



Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución

Antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by diffusion and dilution test

Suscetibilidade aos antibióticos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por difusão e teste de diluição

María C. Flor-Chávez ^I
maria.florc@ug.edu.ec

Otto V. Campos-Mancero ^{II}
otto.camposm@ug.edu.ec

Recibido: 30 de enero de 2017 * **Corregido:** 9 de febrero de 2017 * **Aceptado:** 14 marzo de 2017

^I Magister en Odontología con Especialización en Periodoncia e Implantología, Diploma Superior en preparación Multirradiculares, Doctora en Odontología, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

^{II} Magister en Investigación Clínica y Epidemiológica, Diploma Superior en Diseño Curricular por Competencias, Diploma Superior en Preparación de Multirradiculares, Diploma Superior en Sistemas de Educación Superior Modular Basados en Créditos Acumulables y Transferibles, Doctor en Odontología, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

Resumen.

La enfermedad periodontal comprende un grupo de estados inflamatorios de los tejidos de soporte dentario inducidos por bacterias. Se ha demostrado que la placa bacteriana es uno de los factores etiológicos clave junto con la respuesta defensiva del huésped en la iniciación y persistencia de las lesiones inflamatorias periodontales. La periodontitis es una enfermedad infecciosa del periodonto causada tanto por el sobrecrecimiento de patógenos periodontales en la microbiota subgingival de individuos susceptibles como por la respuesta inmuno-inflamatoria local estimulada por ellos. Hay dos formas clínicas de periodontitis, periodontitis agresiva y periodontitis crónica, caracterizadas por una destrucción progresiva de los tejidos que conforman el periodonto de inserción y de protección. Existen evidencias que asocian e implican a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en infecciones orales y extraorales. Datos clínicos y microbiológicos asocian a esta bacteria con la iniciación, progresión y recurrencia de la enfermedad periodontal agresiva localizada. Estudios han revelado que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* posee diferentes susceptibilidades a antibióticos, observándose una alta susceptibilidad a diferentes antibióticos. El tratamiento de la enfermedad periodontal habitualmente se realiza con terapia mecánica (destraje y pulido radicular), sin embargo en algunos tipos de periodontitis (agresivas), el tratamiento es en conjunto con antibióticos al estar presente el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (un patógeno difícil de erradicar), y no se considera mayormente su serotipo. En este estudio se pretende ver la susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su susceptibilidad antibiótica a la Amoxicilina y al metronidazol.

Palabras Clave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; capnófilico; susceptibilidad; metronidazol.

Abstract.

Periodontal disease comprises a group of bacterially induced inflammatory states of tooth support tissues. Bacterial plaque has been shown to be one of the key etiologic factors along with host defensive response in the initiation and persistence of periodontal inflammatory lesions. Periodontitis is an infectious disease of the periodontium caused both by the overgrowth of periodontal pathogens in the subgingival microbiota of susceptible individuals and by the local immune-inflammatory response stimulated by them. There are two clinical forms of periodontitis, aggressive periodontitis and chronic periodontitis, characterized by a destruction of the tissues that make up the periodontium of insertion and protection. There is evidence that associates and implicates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in oral and extraoral infections. Clinical and microbiological data associate this bacterium with the initiation, progression and recurrence of localized aggressive periodontal disease. Studies have revealed that *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* possesses different susceptibilities to antibiotics, being observed a high susceptibility to different antibiotics. The treatment of periodontal disease is usually performed with mechanical therapy (scaling and root polishing), however in some types of (aggressive) periodontitis, the treatment is in conjunction with antibiotics as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (a pathogen difficult to eradicate) And its serotype is not considered mostly. In this study we intend to see the antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their antibiotic susceptibility to Amoxicillin and metronidazole.

Keywords: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; capnophilic; susceptibility; metronidazole.

Resumo.

A doença periodontal compreende um grupo de estados inflamatórios induzidos por bactérias de tecidos de suporte de dentes. A placa bacteriana mostrou ser um dos principais fatores etiológicos juntamente com a resposta defensiva do hospedeiro na iniciação e persistência de lesões inflamatórias periodontais. A periodontite é uma doença infecciosa do periodonto causada tanto pelo supercrescimento de patógenos periodontais na microbiota subgingival de indivíduos suscetíveis como pela resposta imuno-inflamatória local estimulada por eles. Existem duas formas clínicas de periodontite, periodontite agressiva e periodontite crônica, caracterizada pela destruição dos tecidos que compõem o periodonto de inserção e proteção. Há evidências que associam e implicam *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em infecções orais e extraorais. Dados clínicos e microbiológicos associam esta bactéria à iniciação, progressão e recorrência da doença periodontal agressiva localizada. Estudos têm revelado que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* possui diferentes susceptibilidades aos antibióticos, sendo observada uma elevada susceptibilidade a diferentes antibióticos. O tratamento da doença periodontal é geralmente realizado com terapia mecânica (escamação e polimento de raiz), no entanto em alguns tipos de periodontite (agressiva), o tratamento é em conjunto com antibióticos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (um patógeno difícil de erradicar) E seu sorotipo não é Considerados na sua maioria. Neste estudo pretende-se ver a susceptibilidade aos antibióticos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e sua susceptibilidade aos antibióticos para Amoxicilina e metronidazol.

Palavras chave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; capnófila; susceptibilidade; metronidazole.

Introducción.

La enfermedad periodontal comprende un grupo de estados inflamatorios de los tejidos de soporte dentario inducidos por bacterias. Se ha demostrado que la placa bacteriana es uno de los factores etiológicos clave junto con la respuesta defensiva del huésped en la iniciación y persistencia de las lesiones inflamatorias periodontales. En la periodontitis los anaerobios gram-negativos son denominados periodontopatógenos, entre ellos están: *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythensis* son considerados actualmente como agentes primarios en la etiología de la periodontitis. En las diferentes formas de periodontitis se han relacionado muchas especies microbianas, algunas de estas cuentan con evidencia convincente de su importancia como causante de enfermedad periodontal. Una de las asociaciones más fuertes entre un patógeno sospechado y enfermedad periodontal destructiva corresponde al *A. actinomycetemcomitans*.

Morfológicamente el Aggregatibacter actinomycetemcomitans es un microorganismo anaerobio facultativo y capnofílico, que necesita para su crecimiento un medio con CO₂ al 5-10% en presencia de O₂ o anaeróticamente, necesitando entre 48 a 72 horas para obtener colonias bien desarrolladas. Es un coco bacilo no móvil gram negativo, que mide $0.4 \pm 0.1 \times 1.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$; crece en el medio TSBV, tiene la habilidad de adherirse fuertemente a sí mismos o a elementos como el vidrio, plástico e hidroxiapatita. El *A. actinomycetemcomitans* presenta 6 serotipos *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* actualmente definidos, y además existe entre un 3% y 8% que se mantiene como no serotipable. Se han observado diferentes comportamientos de *A. actinomycetemcomitans* según sus diferentes serotipos. El serotipo *b* ha sido asociado a periodontitis agresiva localizada y periodontitis del adulto, ya que se le adjudicó un elevado potencial patogénico ya que presenta una mayor

leucotoxicidad debido a un defecto en la regulación de la producción de leucotoxina. Algunos estudios han asociado al *serotipo b* altamente leucotóxico con la conversión de sitios sanos a sitios enfermos; y con destrucción periodontal avanzada.

Carranza, manifestó que Las manifestaciones clínicas de la enfermedad periodontal son producto de una compleja interacción entre el agente causal, en este caso bacterias específicas de la placa dental, y los

Tejidos del huésped. La inflamación es la característica patológica central de la enfermedad periodontal. En un huésped sano, sus mecanismos de defensa regulan cantidades variables de placa bacterianas sin que haya inflamación. (1) En las diferentes formas de periodontitis se han relacionado muchas especies microbianas, algunas de estas cuentan con evidencia convincente de su importancia como causante de enfermedad periodontal. Una de las asociaciones más fuertes entre un patógeno sospechado y enfermedad periodontal destructiva corresponde al *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (2)

En la periodontitis también se encuentran otros patógenos relacionados, entre ellos están: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptoestreptococcus micros*, y espiroquetas. El origen de estas especies es exógeno; no forman parte de la flora habitual y el tratamiento debe tener como objetivo su control y modificación de la flora hacia especies gram positivas compatibles con salud periodontal. (2)

El *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, desempeña un papel muy importante como patógeno en formas agresivas y recurrentes de la periodontitis. La prevalencia del *Aggregatibacter*

Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución

actinomycetemcomitans, en la periodontitis agresiva localizada es casi del 90 % y del 30% - 50% en periodontitis agresiva generalizada. (1)

El *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es un miembro de la microbiota oral humana normal. También se encuentra en las cavidades orales de varios primates y otros mamíferos. Su hábitat primario no se ha definido pero se asume que es probablemente la placa dental en el surco dentario. No se encuentra en individuos edentulos. (3)

Pajukanta R; et al, 1992, (4) en una revisión de un estudio clínico y microbiológico sobre el efecto de diferentes antimicrobianos realizado en pacientes con periodontitis agresiva generalizada, en el que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b fue detectado en el 81.4% de los sujetos en estudio, se encontró que la combinación de metronidazol más amoxicilina redujo significativamente la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mientras que el metronidazol y doxiciclina no redujo su número significativamente.

En las diferentes formas de periodontitis se han relacionado muchas especies microbianas, algunas de estas cuentan con evidencia convincente de su importancia como causante de enfermedad periodontal. Una de las asociaciones más fuertes entre un patógeno sospechado y enfermedad periodontal destructiva corresponde al *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (2)

Placa bacteriana.

Se forma en una secuencia de eventos ordenados y previsibles que se inicia con la deposición de una película de glicoproteínas salivales llamada películas adquirida, seguida por la colonización primaria por parte de algunos microorganismos principalmente cocos gram positivos aerobios, luego una colonización secundaria por otras especies bacilos que interactúan con los

colonizadores primarios, posteriormente se van incorporando secuencialmente especies gram negativos anaerobias, completando así una placa madura. (5)

La biopelícula está constituida por una o más comunidades de microorganismos embebidos en un glicocalix adheridos a una superficie sólida, lo que permite a los microorganismos colonizar diferentes superficies y gozar de beneficios como:

- protección contra microorganismos competidores
- protección contra los factores defensivos del huésped
- resistencia antibiótica
- facilita captación de nutrientes
- permite alimentación cruzada
- facilita la eliminación de productos metabólicos potencialmente dañinos
- desarrollo de un ambiente fisicoquímico favorable.

El concepto de biopelícula hace referencia de que las bacterias no están dispuestas de manera arbitraria en la placa dentaria, sino formando comunidades altamente organizadas donde ocupan un lugar y una función determinada. (6)

Los mecanismos que explican la resistencia a los antimicrobianos por parte de la biopelícula no está totalmente dilucidado, (7) pero algunos principios generales han sido descritos. Los microorganismos que crecen formando una biopelícula poseen una resistencia antibiótica 1000 a 1500 veces superior a la que poseen las formas aisladas (llamadas planctónicas). Los mecanismos que aumentan la resistencia de las biopelículas difieren no sólo entre distintas especies, sino ante distintos antimicrobianos y entre los distintos hábitat en los que se desarrolla la biopelícula. Un importante mecanismo de resistencia parece ser la lenta tasa de crecimiento que poseen las bacterias dentro de la biopelícula, otorgándoles resistencia a muchos antimicrobianos, pero no a todos. Se ha demostrado en numerosos estudios de resistencia antimicrobiana, que variaciones en el estado

nutricional, tasa de crecimiento, temperatura, pH y exposición previa sub letal a antimicrobianos puede provocar una variación en la respuesta por parte de la biopelícula. (8) La matriz extracelular aunque no es una barrera importante por sí misma, retarda la difusión de los antimicrobianos. Por ejemplo agentes antimicrobianos fuertemente cargados pueden fallar en alcanzar las zonas más profundas de la biopelículas, debido que esta actuaría como un lugar de intercambio de iones removiendo esas moléculas. (9) Además puede concentrar cantidades variables de enzimas extracelulares como beta lactamasas, formaldehído liasas y formaldehído deshidrogenasa que degradarían antibióticos de carga positiva e hidrofílicos. Existe en el interior de la biopelículas un intercambio de material genético que le confiere de resistencia antimicrobiana, incluso si la bacteria se alejara de ésta. Se propone en recientes investigaciones que existe una subpoblación dentro del biofilm que serían “súper-resistentes” a ciertos tipos de antibióticos, y no se presentaría esta característica si la bacteria estuviera en su forma planctónica. (10)

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.**

El Aggregatibacter actinomycetemcomitans, desempeña un papel muy importante como patógeno en formas agresivas y recurrentes de la periodontitis. La prevalencia del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, en la periodontitis agresiva localizada es casi del 90 % y del 30% - 50% en periodontitis agresiva generalizada. (11)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, se deriva de las palabras griegas, actes, significando el rayo, debido a la estrella en la tapa de la colonia del agar y, los mycetes, significando el hongo, porque los actinomicetos eran originalmente un hongo. La palabra comitans, proveniente del latín, significa en común o acompañado de *Actinomyces*, reflejando la asociación entre *Actinobacillus* con *Actinomyces*. La presencia de los *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,

Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución

fue encontrada, ocasionalmente en lesiones actinomicóticas y en otras, asociación con *Actinomyces*. El aislamiento del *Actinobacillus* de lesiones actinomicóticas no era constante. (12)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans fue implicado por primera vez como causa de periodontitis juvenil en 1976, ahora llamada agresiva en la nueva clasificación. (13,1)

Actinobacillus actinomycetemcomitans fue reconocido como un miembro de la microbiota oral humana normal. También se encuentra en las cavidades orales de varios primates y otros mamíferos. Su hábitat primario no se ha definido pero se asume que es probablemente la placa dental en el surco dentario. No se encuentra en individuos edentulos. (14)

Morfología.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es un microorganismo anaerobio facultativo y capnófilo, que necesita para su crecimiento un medio con CO₂ al 5-10% en presencia de O₂ o anaeróticamente, necesitando entre 48 a 72 horas para obtener colonias bien desarrolladas. A temperatura de 37°C, con un PH de 7-8.5, y puede ser estimulado reactivos de bajo peso molecular como lo son las hormonas esteroideas. (15)

Es un coco bacilo no móvil Gram negativo, que mide $0.4 \pm 0.1 \times 1.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$, en el existe un predominio de las formas bacilares por sobre las cocáceas, no produce esporas y no presenta motilidad. (16) Crece en el medio TSBV, no crece en agar MacConkey, y puede favorecer su crecimiento el uso de suplementos en el medio de cultivo como extractos de levadura o cisteína. Tiene la habilidad de adherirse fuertemente a sí mismos o a elementos como el vidrio, plástico e hidroxiapatita. (3) Se piensa que su adherencia es debido a la presencia de fibras grandes ligadas en la superficie de la bacteria. (17) En un medio de cultivo sólido como el agar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se adhiere y forma colonias circulares de 0.5 a 1 mm de diámetro con

bordes ligeramente irregulares. Su aspecto es rugoso y translúcido con un centro en forma de estrella, que es atribuido a la presencia de fimbrias. (18)

Serotipo.

Serotipo bacteriano es definido como una población antigénicamente distinta de un especie de microorganismo, que se diferencia de otras subpoblaciones por medio de pruebas serológicas (antígeno anticuerpo). Las estructuras con capacidad antigénica son numerosas en las bacterias, una de las estructuras más importantes en medicina corresponde al antígeno O, un lipopolisacárido componente de la pared celular de bacterias gram negativas. En un intento de combatir la infección bacteriana las células defensivas producen anticuerpos específicos contra estos componentes bacterianos permitiendo subdividir las especies. El *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* presenta 6 serotipos *a, b, c, d, e, f* actualmente definidos, y además existe entre un 3% y 8% que se mantiene como no serotipable. (19)

La mayoría de los pacientes con enfermedad periodontal que presentan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sólo se encuentran asociado a un serotipo únicamente. Múltiples serotipos han sido encontrado en menos de 10% de los pacientes con enfermedad periodontal positivos para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (20)

Estudios de prevalencia y distribución de serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en personas con enfermedad periodontal han demostrado que existe una mayor prevalencia del serotipo *b* en personas provenientes de EEUU, Finlandia, Brazil, mientras existe una mayor prevalencia del serotipo *c* en China, Japón, Tailandia, Korea. (20)

Un estudio *in vitro* sobre la adhesión de los diferentes serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en implantes de titanio, reveló que el serotipo *a* fue el que presentó el mayor valor de adherencia, seguido por los serotipos *b*, *c*, *d*, y siendo el de menor valor el serotipo *e* de las cepas estudiadas. (21)

Factores de patogenicidad del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Los supuestos factores de virulencia del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pueden ser subdivididos en: (a) modulan la inflamación, (b) inducen la destrucción tisular, (c) inhiben la reparación del tejido. (21)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans exhibe numerosos factores de virulencia que permiten la colonización de la cavidad bucal. Estas características incluyen: unión a células epiteliales, unión a hidroxiapatita, invasión a células no fagocíticas, co-agregación con *Fusobacterium*, auto agregación y formación de biopelículas. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es capaz de secretar dos toxinas, una leukotoxina y una toxina distensora citoletal que facilitan la evasión de los mecanismos de inmuno defensa del huésped durante el proceso de colonización y contribuyen al proceso de patogénesis. (22)

Otros estudios han demostrado que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* produce tres proteínas autotransportadoras: AaE; EmA y ApiA (también conocida como Omp100), las que han sido inmunolocalizadas en la superficie celular. Estudios basados en PCR (Reacción de cadena de polimerasa) han demostrado que AaE, EmA y ApiA están presentes en todas las cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* examinadas. Un estudio realizado en pacientes con periodontitis, que se expusieron a un purificado de proteína ApiA, se produjo una fuerte reacción serológica sugiriendo la expresión de la proteína *in vivo*. (23)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es conocido por su habilidad para producir fimbrias estas estructuras extracelulares aparecen como paquetes de fibras paralelas de 5nm de diámetro, que se proyectan desde la superficie de la célula. (24) Se ha demostrado que las fimbrias en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cumplen la función de mediar en la autoagregación, unión a superficies abióticas y formación de biopelícula. (25)

Casi todas las cepas estudiadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* extruyen vesículas a su superficie. Estas vesículas pueden contener leucotoxinas, endotoxinas, bacteriocinas y poseen la capacidad de producir reabsorción ósea. Las vesículas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* también contienen adhesinas, aumentando la habilidad para unirse a las células epiteliales, además se ha relacionado estas vesículas como un evento importante para la invasión de células epiteliales. (26)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans ha demostrado que puede estimular la reabsorción ósea por diferentes mecanismos: lipopolisacárido, factores de proteólisis en sus microvesículas y material presente en su superficie. Recientemente ha sido identificada una molécula llamada GroEl, que parece actuar en forma directa con las células osteoclasticas.

Muchas bacterias poseen toxinas que inhiben la proliferación de los fibroblastos, pero la toxina termo lábil producida por el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es especialmente citotóxica. Esta toxina es una proteína de 50-KDa que inhibe la síntesis de ADN en el fibroblasto, (27) además *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cuenta con colagenasas que actúan disminuyendo la cantidad de colágeno de la matriz extracelular.

Factores que suprimen los mecanismos defensas.

Los mecanismos de defensa del huésped juegan un rol importante en el control de la concentración de bacterias presentes en la placa bacteriana. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* posee diversos factores capaces de suprimir estos mecanismos de defensa, como una proteína capaz de inhibir la producción de ADN, ARN y síntesis de proteínas proliferativas de células T. Una proteína de 60- kDa secretada por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que fue purificada demostró que producía una inhibición en la síntesis de IgG y IgM en linfocitos humanos. (28)

La región Fc de un anticuerpo es importante en la unión del anticuerpo con receptores específicos localizados en los leucocitos polimorfonucleares. Si otras proteínas compiten por unirse a esta región, la unión al anticuerpo podría verse inhibida, y por lo tanto la fagocitosis podría verse afectada significativamente. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* posee proteínas de unión a los receptores Fc. Tolo & Hegland demostraron que las moléculas de superficie de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* estaban asociados a material capsular y eran secretados al medio para unirse con la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG) esta unión inhibe la habilidad de opsonización de los anticuerpos para unirse a los leucocitos polimorfonucleares, y reducen la fagocitosis en un 90%; también se sugiere que estas moléculas pueden servir para inhibir la activación del complemento. (29)

La primera línea de defensa del huésped en contra de la invasión bacteriana es el reclutamiento de fagocitos en una determinada hacia los tejidos periodontales, proceso denominado quimiotaxis *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secreta un compuesto de bajo peso molecular que inhibe la quimiotaxis en leucocitos polimorfonucleares. Una proteína termoestable producida

Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución

por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibe la formación de peróxido de hidrógeno por parte de los leucocitos polimorfonucleares, además existen cepas resistentes al peróxido de hidrógeno. (29)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans tienen la capacidad para penetrar en las células epiteliales. Estudios *in vivo* han demostrado que este hecho ocurre en lugares específicos (en la pared epitelial, en los amplios espacios intracelulares de la superficie epitelial del saco, lado epitelial de la membrana basal, en el tejido conectivo y el hueso alveolar) y parte de un proceso dinámico y complejo. Involucra la unión de organismos a la célula huésped con la iniciación de algún tipo de señal, unión a un receptor, entrada a la célula por medio de una vacuola, escape de esa vacuola, rápida multiplicación, esparcimiento intracelular, salida de la célula y traspaso de célula a célula. El proceso de invasión es iniciado cuando *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* hace contacto con las microvellosidades de la célula huésped, este contacto produce una apertura sólo observada en células infectadas; por la cual el organismo penetra a la célula. Sugieren que el receptor primario para la invasión de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* corresponde a un receptor de transferina. Algunos datos sugieren que las integrinas, proteínas transmembrana involucradas en la adhesión de células eucarióticas a la matriz extracelular, podrían mediar la entrada del *Aggregatibacter*, lo cual podría representar un segundo mecanismo de entrada. (30)

Toxina que provoca distensión citoletal se encuentra presente en varios tipos de bacterias patógenas como: *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp*, *H. ducreyi*, y ha sido identificada en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Estudios han demostrado que la toxina citoletal de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* causa distensión celular, mantiene a la célula en fase G2, provoca un agrandamiento del núcleo y fragmentación de la cromatina. Un estudio por Shenker et al

demonstró que los linfocitos eran significativamente más sensibles a la toxina citoletal que otros tipos celulares, sugiriendo que la toxina distensora podría tener una función como un factor inmunosupresivo. La toxina citoletal es producida gracias a 3 genes *cdt A*, *B* y *C*. La toxina propiamente tal es responsabilidad del gen *cdtB*, mientras *cdtA* y *cdtC* producen proteínas que están relacionadas con la interacción entre la toxina y la superficie celular de la célula hospedera. (31)

Terapia de las enfermedades periodontales

El tratamiento de la enfermedad periodontal consiste en la eliminación de la inflamación gingival y los factores que la ocasionan. (Ejemplo, acumulación de la placa favorecida por el cálculo y la formación de bolsas, restauraciones inadecuadas y zonas de impacción de alimentos. Tratamiento sistémico para resolver la lesión periodontal, combinada con la terapia local, está indicada en la periodontitis agresiva localizada y generalizada. En dichas anomalías se prescriben antibióticos sistémicos con el fin de suprimir por completo las bacterias que invaden los tejidos gingivales y pueden repoblar la bolsa luego del raspado y pulido radicular. (32)

El uso de la terapia antibiótica en el tratamiento de una enfermedad periodontal es utilizado como un coadyuvante del tratamiento mecánico convencional. El uso de antibiótico presupone adecuado diagnóstico clínico, complejo tratamiento mecánico y análisis microbiológico. El tratamiento mecánico bien puede no eliminar posible patógenos, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, del área gingival. Los patógenos pueden ser inaccesible a las intervenciones mecánicas debido a la capacidad para invadir los tejidos periodontales o los túbulos destinatarios (Adriaens y col 1988) o porque residen en sitios inaccesibles para los instrumentos periodontales. (33)

La eliminación o disminución adecuada de las bacterias periodonto patógenas en la microbiota subgingival es esencial para la curación periodontal. El desbridamiento radicular mecánico es un requisito para controlar la infección periodontal, y la mejoría clínica posterior al desbridamiento está directamente relacionada con el grado en el cual los microbios patógenos subgingival han sido eliminados. (34) Sin embargo, el desbridamiento mecánico subgingival convencional no suele erradicar todas las bacterias periodontopatógenas del ecosistema subgingival. (35) Los sitios con bolsas periodontales profundas, surcos, furca y concavidades son difíciles de acceder con los instrumentos periodontales. Por lo tanto, las bacterias periodontales pueden permanecer en esos sitios. Además, se han detectado bacterias periodontales en mucosa, lengua, amígdalas y encía (36) desde donde pueden colonizar la placa dental. También *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y espiroquetas son capaces de invadir las células gingivales epiteliales, el tejido conectivo subgingival y los túbulos dentinarios. (37) Además, la mayoría de las especies bacterianas residen en una biopelícula dentro de la bolsa subgingival, (9) y los microorganismos en biopelícula son más resistentes a la acción bactericida de los antibióticos, en comparación con las formas planctónicas (30). Por lo tanto, el tratamiento de la enfermedad periodontal sólo con agentes antimicrobianos puede, con frecuencia, no ser suficiente, y debe realizarse habitualmente la instrumentación mecánica, para desorganizar la biopelícula y eliminar el grueso de los depósitos bacterianos previamente al tratamiento antimicrobiano.

Puede afirmarse, en general, que la antibioterapia sistémica puede mejorar las condiciones microbiológicas y clínicas de los pacientes periodontales en cierta circunstancia. La monoterapia como antibiótica sistémica como auxiliares del tratamiento periodontal mecánico puede suprimir toda la carga bacteriana subgingival e inducir un cambio significativo en la microbiota subgingival. Sin embargo la antibioterapia como con un solo antimicrobiano no pueden eliminar de

manera predecible a microorganismos periodontales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

En un estudio realizado *in vitro* acerca de la susceptibilidad de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a 7 diferentes antimicrobianos se observó que poseía una alta susceptibilidad a las fluorquinolonas (ciprofloxacino, monofloxacino), buena susceptibilidad para la ampicilina/sulbactam y doxiciclina, moderada susceptibilidad a la azitromizina. La mayoría de las cepas estudiadas fue resistentes al metronidazol y a la roxitromizina. (39)

Un estudio *in vitro* acerca de la susceptibilidad de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a 6 antibióticos utilizando cepas de tipo rugoso y liso, en su forma planktonica y simulando la formación de biopelículas, demostró que el ciprofloxacino fue el más eficaz de los antimicrobianos utilizados, tetraciclina fue moderadamente eficaces, y ampicilina, eritromicina y cefalexina obtuvieron los menores efectos antimicrobianos. (40)

Una revisión de un estudio clínico y microbiológico sobre el efecto de diferentes antimicrobianos realizado en pacientes con periodontitis agresiva generalizada, en el que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b fue detectado en el 81.4% de los sujetos en estudio, se encontró que la combinación de metronidazol más amoxicilina redujo significativamente la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mientras que el metronidazol y doxiciclina no redujo su número significativamente. (41)

Materiales y métodos.

El estudio fue pacientes que acudieron para diagnóstico y tratamiento periodontal, en las clínicas integral de la facultad de odontología de la universidad Guayaquil, facultad Piloto de Odontología,

Criterios de Inclusión

Pacientes que acuden a la Clínica de Periodoncia de pre y post grado de la Universidad Piloto de Odontología Pacientes sanos, sin enfermedad periodontal; pacientes con enfermedad periodontal que se encuentran en la fase inicial del tratamiento periodontal.

Criterios de exclusión

Pacientes que recibieran tratamiento antibiótico en los últimos 6 meses; pacientes que estén en tratamiento o consuman antisépticos bucales; pacientes que hayan recibido terapia de tipo mecánica (destartraje o pulido radicular) en los últimos 6 meses.

Obtención de la muestra

- A- Se tomó saliva de pacientes que acudieron a la Universidad Piloto de Odontología, sin considerar su condición periodontal ni su estado de salud bucal, se les hizo juntar saliva y depositarla en un tubo estéril para trasportarlas al laboratorio.
- B- Otras muestras se obtuvieron del laboratorio de Microbiología LIAN las muestras así obtenidas se seleccionaron para este estudio sólo aquellas positivas para la presencia de *Aggregatibacter*, donde se le realizaron test de susceptibilidad antibiótica con dos metodologías diferentes para comprar sus resultados, y se sometieron a PCR (Reacción en cadena de polimerasa).

Procesamiento de las muestra de saliva en el laboratorio

Una vez llegadas las muestras de saliva al laboratorio se procedió a mezclar 200 μmL de saliva, en 5 ml de medio líquido TSBV, (tripticosa de soya, suero de caballo, bacitracina y vancomicina) la cual se deja por 24 horas en el Agitador orbital a 37 ° C. Al cabo de este tiempo se observó el crecimiento de bacterias en el tubo, como se muestra en el Anexo figura #1. Luego se procede a recolectar con un tórula estéril a las muestras adheridas en la pared del tubo de vidrio, la que posteriormente se siembra en un medio sólido (TSVB). En una placa TSBV se incuban de 48 a 72 horas a 37°C en una estufa con 5% de CO₂. Anexo2; luego se selecciona las bacterias de diferentes morfología con características del *A. actinomycetemcomitans* que crecieron en la placa de TSBV. Luego se selecciona y se vuelven a sembrar en agar TSVB A las 72 horas, posteriores se realizó el análisis de morfología macroscópica de colonias con el objeto a identificar la morfología característica que presenta *A. actinomycetemcomitans* Anexo3 Posteriormente se realizó en el termociclador el PCR de las colonias aisladas.

Una vez confirmada la presencia del *A. actinomycetemcomitans*, por medio del PCR, la misma que será sometida a susceptibilidad antibiótica. Para realizar los antibiogramas se utilizó el agar Mueller Hinton, y se utilizaron sensidiscos utilizando los siguientes antibióticos.

Para realizar el antibiograma se tomaron 2 a 3 colonias aisladas previamente y se realizó una suspensión de NaCl al 0.9%, después se comparó turbidez con el estándar Mc Farland 0.5 (método utilizado para estandarizar la turbidez dentro de 15 minutos posterior al ajuste de turbidez se procede a la inoculación de las placas en el agar Mueller Hinton con una tórula en tres direcciones (realizando giros de 60°) por toda la placa, dejándose impregnar por 15 minutos. Posteriormente se

aplicaron 5 sensidiscos (previamente refrigerados a +4°C.) para: Metronidazol, Amoxicilina y Clindamicina, separados cada 24 mm. (Del centro de un sensidisco al otro más cercano).

Discusión.

Una limitación de este estudio es en relación a la labilidad que presenta el periodontopatógeno estudiado (de cultivo complicado), desde el sitio de toma de muestra hasta su lugar de procesamiento en el laboratorio, por lo que parte de las muestras no fueron viables para cultivo y antibiograma, sin embargo, fue posible su detección y serotipificación por PCR.

Una explicación podrían sugerir que los serotipos más predominantes (a, b, c) posean una frecuencia mayor que el resto de los serotipos, o presenten características naturales que los hicieran más resistentes a las defensas del hospedero, también podría tener relación con factores de virulencia específicos que permitan una ventaja en la colonización por sobre los serotipos menos prevalentes.

En ninguna de las muestras presentes en este estudio fue posible aislar más de un serotipo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* desde un mismo individuo (100% prevalencia de un serotipo por paciente positivo para Aa). Estos resultados concuerdan con el estudio de distribución de serotipos realizados en EEUU (21) y China (18), donde el número de serotipos encontrados por paciente que solo poseían un serotipo fue de 87%, mientras el 10% correspondió a 2 serotipos y solo 3% poseían 3 serotipos. Un estudio realizado en Finlandia sobre la persistencia de colonización por parte de una misma cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* demostró que la colonización inicial por un serotipo era marcadamente persistente, incluso después de realizar terapias quirúrgicas y no quirúrgicas (se encontró mismo serotipo durante 10 años de control). (33)

Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución

Con respecto a la susceptibilidad antibiótica por serotipos, fueron realizadas con los antibióticos más usados en el tratamiento de la enfermedad periodontal, observando un 100% de resistencia antibiótica de todos los serotipos aislados para Metronidazol y Amoxicilina, las mismas que resultaron susceptibles.

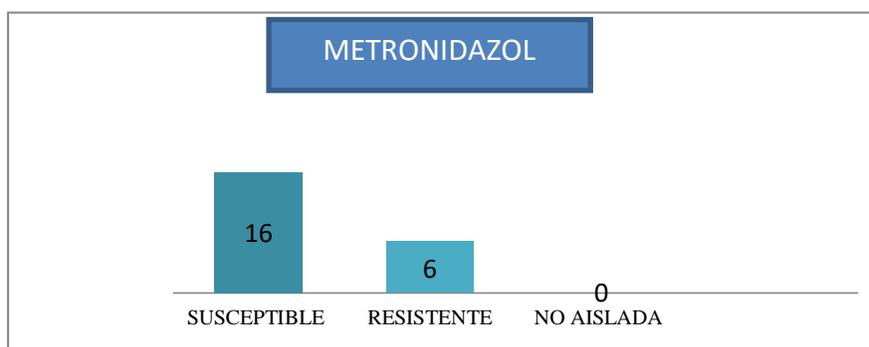
Conclusión.

Se determinó la susceptibilidad antibiótica de los serotipos encontrados por el método Kirby-Bauer a Metronidazol, Amoxicilina.

Resultados.

Fueron examinados 72 pacientes pertenecientes a la clínica integral de la Facultad de Odontología de la Universidad Guayaquil, de los cuales 22 muestras resultaron ser positivo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, las misma que fueron sometidas a una antibiograma.

Grafico # 1

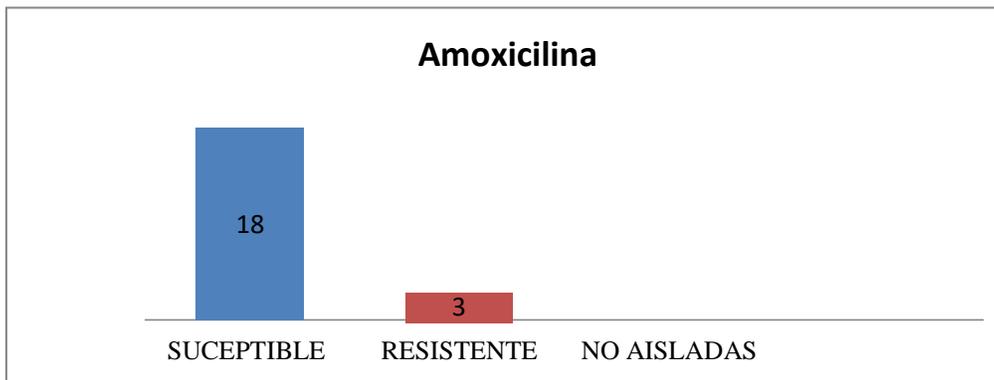


*Fuente: Laboratorio Lian
Autora: Cristina Flor*

El Metronidazol resulto susceptible en 14 muestras y en 6 resistente

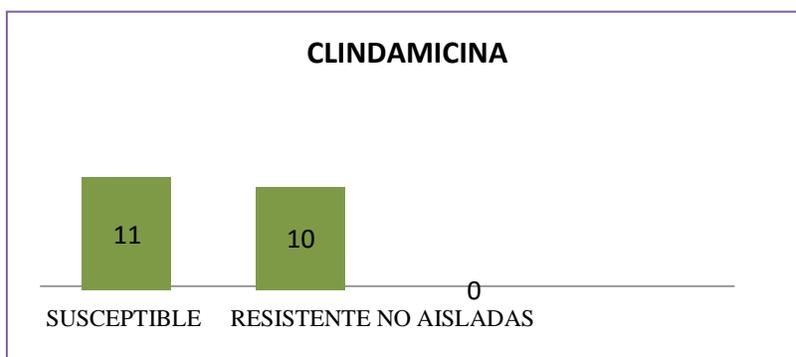
Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución

Grafico #2



Fuente: Laboratorio Lian
Autora: Cristina Flor

La Amoxicilina resulto susceptible en 18 muestras y resistente 3



Fuente: Laboratorio Lian
Autora: Cristina Flor

La Clindamicina resultó susceptible en 11 muestras y resistente 10

Recomendaciones.

En este estudio se comprobó que la Amoxicilina es el antibiótico de elección, frente a una periodontitis con la presencia de *a. actinomycetemcomitans*. Recomendando la combinación de la amoxicilina más metronidazol.

Bibliografía.

1. Aiskainen SA. Bacteriology of Dental infections. Eur Heart J. 1993 dec; Suppl K(1): p. 43-50.
2. Newman M, Takei H, Klokkevold P. Periodontología Clínica de Carranza. 11th ed. Carranza F, editor. New York: Amolca; 2014.
3. Bogert D, Welche R, Synder I. Analisis of the promoter regions of leukotoxin and minimally leukotoxic strains. Infect Immun. 1994 feb; 62(2): p. 501-508.
4. Pajukanta R, Asikainen S, Saarela M, Alaluusua S, Jousimies-Somer H. In vitro activity of azithromycin compared with that of erythromycin against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Antimicrob Agents Chemother. 1992 jun; 36(6): p. 1241-1243.
5. Melchora F, Lissera R, Battellino L. Película adquirida salival: Revisión de la Literatura. Acta Odontológica Venezolana. 200; 45(3).
6. Ojeda-Garcés J, Oviedo-García E, Salas L. *Streptococcus mutans* y caries dental. CES Odontología. 2013; 26(1): p. 44-56.
7. Herrera-Mendoza M. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA. 2004; 2(2): p. 71-80.
8. Nazar C J. Biofilms bacterianos. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 2007; 67(1): p. 61-72.
9. Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv Dent Res. 1995; 9(1): p. 55-62.
10. Scaliter J. Los Antibióticos no favorecen el intercambio de genes resistentes. Quo. 2016 abr; 4(2).
11. Brown M, Collier , Gilbert P. Influence of growth rate on the susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34(9): p. 1623-1628.
12. Williams P. Role of the cell envelope in bacterial adaptation to growth in vivo in infections. Biochimie. 1988 ago; 70(8): p. 981-1011.
13. Eick S, Seltman T, Pfister W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria with a single specie biofilm. J. clin Periodontol. 2004; 31(5): p. 376-383.
14. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. Scand J Dent. 1976 ene; 84(1): p. 1-10.
15. Blix I, Helgeland K, Kahler H, Lyberg T. LPs from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the expression of beta 2 integrins and L- selection in an ex vivo human whole blood system. Eur J Oral Sci. 1999; 107(1): p. 14-20.

16. Boehm D, Welch R, Snyder I, Domanis J. Role of Escheichia coli hemolysin in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect Immun.* 1990; 58(6): p. 1954-1964.
17. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 1982; 15(4): p. 606-609.
18. Christerson L, Slots J, Rosling B, Genco R. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1985; 12(6): p. 465-476.
19. Carranza F, Saglie R, Newman M, Valentin P. Scanning and transmission electron microscopic study of tissue-evading microorganisms in localized juvenile periodontitis. *J. Periodontol.* 1983; 12(6): p. 598-617.
20. Perry M, MacLean J, Brisson R. Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* serotypes a,c,d. *Eur J. Biochem.* 1996; 242(3): p. 682-688.
21. Yang H, Asikainen S, Doğan B, Suda R, Lai C. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75(4): p. 592-599.
22. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromona gingivalis* in periodontal disease. *Periodontology 2000.* 1999; 20(1): p. 82-121.
23. Okte E, Sultan N, Doğan B, Asikainen S. Bacterial adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to titanium implants: SEM evaluation. *J Periodontol.* 1999; 70(11): p. 1376-1382.
24. Handerson B, Nair S, Ward J, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev. Microbiol.* 2003; 57(1): p. 29-55.
25. Komatsuzawa H, Asakawa R, Kawai T, Ochiai K, Fujiw. Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene.* 2002; 288(2): p. 195-201.
26. Fine H, Kaplan J, Kachlany S, Schreiner H. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. *Infect Immun.* 1984; 42(1): p. 778-780.
27. Saglie F, Simon K, Merrill J, Koeffler H. Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulate macrophage to produce interleukin - 1 and tumor necrosis factor RNA. *Oral Microbiol Immunol.* 1990; 5(5): p. 256-262.
28. Macín-Cabrera S. Tratamiento periodontal no quirúrgico en pacientes con gingivitis y periodontitis moderada. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Departamento Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial); 2010.
29. Tolo K, Helgeland K. Fc-binding components: a virulence factor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*? *Oral Microbiol Immunol.* 1991; 6(6): p. 373-377.
30. Ramos Perfecto D, Moromi-Nakata H, Martínez-Cadillo A, Mendoza-Rojas A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Patógeno importante en la periodontitis. *Odontol. Sanmarquina.* 2010; 13(2): p. 42-45.

31. Kang J, Brito Bezerra B, Pacios S, Andriankaja O, Yu L, Tsiagbe V. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Infection Enhances Apoptosis In Vivo through a Caspase-3-Dependent Mechanism in Experimental Periodontitis. *Infect Immun.* 2012; 80(6): p. 2247–2256.
32. Saglie F, Smith C, Newman M, Carranza F. Immunofluorescence and electron microscopic studies. *J. Periodontol.* 1987; 169(1): p. 529-539.
33. Meyer D, Lippman J, Fives Taylor P. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* multistep process. *Infect Immun.* 1996; 64(8).
34. Lolonde G, O Hanley P. Development of a shuttle vector and a conjugative transfer system for *actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene.* 1989; 85(1): p. 243-245.
35. Sugai M, Kawanoto T, Peress S, Uene Y, Komatsuzaw. The cell cycle- specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun.* 1998; 66(10): p. 5008-5019.
36. Balashova N, Crosby J, Al Ghofaily L, Kachalany. Leukotoxin confers beta- hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 2006; 85(3).
37. Mülle L, Mülle R. A 2 year study of adjunctive micocline - HCl in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*- associated periodontitis. *Journal of Periodontology.* 2005; 90(2): p. 509-519.
38. Perry M, RG, W. Characterization of the Opolysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1996;: p. 1215-1219.
39. Yano-Higuchi K, Takamatsu N, He T, Umeda M, Ishikawa I. Prevalence of *B. Forsythys*, *P. Gingivalis* y *A. Actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with and rapidly progressive periodontitis. *J. Clin Periodontol.* 2000; 27(8): p. 912-922.
40. Haraszthy V, Hariharan G, Tinoco E, Cortelli J. Evidence for the role of highly leucotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early. *J. Periodontol.* 2000; 71(6): p. 912-922.
41. Sussana Paju V. Associated Characteristic of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* , an oral nonoral pathogen. Helsinki: University of Helsinki, Department of Periodontology, Institute of Dentistry; 2010.

Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución

Anexo.

FIGURA #1

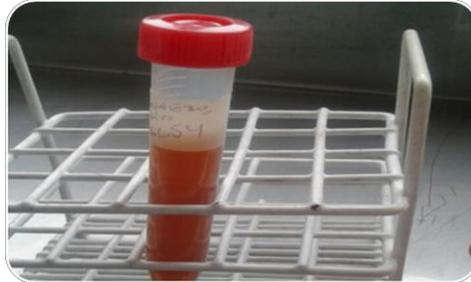


FIGURA #2



FIGURA #3

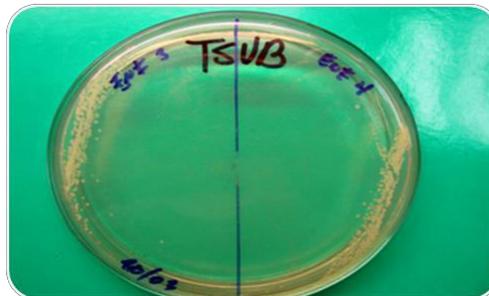


FIGURA #4

