Perfiles Antimicrobianos de Bacterias Subgingivales en Pacientes con Periodontitis en Colombia

Antimicrobial Profiles of Subgingival Bacteria from Periodontitis Patients in Colombia

Jaramillo Echeverri A^{1,2}, Betancourth Quiroz M^{3,2}, Mayorga-Fayad I^{4,5}, Castillo Perdomo DM^{4,5}, Aya Castañeda MR^{4,5}, Lafaurie Villamil GI^{4,5}, Botero Torres JE^{1,2}, Contreras Rengifo A^{1,2}

RESUMEN

Introducción: La sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de las bacterias asociadas a periodontitis es diferente entre distintas poblaciones. En América Latina, pocos estudios han descrito la sensibilidad a los antimicrobianos de los periodontopatógenos. Este estudio determinó la sensibilidad de bacterias periodontopáticas aisladas de pacientes colombianos sanos y con periodontitis, frente a 6 antimicrobianos usados comúnmente como terapia adjunta para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Materiales y métodos: Se estudiaron aislados de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (n=23), *Porphyromonas gingivalis* (n=74), *Prevotella intermedia/nigrescens* (n=38), *Tannerella forsythia* (n=8), Enterobacteriaceas (n=89) y bacilos Gram negativos no fermentadores (n=26) cultivados a partir de muestras subgingivales de 127 pacientes colombianos con periodontitis crónica, 68 con periodontitis agresiva y 11 sanos o con gingivitis. Se realizó la prueba de E-test® para establecer la concentración inhibitoria mínima a tetraciclina, ciprofloxacina, amoxicilina, metronidazol, azitromicina y clindamicina.

Resultados: Se encontró sensibilidad de los periodontopatógenos a la mayoría de los antimicrobianos. Aunque *A. actinomycetemcomitans* mostró resistencia al metronidazol, amoxicilina y clindamicina y *P. intermedia/nigrescens* fue resistente a varios de los antimicrobianos probados. Las demás bacterias anaerobias fueron sensibles a la mayoría de ellos. No se observaron diferencias entre los perfiles de sensibilidad de las bacterias en pacientes con enfermedad periodontal y en pacientes sanos. Los bacilos Gram negativos entéricos fueron resistentes a la amoxicilina y sensibles a la ciprofloxacina.

Conclusión: La terapia antimicrobiana adjunta al tratamiento periodontal de pacientes colombianos con periodontitis debe ser administrada cuidadosamente, pues existe una gran variabilidad en la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias periodontopatógenas.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 61-65, 2008.

Palabras claves: Periodontitis crónica, periodontitis agresiva, sensibilidad antibiótica, E-test, bacterias periodontopáticas.

ABSTRACT

Background: *In vitro* antimicrobial susceptibility of microorganisms associated to periodontitis has showed different results among world populations. In Latin America, few studies have described antimicrobial susceptibility of periodontopathogens. This study determined antimicrobial susceptibility of some bacteria isolated from healthy and periodontitis Colombian patients for six commonly used antimicrobials as adjunctive therapy for periodontal disease treatment.

Methods: Isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (n=23), *Porphyromonas gingivalis* (n=74), *Prevotella intermedia/nigrescens* (n=38), *Tannerella forsythia* (n=8), *Enterobacteriaceae* (n=89) and non fermenters Gram negative rods (n=26) from subgingival samples of 127 patients with chronic periodontitis, 68 with aggressive periodontitis and 11 healthy/gingivitis patients were tested by means of the E-test®. The minimal inhibitory concentration (MIC) of tetracycline, ciprofloxacin, amoxicillin, metronidazole, azythromycin and clindamycin was tested for each isolate.

Results: High antimicrobial susceptibility of periodontopathogens was found to most of tested antimicrobials. However, *A. actinomycetemcomitans* showed resistance to metronidazole, amoxicillin and clindamycin and *P. intermedia/nigrescens* showed resistance to most of tested antimicrobials. No differences of susceptibilities to antimicrobials were observed between periodontal diagnoses. Gram negative rods were resistant to amoxicillin and susceptible to ciprofloxacin.

Conclusions: Antimicrobial supportive therapy for the treatment of Colombian patients affected with periodontitis should be carefully administered considering that there is a great variability of susceptibility to antimicrobial agents among periodontopathic species.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 61-65, 2008.

Key words: Chronic periodontitis, aggressive periodontitis, antimicrobial susceptibility, E-test, periodontopathic bacteria.

INTRODUCCIÓN

El uso de antimicrobianos sistémicos como coadyuvantes en la terapia periodontal es controversial. No existe en la actualidad un consenso con respecto a su uso, al tipo de antimicrobiano o a la condición clínica periodontal a la cual se debe aplicar. En pacientes con periodontitis agresivas, fumadores o poco respondedores a la terapia mecánica, el uso de los antibióticos puede mejorar el pronóstico del tratamiento. Sin embargo, aun en estos casos es poco claro el tipo de fármaco a usar, las dosis y el tiempo de duración del tratamiento⁽¹⁾.

Dos de los criterios más importantes en la elección del agente antimicrobiano para el tratamiento de la enfermedad periodontal son la identificación de la microbiota subgingival y la de su perfil de sensibili-

dad antimicrobiana⁽²⁾. La sensibilidad a los antibióticos de los microorganismos asociados a enfermedad periodontal puede variar entre países, debido en gran parte a razones socioculturales (alto consumo de antibióticos, poca adherencia a una correcta dosificación) lo que ayuda a aumentar la resistencia a los antimicrobianos seleccionados usados comúnmente en la terapia periodontal⁽³⁾.

Las bacterias asociadas a la etiología de enfermedades periodontales comprenden un grupo heterogéneo de microorganismos capnófilos y anaerobios estrictos, dentro de los que se cuentan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, entre otros⁽⁴⁾.

1. Escuela de Odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Escuela de Bacteriología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
5. Grupo UIBO, Unidad de Investigación Básica Oral.

2. Grupo Medicina Periodontal.
4. Facultad de Odontología, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Estas bacterias exhiben diversos comportamientos frente a los antibióticos disponibles para su tratamiento. En España, en pacientes con periodontitis, se reporta un porcentaje de resistencia de *P. intermedia* de 33% a la amoxicilina, 16.7% a la tetraciclina y 11.1% a la clindamicina; siendo estos niveles de resistencia son mucho más elevados que los observados en Holanda⁽³⁾. También se ha encontrado resistencia de aislados de *P.gingivalis* en pacientes con periodontitis agresiva a antibióticos como clindamicina (13%) y ciprofloxacina (73%)⁽⁵⁾. Estos últimos resultados no se observaron en otro estudio donde la sensibilidad a la clindamicina y ciprofloxacina fué total⁽⁶⁾. En España también se describe una resistencia mayor de *A. actinomycetemcomitans* a la amoxicilina y azitromicina (33.3%), en comparación con Holanda, no obstante en ambos países la resistencia a la clindamicina y al metronidazol es similarmente alta⁽³⁾.

De otro lado, en el tratamiento de la enfermedad periodontal se ha observado que el uso de algunos antimicrobianos puede facilitar la colonización de especies inusuales en el surco y bolsa periodontal. Existen reportes que indican que después del tratamiento sistémico con eritromicina y doxiciclina, se presenta un aumento en el aislamiento de bacilos Gram negativos entéricos^(7,8). Los bacilos Gram negativos entéricos son aislados frecuentemente en pacientes con enfermedad periodontal. En pacientes con periodontitis crónica se ha reportado que hasta un 14% pueden tener organismos de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* y que estos en particular son resistentes a antibióticos como los betalactámicos y las tetraciclinas. Sin embargo, también se describe la gran sensibilidad que presentan frente a la ciprofloxacina gracias a los ensayos *in vitro* de sensibilidad⁽⁹⁾.

Este estudio busca determinar los perfiles de susceptibilidad de cinco patógenos periodontales y de otros microorganismos inusuales encontrados en pacientes colombianos con periodontitis crónica, agresiva y en pacientes sanos, lo cual puede sentar las bases de las diferencias en la conducta terapéutica con respecto a otros países.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se estudiaron 258 cepas de microorganismos aislados de surcos o bolsas periodontales de 127 pacientes con Periodontitis Crónica, 68 con periodontitis agresiva y 11 pacientes periodontalmente sanos o con gingivitis. Las muestras fueron tomadas en las diversas clínicas de periodoncia de las universidades participantes: Universidad del Valle, Universidad El Bosque, Instituto de Ciencias de la Salud CES, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Universidad Santo Tomás, Universidad de Antioquia, Universidad de Cartagena, Universidad Autónoma de Manizales.

Diagnóstico periodontal

Los diagnósticos periodontales de periodontitis crónica (PC), periodontitis agresiva (PA) e individuos sanos o con gingivitis, fueron realizados por los periodoncistas tratantes, previamente calibrados, siguiendo los estándares del último consenso de la Asociación Americana de Periodoncia sobre Clasificación⁽¹⁰⁾. El taller de calibración en los criterios diagnósticos comprendió el examen clínico de 15 pacientes en los que se midieron los parámetros clínicos, se revisaron las historias clínicas, exámenes de laboratorio, radiografías y fotografías, y posterior a ello se realizó una discusión. Los resultados de la calibración fueron >91% de acuerdo en las mediciones de profundidad al sondaje y >82% para el nivel de inserción clínica.

Aislamiento e identificación de microorganismos

Las muestras subgingivales se tomaron de los 6 sitios más profundos en los pacientes con enfermedad periodontal y de un sitio por cada sextante en los pacientes con gingivitis o sanos. Se removió la placa supragingival y se insertó una punta de papel estéril en el surco o bolsa durante 20 segundos, y las puntas se transfirieron a un frasco tapa rosca con el medio de transporte VMGA III para luego ser procesadas máximo

después de 48 horas de obtenidas, en dos laboratorios de microbiología que usaron técnicas estandarizadas para el procesamiento microbiológico de identificación y pruebas de susceptibilidad.

Se utilizó el agar TSBV, incubado a 36°C por 3 a 5 días en una atmósfera de 5% de CO₂ para la recuperación de *A. actinomycetemcomitans*, mientras que el agar sangre Brucella incubado a 36°C por 10 días se usó para la recuperación de los organismos anaerobios estrictos que fueron estudiados. La identificación se hizo de acuerdo a las características morfológicas de las colonias y pruebas bioquímicas adicionales⁽¹¹⁾, así como el sistema comercial Rapid Ana II[®]. Para el aislamiento de los bacilos Gram negativos entéricos se utilizó el agar MacConkey incubado por 24 horas a 37°C en aerobiosis y para su identificación se utilizó el sistema comercial Crystal E/NF[®].

Pruebas de sensibilidad

Con el fin de obtener cultivos puros de *P. gingivalis*, *P. intermedia/nigrescens*, y *Tanarella forsythia* las colonias fueron subcultivadas en agar sangre Brucella. De igual manera, se obtuvieron subcultivos puros de *A. actinomycetemcomitans* en agar TSBV y de los bacilos Gram negativos entéricos en agar MacConkey. El método usado para evaluar la sensibilidad fue el E-test[®], siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe brevemente: Se prepararon los inóculos por separado de bacterias anaerobias y microaerofílicas con el estándar 1.0 de McFarland, y de los bacilos entéricos con el estándar 0.5. Luego se sembró 0.1 ml de cada inóculo de bacterias anaerobias en agar sangre Brucella utilizando una varilla de vidrio estéril, mientras que para los bacilos Gram negativos entéricos la siembra se realizó con un hisopo estéril en agar Mueller-Hinton. Se dejó secar el inóculo durante 15 minutos y se colocaron dos tiras de E-test[®] en cada caja. Los siguientes antimicrobianos fueron probados en bacterias anaerobias y capnofílicas: Amoxicilina, Tetraciclina, Ciprofloxacina, Metronidazol, Clindamicina y Azitromicina. Para los bacilos Gram negativos tipo Enterobacteriaceae se probaron Amoxicilina, Tetraciclina, y Ciprofloxacina mientras que en los no fermentadores sólo se probaron los dos últimos.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad fueron determinados a las 24 horas para bacterias entéricas y 48 horas para anaerobias, interpretando el valor de la concentración en µg/ml obtenido de la intersección entre la concentración dada por la tira reactiva y el crecimiento bacteriano que forma una elipse. A partir de estos datos, se interpretó la sensibilidad de los microorganismos de acuerdo a las tablas del CLSI (NCCLS) o a estudios previos^(3,12,13).

El control de calidad de las tiras E-test[®] fue realizado con las cepas ATCC *Bacteroides fragilis* 25285, *Escherichia coli* 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

Análisis estadístico

La base de datos se realizó en Excel[®] y se importó en el paquete estadístico SPSS 10.0[®]. Se realizó análisis univariado para establecer las frecuencias de los organismos en la microbiota subgingival y bivariado para realizar las comparaciones por diagnóstico periodontal.

Las concentraciones a las cuales el 50% y el 90% de las cepas fueron susceptibles a los antibióticos se definieron como concentración inhibitoria mínima (CIM) 50 y 90. Los resultados de acuerdo al diagnóstico se compararon mediante la prueba de Wilcoxon.

Se calculó la proporción de cepas resistentes a cada antimicrobiano con relación a cada diagnóstico periodontal y se realizó la prueba χ^2 de Pearson para verificar si existían diferencias en los perfiles de sensibilidad con respecto al diagnóstico clínico.

RESULTADOS

En la tabla 1 se describe la frecuencia de los microorganismos aislados a los cuales se les realizaron pruebas de sensibilidad. Dentro de los anaerobios y capnofílicos estudiados, fueron más prevalentes *P. gingivalis* y *P. intermedia/nigrescens* que predominaron en los pacientes con perio-

don'titis. Con respecto a los bacilos Gram negativos facultativos, fueron más frecuentes bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* que las no fermentadoras. En los pacientes con gingivitis o sanos fue muy baja la frecuencia de aislamiento de las bacterias periodontopáticas y Gram negativas entéricas estudiadas.

Los perfiles de resistencia de los organismos evaluados frente a los antimicrobianos, de acuerdo al diagnóstico periodontal se presentan en la tabla 2. *A. actinomycetemcomitans* fue notablemente sensible a la mayoría de los antibióticos, exceptuando el metronidazol y la clindamicina. Los microorganismos anaerobios estrictos mostraron poca resistencia a los antimicrobianos, aunque con la amoxicilina se encontró resistencia de las especies de *Prevotella*. La mayoría de los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* fueron resistentes a la amoxicilina, mientras que a la tetraciclina cerca de la cuarta parte presentaron resistencia. En contraste, la ciprofloxacina fue altamente efectiva en las pruebas in vitro contra todos los bacilos Gram negativos entéricos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de bacterias resistentes según el diagnóstico periodontal (prueba χ^2 de Pearson).

La tabla 3 presenta los rangos de CIM, la CIM50 y CIM90 de cinco patógenos periodontales contrastado de acuerdo al diagnóstico de periodontitis crónica o agresiva. *P. gingivalis* y *T. forsythia* exhibieron una gran sensibilidad a los fármacos probados, pues se observan CIM muy bajas. *A. actinomycetemcomitans* mostró CIM90 altas frente a amoxicilina, metronidazol y clindamicina. *P. intermedia/nigrescens* presentó altas CIM90 para ciprofloxacina y metronidazol.

La tabla 4 muestra los rangos de CIM, la CIM50 y CIM90 de *Enterobacteriaceae* y de los bacilos Gram negativos no fermentadores a los antimicrobianos. La ciprofloxacina exhibió los mejores resultados al inhibir el 50 y el 90% de los aislados de estos organismos con unas concentraciones muy bajas. En contraste, las especies de *Enterobacteriaceae* mostraron CIM50 y CIM90 muy altas, lo que indica la alta resistencia de estos organismos a la amoxicilina. En los bacilos Gram negativos no fermentadores no se probó la amoxicilina ya que presentan una resistencia constitutiva a este betalactámico⁽¹⁴⁾.

En la tabla 5 se presentan algunas de las especies de *Enterobacteriaceae* resistentes a dos de los antibióticos probados. *Enterobacter cloacae* y las especies de *Klebsiella* además de haber sido las más prevalentes entre todos los inusuales, tuvieron los niveles de resistencia más altos a la amoxicilina.

Tabla 2. Perfil de Resistencia de microorganismos periodontopáticos e inusuales de acuerdo al diagnóstico periodontal.

Microorganismo	Tetraciclina			Ciprofloxacina			Ciprofloxacina		
	PC	PA	Sano	PC	PA	Sano	PC	PA	Sano
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1/13 (7.7)	0/7 (0)	0/3 (0)	0/13 (0)	0/7 (0)	0/3 (0)	0/13 (0)	0/7 (0)	0/3 (0)
<i>P. gingivalis</i>	1/48 (2.1)	1/26 (3.8)	0	0/48 (0)	1/26 (3.8)	0	0/48 (0)	1/26 (3.8)	0
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	3/22 (13.6)	2/14 (14.3)	0/2 (0)	2/22 (9.1)	2/14 (14.3)	0/2 (0)	2/22 (9.1)	2/14 (14.3)	0/2 (0)
<i>T. forsythia</i>	0/4 (0)	0/4 (0)	0	0/4 (0)	0/4 (0)	0	0/4 (0)	0/4 (0)	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	10/55 (18.2)	7/29 (24.1)	1/5 (20)	0/55 (0)	0/29 (0)	0/5 (0)	0/55 (0)	0/29 (0)	0/5 (0)
Bacilos Gran negativos no fermentadores	10/16 (62.5)	3/9 (33.3)	0/1 (0)	1/16 (6.3)	0/9 (0)	0/1 (0)	1/16 (6.3)	0/9 (0)	0/1 (0)

Microorganismo	Metronidazol			Azitromicina			Clindamicina		
	PC	PA	Sano	PC	PA	Sano	PC	PA	Sano
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	13/13 (100)	5/7 (71.4)	3/3 (100)	4/13 (30.8)	1/7 (14.3)	0/3 (0)	11/13 (84.6)	3/7 (42.9)	3/3 (100)
<i>P. gingivalis</i>	1/48 (2.1)	1/26 (3.8)	0	1/48 (2.1)	1/26 (3.8)	0	0/48 (0)	1/26 (3.8)	0
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	2/22 (9.1)	2/14 (14.3)	0/2 (0)	1/22 (4.5)	3/14 (21.4)	1/2 (50)	0/22 (0)	0/14 (0)	0/2 (0)
<i>T. forsythia</i>	0/4 (0)	0/4 (0)	0	1/4 (25)	0/4 (0)	0	0/4 (0)	0/4 (0)	0

En todos los casos, $p > 0.05$, prueba χ^2 cuadrado de Pearson.
 PC: Periodontitis Crónica, PA: Periodontitis Agresiva.
 Los valores para cada microorganismo se presentan en n resistentes/n total (% de resistencia).
 *Los bacilos Gram negativos no fermentadores no fueron probados contra la amoxicilina debido a su naturaleza resistente a este antimicrobiano.

Tabla 3. Concentraciones Inhibitorias Mínimas ($\mu\text{g/ml}$) de los antibióticos probados contra microorganismos periodontopáticos de pacientes con Enfermedad Periodontal.

Microorganismo	RANGO CIM	Tetraciclina		Ciprofloxacina		Amoxicilina	
		PC	PA	PC	PA	PC	PA
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	0.047	<0.016 - 0.38
	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	0.047	<0.016 - 0.38
	CIM 90	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	0.047	<0.016 - 0.38
<i>P. gingivalis</i>	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38
	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38
	CIM 90	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38
	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38
	CIM 90	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38
<i>T. forsythia</i>	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38
	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38
	CIM 90	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.002	<0.002 - 0.47	<0.016	<0.016 - 0.38

Microorganismo	RANGO CIM	Metronidazol		Azitromicina		Clindamicina	
		PC	PA	PC	PA	PC	PA
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	CIM 50	8 - >256	4 - >256	0.032 - >256	<0.016 - 12	2 - >256	0.38 - >256
	CIM 50	8 - >256	4 - >256	0.032 - >256	<0.016 - 12	2 - >256	0.38 - >256
	CIM 90	8 - >256	4 - >256	0.032 - >256	<0.016 - 12	2 - >256	0.38 - >256
<i>P. gingivalis</i>	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 2	<0.016 - 8	<0.016 - 0.75	<0.016 - 0.38
	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 2	<0.016 - 8	<0.016 - 0.75	<0.016 - 0.38
	CIM 90	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 2	<0.016 - 8	<0.016 - 0.75	<0.016 - 0.38
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 3	<0.016 - 24	<0.016 - 0.5	<0.016 - 0.19
	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 3	<0.016 - 24	<0.016 - 0.5	<0.016 - 0.19
	CIM 90	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 3	<0.016 - 24	<0.016 - 0.5	<0.016 - 0.19
<i>T. forsythia</i>	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 4	<0.016 - 12	<0.016 - 0.16	<0.016 - 0.16
	CIM 50	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 4	<0.016 - 12	<0.016 - 0.16	<0.016 - 0.16
	CIM 90	<0.016	<0.016 - 0.38	<0.016 - 4	<0.016 - 12	<0.016 - 0.16	<0.016 - 0.16

En todos los casos, $p > 0.05$, prueba χ^2 cuadrado de Pearson.
 PC: Periodontitis Crónica, PA: Periodontitis Agresiva.

Tabla 1. Microorganismos estudiados para sensibilidad in vitro de acuerdo al diagnóstico periodontal.

Microorganismo	Periodontitis Crónica n=127	Periodontitis Agresiva n=68	Sanos y/o Gingivitis n=11	Total
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	13	7	3	23
<i>P. gingivalis</i>	48	26	0	74
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	22	14	2	38
<i>T. forsythia</i>	4	4	0	8
<i>Enterobacteriaceae</i>	55	29	5	89
Bacilos Gran negativos no fermentadores	16	9	1	26

Tabla 4. Concentraciones Inhibitorias Mínimas ($\mu\text{g/ml}$) de los antibióticos probados contra microorganismos inusuales de pacientes con Enfermedad Periodontal.

Microorganismo		Tetraciclina		Ciprofloxacina		Amoxicilina	
		PC	PA	PC	PA	PC	PA
Enterobacteriaceae	RANGO	0.16	>256	<0.002	>32	0.96	>256
	CIM	2	>256	0.06	0.012	96	>256
	CIM 50 CIM 90	9.6	>256	0.338	0.064	>256	>256
Bacilos Gram negativos no fermentadores	RANGO	1	>256	<0.002	1.5	*	*
	CIM	6	3	0.1575	0.125		
	CIM 50 CIM 90	137.6	>256	1.15	0.125		

En todos los casos, $p > 0.05$, prueba χ^2 cuadrado de Pearson.

PC: Periodontitis Crónica, PA: Periodontitis Agresiva.

*Los bacilos Gram negativos no fermentadores no fueron probados contra la amoxicilina debido a su naturaleza resistente a este antimicrobiano.

Tabla 5. Especies de Enterobacteriaceae resistentes a Amoxicilina y Tetraciclina.

Microorganismo	Amoxicilina	Tetraciclina
<i>Enterobacter cloacae</i> (23)	20 (87%)	3 (13%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (17)	17 (100%)	4 (23.5%)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (11)	11 (100%)	3 (27.2%)
<i>Enterobacter gergoviae</i> (11)	2 (18.1%)	1 (9%)
<i>Serratia liquefaciens</i> (6)	4 (66.6%)	2 (33.3%)

DISCUSIÓN

El tratamiento antimicrobiano de la enfermedad periodontal requiere de la evidencia científica que demuestre su eficacia clínica⁽¹⁵⁾. Los efectos de un determinado tratamiento antimicrobiano pueden presentarse mejor en unos pacientes que en otros y en este punto es importante resaltar el tipo de microbiota subgingival que tienen los pacientes. Winkel ha demostrado en un estudio previo, que el tratamiento con amoxicilina más metronidazol parece ser más efectivo en pacientes con periodontitis crónica por *P. gingivalis*⁽¹⁶⁾. Sin embargo no sólo conocer la microbiota presente sino el perfil de sensibilidad que presentan los microorganismos a determinados antimicrobianos puede aportar mayor claridad acerca de la conducta terapéutica a seguir.

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias periodontopáticas ha sido evaluada por otros autores y se ha discutido la diferencia entre los perfiles de sensibilidad de algunas de estas bacterias en diferentes poblaciones⁽¹⁷⁾. En el presente estudio se usó el E-test® para la determinación de la CIM de los antimicrobianos probados, pues este método ha sido ampliamente usado y validado en bacterias aisladas de la microbiota subgingival^(9,18).

En este estudio se encontró una baja prevalencia de cepas de *A. actinomycetemcomitans* resistentes a tetraciclina, hallazgo que coincide con el estudio de van Winkelhoff en el que se compararon las proporciones de resistencia entre periodontopáticos de Holanda y España⁽³⁾. Resultados similares se encontraron para la amoxicilina y para la azitromicina, pues cerca de la tercera parte de los aislados en ambos estudios fueron resistentes a estos antibióticos. En contraste, para el metronidazol y la clindamicina se encontró una mayor proporción de resistencia de este microorganismo en el presente estudio que en el europeo. Esta misma observación fue reportada por otro grupo⁽⁶⁾. La alta resistencia al metronidazol de este microorganismo ha sido explicada por el hecho de que el metabolito hidroxilado de este fármaco es 3 a 4 veces más activo contra anaerobios estrictos que contra este tipo de bacteria capnófila^(19,20).

Al comparar la CIM90 del *A. actinomycetemcomitans* reportada en un estudio con 25 pacientes brasileños con periodontitis agresiva⁽²¹⁾ con la de este estudio (tabla 3), se observó una mayor CIM90 en los aislados colombianos para amoxicilina (2 en Brasil, vs. >256 en Colombia), tetraciclina (1.5 vs. 3), clindamicina (8 vs. >256) y metronidazol (>32 vs. >256). Esto muestra que en nuestro país, a pesar de presentar unas condiciones socioculturales semejantes a Brasil, hay una mayor resistencia

de este microorganismo a los antibióticos probados, lo que se explicaría por el uso de antibióticos de forma indiscriminada, o por el hecho de que este estudio es más reciente, y el tiempo juega un papel importante en la evolución de los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias, mas aún en las que crecen en biopelículas como es el caso de la microbiota subgingival.

En una investigación publicada recientemente, se evaluó la resistencia de 5 bacterias periodontopatógenas a 10 antimicrobianos en 20 pacientes con periodontitis crónica, mediante las técnicas de difusión de disco y microdilución en caldo. En ese estudio se encontró que el 25% de 8 aislados de *T. forsythia* fueron resistentes a la ciprofloxacina⁽⁵⁾. En contraste, no se encontró resistencia de *T. forsythia* a la ciprofloxacina, esta bacteria mostró alta sensibilidad a los antimicrobianos probados y sólo una cepa fue resistente a la azitromicina (tabla 2).

Se encontró una baja prevalencia de resistencia de *P. gingivalis* a tetraciclina, metronidazol, amoxicilina y azitromicina y se encontraron proporciones similares de cepas sensibles de *P. gingivalis* comparadas con los hallazgos de un estudio previo en población colombiana, en abscesos periodontales⁽²²⁾. Similares resultados fueron reportados en el estudio España-Holanda⁽⁹⁾. Sin embargo en un estudio que evaluó la sensibilidad por otros métodos pruebas (difusión de disco y microdilución en caldo) se reportó una alta resistencia de este microorganismo a la clindamicina y la ciprofloxacina⁽⁵⁾. Aunque las técnicas no son comparables, es importante señalar que las CIM cuando son determinadas por técnicas de E-test son más bajas que cuando lo son por otros métodos de prueba⁽²³⁾.

En comparación con resultados previos del estudio de abscesos periodontales en Colombia⁽²²⁾, en este se obtuvieron mayores proporciones de cepas resistentes de *P. intermedia/nigrescens* a tetraciclina, metronidazol y azitromicina. Se encontró en pacientes con periodontitis crónica 13% de resistencia para Tetraciclina, 5% para Azitromicina y 9% para Metronidazol contra 0% en el reporte de abscesos. En el caso de la amoxicilina los resultados fueron similares (13.6% en periodontitis crónica contra 14.2% en el reporte de abscesos). *P. intermedia/nigrescens* son señaladas en varios estudios con resistencia a los betalactámicos debido a la presencia de enzimas betalactamasas^(3,5), y en algunos países esto ha conducido a sugerir terapias combinadas de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (amoxicilina/ácido clavulánico). Aunque los resultados de este estudio nos muestran una resistencia baja a la amoxicilina, es importante continuar vigilando el comportamiento de este antimicrobiano en las especies de *Prevotella* aisladas.

Los bacilos Gram negativos entéricos estudiados mostraron altos niveles de sensibilidad a la ciprofloxacina y variados a la amoxicilina y tetraciclina tal como se ha visto previamente^(9,24,25). En este estudio se encontraron especies de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* resistentes a la amoxicilina, lo que es frecuente en estos géneros debido a la producción de betalactamasas que degradan activamente este antibiótico. Es por esto que las CIM observadas en este tipo de aislados fueron muy altas y son comparables a las observadas en cepas asociadas a infecciones nosocomiales^(26,27). Aunque el papel que juegan los bacilos Gram negativos entéricos en la enfermedad periodontal aún no está claramente dilucidado, algunos autores han sugerido que la presencia de estas bacterias en la bolsa periodontal no sólo podrían retrasar el tratamiento de la enfermedad periodontal sino que también podría tener importancia como foco de infecciones para el hombre⁽²⁸⁾. El hallar este tipo bacterias y tan resistentes a antibióticos comúnmente usados en enfermedad periodontal, debe ser tema de estudios más profundos en nuestra población.

Los hallazgos de los resultados *in vitro* no necesariamente representan lo que debe ocurrir en el tejido *in vivo*. Sin embargo, sugieren que la terapia combinada de amoxicilina y metronidazol tiene un soporte para su uso como terapia coadyuvante en pacientes con periodontitis asociada a microorganismos anaerobios, mientras que cuando existen organismos inusuales el uso de la ciprofloxacina sería más efectivo.

AGRADECIMIENTOS

Manifestamos nuestros agradecimientos a los odontólogos periodoncistas participantes en los diferentes Centros: Alexandra Barón,

Universidad El Bosque; Astrid Giraldo, Instituto de Ciencias de la Salud; Sergio Mantilla y Luz Elena Archila, Universidad Santo Tomás; Ferney González, Universidad Metropolitana; Antonio Díaz, Universidad de Cartagena; Alejandro Botero, Universidad de Antioquia y Tatiana Chacón, Universidad Autónoma de Manizales.

Este estudio fue financiado parcialmente por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, Francisco José de Caldas - COLCIENCIAS, No. 1308-04-13001.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Haffajee AD. Systemic antibiotics: to use or not to use in the treatment of periodontal infections. That is the question. *J Clin Periodontol* 2006; 33:359-361.
- Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2004; 75:1553-1565.
- van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005; 32:893-898.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5:78-111.
- Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M. Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:244-252.
- Eick S, Pfister W, Straube E. Antimicrobial susceptibility of anaerobic and capnophilic bacteria isolated from odontogenic abscesses and rapidly progressive periodontitis. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12:41-46.
- Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5:166-168.
- Helovu H, Hakkarainen K, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8:75-79.
- Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5:149-154.
- 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol* 1999; 4:i, 1-112.
- Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1:48-57.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Anaerobic Bacteria - Approved Standard Fifth Edition. NCCLS Document M11-A5. 2001. Ref Type: Generic.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement (M100-S15). 2005. Ref Type: Generic.
- Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol* 2005; 8:518-524.
- van Winkelhoff AJ. Antibiotics in periodontics: are we getting somewhere? *J Clin Periodontol* 2005; 32:1094-1095.
- Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van d, V, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2001; 28:296-305.
- van Winkelhoff AJ, Herrera GD, Winkel EG, Iemijn-Kippuw N, Vandembroucke-Grauls CM, Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2000; 27:79-86.
- Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2197-2203.
- Pavicic MJ, van Winkelhoff AJ, de GJ. In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2634-2638.
- Walker CB. Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontol* 2000 1996; 10:12-28.
- Tinoco EM, Beldi MI, Campedelli F, Lana M, Loureiro CA, Bellini HT, et al. Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. *J Periodontol* 1998; 69:1355-1363.
- Jaramillo A, Arce RM, Herrera D, Betancourth M, Botero JE, Contreras A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. *J Clin Periodontol* 2005; 32:1213-1218.
- Eick S, Schmitt A, Sachse S, Schmidt KH, Pfister W. In vitro antibacterial activity of fluoroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:553-556.
- Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16:306-310.
- Sedgley CM, Samaranyake LP. Antimicrobial susceptibility of oral isolates of *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* from a southern Chinese population. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13:315-321.
- Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis* 2005; 9:216-224.
- Paniara, Platsouka E, Dimopoulou H, Tzelepi E, Miriagou V, Tzouveleki LS. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Chemother* 2000; 12:204-207.
- Barbosa FC, Irino K, Carbonell GV, Mayer MP. Characterization of *Serratia marcescens* isolates from subgingival biofilm, extraoral infections and environment by prodigiosin production, serotyping, and genotyping. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:53-60.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Adriana Jaramillo Echeverri.
inv-odon@univalle.edu.co

Trabajo recibido el 18/03/2008.

Aprobado para su publicación el 09/07/2008.