC, Gomes BPF a, Ferraz CCR, Zaia a a, Filho FJS. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(20):285–92.
48. Sousa ELR, Gomes BPF A, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR. Microbiological profile and antimicrobial susceptibility pattern of infected root canals associated with periapical abscesses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*; 2013;32(4):573–80.
49. Li X, Zhu XF, Zhang C, Catho PP, Seneviratne CJ, Shen SH. Endodontic bacteria from primary and persistent endodontic lesions in Chinese patients as identified by cloning and 16S ribosomal DNA gene sequencing. *Chin Med J (Engl).* 2013;126(4):634.
50. Ogawa A, T. B de S, M. de U, JV. J, SI. J. Characterization of proteolytic activities of *Fusobacterium Nucleatum*. *J Endod.* 2006;32(6):521–3.

51. Liu C, Sun B, Guo J, Feng B, Liu T. A case of bone marrow infection by *Staphylococcus saccharolyticus*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19:1161–3.
52. Wu X, Yu C, Wang X. A case of *Staphylococcus saccharolyticus* pneumonia. *Int J Infect Dis*. 2009;13(2):43–6.
53. Roat T. Prosthetic valve endocarditis due *Staphylococcus saccharolyticus*. 1996.
54. Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, et al. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Aug;22(4):285–8.
55. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod*. 2003;29(1):44–7.
56. Church DL, Bryant RD, Sim V, Laishley EJ. Metronidazole susceptibility and the presence of hydrogenase in pathogenic bacteria. *Anaerobe*. 1996;2(3):147–53.

FIGURAS



Figura 1. Método de dilución en agar, disminución del halo de crecimiento bacteriano

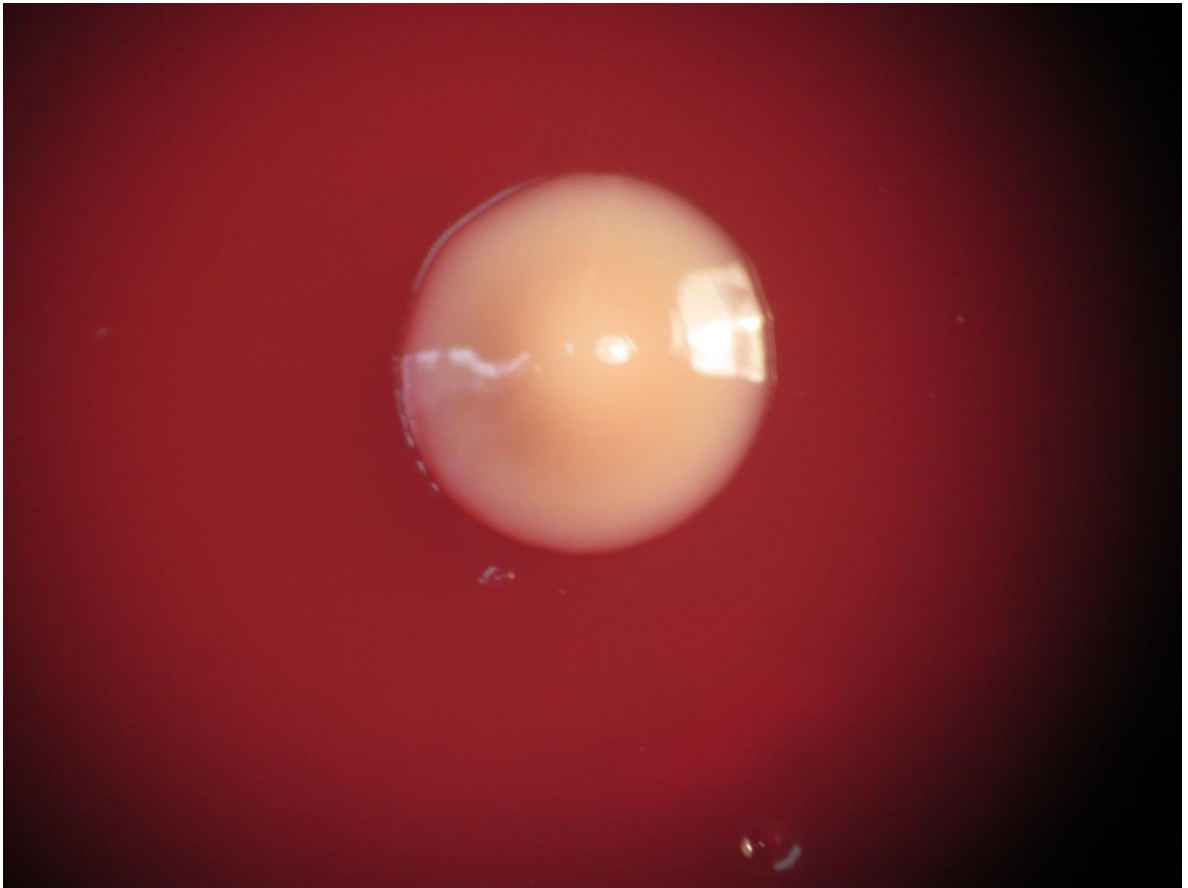


Figura 2. Colonia de *P. acnés* aislada

Foto Cortesía de Microbióloga Diana Molina



Figura 3. Toma de muestra microbiologica con punta de papel

ANEXOS

Anexo 1

FORMATO RECOLECCIÓN DE DATOS

La información contenida en este formulario es confidencial y solo será usada con fines investigativos. La identidad de los pacientes no debe ser revelada en ningún momento

A. Datos generales

Nombre _____ Identificación _____

Edad: _____ Sexo: M ____ F ____ Fecha: D ____ M ____ A ____

B. Antecedentes médicos:

Enfermedades: _____

Medicamentos: _____

A tomado antibióticos en los últimos tres meses Si ____ No ____

C. Parámetros Clínicos

Numero de diente _____

Presencia de dolor: Leve ____ Moderado ____ Severo ____ No ____

Tipo de dolor: Provocado ____ Espontaneo ____ Continuo ____ Otro _____

Dolor previo: Si ____ No ____

Dolor a la Percusión: Grado 1 ____ 2 ____ 3 ____ No ____

Dolor a la palpación: Leve ____ Moderado ____ Severo ____ No ____

Tracto sinuoso: Si ____ No ____ Endodóntico ____ Periodontal ____

Edema: Si ___ No ___

Movilidad: Grado 1 ___ 2 ___ 3 ___

Sondaje: MV ___ Vest ___ DV ___ ML ___ Ling ___ DL ___

Imagen radiolúcida periapical: Si ___ No ___ Tamaño ___ mm X ___ mm

Estado del conducto: Húmedo ___ Seco ___ Tipo exudado _____

Fiebre: Si ___ °C _____ No ___

Diagnostico Pulpar: _____

Presencia de: Caries ___ Restauración ___ Estado _____

Observaciones:

Anexo 2



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR
EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

**SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS
AISLADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS PRIMARIAS Y SU RELACIÓN CON
LOS PARÁMETROS CLÍNICO**

Investigador Principal: Luis Felipe Upegui J

Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia

Este formulario de consentimiento puede contener algunas palabras que usted probablemente no entiende. Por favor pida explicación a uno de los integrantes del grupo de investigación para que lo asesore.

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea cuidadosamente este formulario de consentimiento y discuta cualquier inquietud que usted tenga con el

investigador. Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar la decisión.

La invitación a participar en la investigación no necesariamente implica que usted u otros miembros de su familia sufran de una enfermedad particular o tengan riesgo genético para esa enfermedad.

1. Usted ha sido invitado a participar en un proyecto de investigación bajo la supervisión del Dr. (a) Luis Felipe Upegui J. En la Clínica Odontológica de de la Universidad de Antioquia. El propósito de esta investigación es tomar muestras microbiológicas de la microbiota presente en los conductos radiculares a los cuales se les hará tratamiento endodóntico, para hacerles pruebas de resistencia a los antimicrobianos.

2. Su participación incluye:

- a) Recolección de los datos necesarios para determinar si puede participar en el estudio.
- b) Se realizará el mismo procedimiento que se realiza para hacer una endodoncia convencional, con la única diferencia de que se tomará la muestra de la microbiota presente en los conductos radiculares con unas puntas de papel absorbentes, las cuales serán llevadas al laboratorio para su cultivo y análisis de susceptibilidad antimicrobiana. El estudiante encargado para su tratamiento endodóntico continuará realizando el procedimiento una vez recogida la muestra.

Esto se hace sólo para propósitos de investigación y los resultados no serán reportados ni a usted ni a su médico.

- c) El procedimiento de la toma de muestra no representa ningún riesgo adicional fuera de los inherentes al tratamiento endodóntico. Tampoco tiene ningún costo adicional, fuera del requerido para su tratamiento endodóntico.

Acepto _____

No acepto _____

Todos los datos obtenidos serán codificados para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos y nunca serán mostrados (sin su consentimiento) a nadie fuera del proyecto de investigación.

3. Riesgo y efectos adversos que pueden estar asociados a la investigación:

- a) Las preguntas personales para conocer su estado de salud actual e historia clínica pueden ser tediosas y embarazosas. Usted puede discutir las con el entrevistador, y puede decidir no responder a determinadas preguntas o no continuar con su participación. Tanto las respuestas como la información que usted suministre son confidenciales.
- b) Los resultados de la investigación son estrictamente confidenciales. No se entregará información de las evaluaciones clínicas realizadas durante la investigación a compañías de seguros ni otras personas o instituciones sin su previa autorización.
- c) A sus datos se le asignará un código numérico. Esto prevendrá que la persona que trabaje con su muestra conozca la identidad del paciente. Las personas

fuera del proyecto de investigación nunca podrán relacionar los resultados de la investigación con los pacientes en el estudio.

4. Beneficios para usted/sociedad: Usted no recibirá ningún beneficio médico o económico por la participación en este proyecto. Sin embargo, usted estará haciendo una libre y generosa donación para la investigación que podrá ser beneficiosa para futuras generaciones. Tenga en cuenta que en la mayoría de los casos el conocimiento científico avanza de forma lenta. El estudio podría resultar en nuevas pruebas clínicas o tratamientos y por lo tanto podrá ayudar a prevenir o a curar esta enfermedad en un futuro. Los investigadores de la Universidad de Antioquia lo consideran a usted como un importante colaborador y le agradecerán su decisión de participar en este estudio.
5. La participación es voluntaria y usted puede rehusarse de participar o retirarse de la investigación en cualquier momento sin ninguna penalidad. Si una vez realizado el procedimiento usted desea retirarse del proyecto de investigación, estos datos serán destruidos a petición suya. Sin embargo una vez procesados sus datos los resultados derivados de la investigación no podrán ser eliminados de aquellos trabajos científicos derivados de este estudio y que ya estén publicados.

La Universidad tomará medidas para proteger la confidencialidad de su registro médico y su identidad no será divulgada en ninguna publicación que resulte de este estudio. Para proteger sus derechos, la agencia que suministra los fondos para este proyecto podría en algún momento inspeccionar los registros suministrados por usted para este proyecto (no por nombres, sino utilizando solamente códigos numéricos). Esto con el fin de asegurarse de que sus derechos han sido protegidos en este proyecto.

Este proyecto de investigación no está destinado a proveer diagnóstico ni tratamiento de aquellos problemas médicos no mencionados explícitamente. Su participación en este proyecto de investigación no debe reemplazar las visitas de rutina a su odontólogo.

Usted será informado de cualquier hallazgo derivado de su participación en la investigación, que pueda cambiar su decisión de continuar en este estudio. El investigador puede retirarlo de esta investigación, si entiende que existen circunstancias médicas que lo aconsejan

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o si experimenta cualquier problema, puede llamar:

Dra./Dr. Luis Felipe Upegui J

Teléfono. 235 37 37

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Científico y de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia. Cualquier consulta llamar al teléfono.....

PREGUNTAS RELATIVAS A OTROS PROYECTOS DE INVESTIGACION

- Podría algún miembro del grupo de investigación contactarlo e invitarlo a participar en futuros estudios de investigación?

----- Si ----- No

- Podríamos compartir sus datos (sólo con códigos numéricos) con investigadores que estén haciendo estudios en campos similares en la Universidad de Antioquia y en otros centros de investigación? Los otros investigadores no recibirán su nombre ni ninguna otra forma de identificación.

----- Si ----- No

Los investigadores de la Universidad de Antioquia, quienes están realizando esta investigación, reconocen la importancia de su contribución a la ciencia. La Universidad de Antioquia hará esfuerzos para tratar de minimizar, controlar, y tratar las complicaciones que puedan resultar de la investigación. Si usted cree que ha desarrollado alguna complicación derivada de esta investigación, por favor comuníquese con el Investigador Principal/especialista Dr. Luis Felipe Upegui J.

He leído este formulario de aprobación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo que me darán copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación

Nombre del participante:

CC..... Firma.....Fecha.....


Nombre del testigo (si el estudio lo amerita)

CC..... Firma.....Fecha

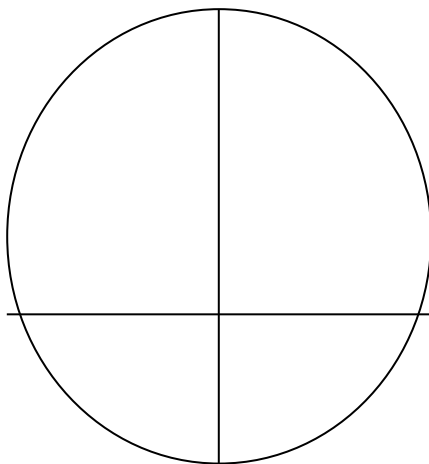
Nombre del Investigador u odontólogo designado.....

CC..... Firma.....Fecha

Anexo 3

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA 1803</p>	<p>Susceptibilidad Antimicrobiana por Dilución en Agar</p>	<p>Escuela de Microbiología</p>
<p>Susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos anaerobios aislados de infecciones endodónticas primarias y su relación con los parámetros clínicos</p>		
<p>Pág. 1 de 2</p>	<p>Hoja de registros Fecha creación: 14-10-14</p>	<p>Responsable: Luis Felipe Upegui</p>

Posición en la caja de Petri



Fecha: _____

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____
10. _____
11. _____
12. _____

Antimicrobiano evaluado: _____ Rango dilución _____

Cepa ATCC _____

Cepa ATCC _____

Lectura 24 horas

Cepa No.	Control cto	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															

MIC: concentración en la cual ocurre una marcada reducción en la apariencia del crecimiento en la caja de Petri comparado con la caja de control de crecimiento

(+): Crecimiento bacteriano (-): Reducción de crecimiento o ningún crecimiento observado, en comparación con la caja control de crecimiento.

Lectura 48 horas

Cepa No.	Control cto	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															

11															
12															

Puntos de corte según EUCAST: _____

CLSI: _____

Interpretación cualitativa:

Cepa	Lectura 24 horas		Lectura 48 horas	
	MIC	Interpretación ¹	MIC	Interpretación ¹
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

¹ Para las cepas ATCC, es términos de cumplimiento (C) o no cumplimiento (No C) de acuerdo a los puntos de corte establecidos por CLSI. Para las cepas en estudio sensible (S) Intermedio (I) Resistente (R), según los puntos de corte para cada antimicrobiano.