

**DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SUBESPECIES DE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL
SINTOMATICA Y PERIODONTITIS APICAL ASINTOMATICA**

AUTOR:

EDUARDO COVO MORALES

COAUTORES:

LUISA ISABEL GOMEZ ROMERO

IRINA PAULINE PEREA PUENTES

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA - FACULTAD DE ODONTOLOGIA

POSTGRADO DE ENDODONCIA

CARTAGENA –COLOMBIA 2017

**DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SUBESPECIES DE
ENTEROCOCCUS FAECALIS EN DIENTES CON PERIODONTITIS
APICAL SINTOMATICA Y PERIODONTITIS APICAL ASINTOMATICA**

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

EDUARDO COVO MORALES

**Odontólogo. Especialista en Endodoncia. Pontificia Universidad
Javeriana**

Magíster en Microbiología. Universidad de Cartagena

COINVESTIGADORES:

LUISA ISABEL GOMEZ ROMERO

Odontóloga Universidad de Cartagena

IRINA PAULINE PEREA PUENTES

Odontóloga Universidad de Cartagena

Residentes especialización en Endodoncia Universidad de Cartagena

ASESOR METODOLOGICO:

NATALIA FORTICH MESA

Odontóloga Endodoncista Universidad de Cartagena

Ms. Epidemiología clínica Universidad Nacional de Colombia

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES

CARTAGENA DE INDIAS

2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por habernos acompañado y permitido cumplir con este logro, porque de Él provienen todas las cosas.

A nuestra Familia por todo su apoyo, valores, integridad, fortaleza y ejemplo para seguir adelante en este camino; por el tiempo que sacrificaron junto con nosotros.

A nuestros docentes, por la dedicación y la disposición para transmitir sus valiosos conocimientos.

A la Dra. Rosa Baldiris, quien con su esfuerzo y conocimiento, ha generado grandes logros a lo largo de esta investigación; docente ágil, responsable y generosa.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	9
INTRODUCCION.....	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
1.1. DESCRIPCION DEL PROBLEMA.....	12
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
3. JUSTIFICACION.....	19
4. MARCO TEORICO.....	21
4.1. GENERALIDADES.....	21
4.2. Enterococcus spp: RESEÑA HISTÓRICA.....	23
4.3. Enterococcus spp. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.....	25
4.4. DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD EN <i>E. faecalis</i>	26
4.4.1. SUSTANCIA DE AGREGACION.....	27
4.4.2. PROTEINA DE SUPERFICIE (ESP).....	28
4.4.3. PROTEINA DE UNION AL COLAGENO(Ace).....	29
4.4.4. FEROMONAS SEXUALES.....	30
4.4.5. ACIDO LIPOTEICOICO.....	30
4.4.6. SUPEROXIDO EXTRACELULAR.....	31
4.4.7. GELATINASA (GelE) Y PROTEASA (SprE).....	32
4.4.8. HIALURONIDASA.....	32
4.4.9. CITOLISINA (Cyl).....	33
4.5. METODOS DE IDENTIFICACION MOLECULAR: REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA (PCR).....	33
5. METODOLOGIA.....	38
5.1. TIPO DE ESTUDIO.....	38
5.2. POBLACION.....	38

5.3. MUESTRA.....	39
5.4. CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	39
5.5. VARIABLES.....	39
5.6. METODO DE TRABAJO.....	40
5.6.1. PRUEBA PILOTO.....	40
5.7. RECOLECCION DE LA MUESTRA.....	40
5.8. PROTOCOLO DE LABORATORIO.....	41
5.8.1. ETAPA 1. PROCEDIMIENTOS CLÍNICOS Y MUESTREO.....	41
5.8.2. ETAPA 2. EXTRACCIÓN DE DNA.....	42
5.8.3. ETAPA 3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	43
5.8.4. INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE LA INFORMACION.....	43
5.8.5. ANALISIS ESTADISTICO.....	43
5.9. CONSIDERACIONES ETICAS.....	44
6. RESULTADOS.....	45
7. DISCUSION.....	51
8. CONCLUSIONES.....	56
9. RECOMENDACIONES.....	57
10. BIBLIOGRAFIA.....	58

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** aislamiento de cepas de *Enterococcus* spp en agar cromogénico y crecimiento presuntivo de *E. faecalis*..... **44**
- FIGURA 2:** caldo BHI /NaCl 6,5%, utilización de carbohidratos caldo rojo fenol-sorbitol (+), diferenciación bioquímica *E. faecalis* y agar bilis esculina.....**45**
- FIGURA 3:** patrón electroforético del gen *tuf* de las cepas aisladas..... **46**
- FIGURA 4:** gen *ddl E. faecalis*..... **47**
- FIGURA 5:** gen *ddl E. faecium* **47**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos (Primers) usados para la identificación de los aislamientos	46
--	-----------

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE HISTORIA CLINICA ODONTOLOGICA DE POSGRADO DE ENDODONCIA

ANEXO 2. INSTRUMENTO FORMATO PARA RECOLECCION DE LA INFORMACION

ANEXO 3. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

RESUMEN

INTRODUCCION: el fracaso endodóntico representa uno de los mayores retos en la clínica. El papel de los microorganismos es trascendental en las patologías endodónticas. Entre las patologías periapicales en las que participan activamente microorganismos se encuentra la periodontitis apical. Es una entidad inflamatoria que afecta los tejidos circundantes a la porción apical de la raíz dental. *E. faecalis* juega un papel esencial en el fracaso persistente de tratamientos de endodoncia. Se ha sugerido que la virulencia de *E. faecalis* tiene relación entre otras, con su resistencia a los medicamentos intracanales y su supervivencia sin el apoyo de otras bacterias. **OBJETIVO:** detectar la presencia de subespecies de *enterococcus faecalis* en dientes con periodontitis apical sintomática y asintomática. **METODOLOGIA:** se realizó un estudio de tipo experimental *in vitro*. Se seleccionaron veinte (20) muestras de pacientes con diagnóstico de periodontitis apical sintomática y asintomática, que asistieron a las clínicas del Postgrado de Endodoncia y de Pregrado de la Universidad de Cartagena en el año 2015 y que aceptaron participar en el estudio. Todas las muestras fueron manejadas en laboratorios de la Universidad de Cartagena donde se detectaron los microorganismos mediante PCR, respetando los protocolos establecidos. Los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio a 100v, por 1h. Los patrones fueron analizados empleando un digitalizador de

imágenes. **RESULTADOS:** el porcentaje de aislamiento presuntivo de *Enterococcus spp* de las muestras procesadas fue 100%. Sin embargo, se realizaron diferentes test confirmatorios para especie y se detectó que no todas las cepas bacterianas correspondían a *E. faecalis*, encontrándose cepas presuntivas para *Enterococcus faecium* (*E. faecium*). Para la diferenciación de las especies de *Enterococcus*, se realizaron varias pruebas basadas en el consumo de diferentes sustratos como: test de bilis esculina, arabinosa, sucrosa, piruvato, xilosa, sorbitol y crecimiento en un medio de cultivo con alto porcentaje de cloruro de sodio (NaCl 6,5%). El resultado fue la caracterización fenotípica de *Enterococcus*; 43% de las cepas aisladas presuntiva para *E. faecium* y el 53% presuntiva para *E. faecalis*. **CONCLUSIONES:** se evidenció la presencia de *enterococcus faecalis* en una selección de dientes con periodontitis apical sintomática y asintomática; además se detectó otra especie específica de *Enterococcus faecium*. Los métodos moleculares constituyen procedimientos discriminatorios y sensibles para la identificación de cepas de *Enterococcus*, incluso en aislamientos con características bioquímicas ambiguas.

PALABRAS CLAVE: *enterococcus faecalis*, reacción en cadena de la polimerasa, infecciones endodónticas, periodontitis apical sintomática, periodontitis apical asintomática.

INTRODUCCION

El principal objetivo del tratamiento endodóntico es eliminar los microorganismos del sistema de conductos radiculares y prevenir la infección o reinfección tanto de la pulpa, como de los tejidos periapicales.

La Periodontitis apical es causada por bacterias anaerobias estrictas, anaerobias facultativas o microaerófilas. Los microorganismos de origen endodóntico son difíciles de cultivar por métodos microbiológicos clásicos, por lo que se han empleado métodos de genética molecular para su identificación.

En los últimos años, las técnicas de amplificación PCR han logrado la mayor sensibilidad y especificidad. *E. faecalis* ha demostrado ser el microorganismo dominante posterior al tratamiento de la periodontitis apical y a menudo se ha aislado del conducto radicular en cultivo puro. A pesar de encontrarse en ocasiones con otras bacterias y levaduras, *Enterococcus faecalis* es el organismo con mayor prevalencia en los cultivos de tratamientos fracasados. Sin embargo, no es un hallazgo universal.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 DESCRIPCION DEL PROBLEMA

El fracaso endodóntico representa uno de los mayores retos en la clínica. Los microorganismos juegan un rol trascendental en la clínica de entidades endodónticas. La capacidad de adaptación de las bacterias a un entorno y de organizarse con otros microorganismos, ha cambiado el modo de percibir las como seres únicos. Su comportamiento puede variar dependiendo del hábitat a colonizar, el hospedero y por supuesto la respuesta del mismo ante la presencia de estas. La mayor parte de los microorganismos detectados en patologías endodónticas son de naturaleza bacteriana. Por consiguiente, poseen amplios mecanismos de acción, ya que requieren intercambio de información para coordinar su comportamiento.

Entre las patologías periapicales en las que participan activamente microorganismos se encuentra la periodontitis apical. Esta es una entidad inflamatoria que afecta los tejidos circundantes de la porción apical de la raíz y es causada principalmente por microorganismos que infectan el canal¹.

La patología puede manifestarse clínicamente de distintas maneras y la microbiota del canal radicular puede variar ocasionalmente. Actualmente, la estructura de la microbiota puede ser responsable de las diferentes presentaciones clínicas. Hongos y recientemente virus, han sido asociados

¹ KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340–9.

con infecciones endodónticas, pero las bacterias son las altamente implicadas en la patogenia de la periodontitis apical². Esta patología es de origen polimicrobiano y mixto, de tal manera que incluyen anaerobias estrictas, anaerobias facultativas o microaerófilas. Bacterias pertenecientes a los géneros *Porphyromona*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* y *Fusobacterium*, han sido frecuentemente asociadas a periodontitis apical.³ Desde el momento que están presentes en el conducto radicular, son potencialmente patógenas para los tejidos periapicales debido a factores de virulencia como actividad proteolítica, producción de endotoxinas, capacidad para inhibir la quimiotaxis y la fagocitosis.

El género *Enterococcus spp* ha tenido cambios en la taxonomía durante los últimos años. *Enterococcus* es un género de bacterias del ácido láctico de la división Firmicutes, que inicialmente estaban clasificadas como Grupo D *Streptococcus*. En 1984, los análisis de ADN genómicos indicaron que un género separado sería más apropiado. Los enterococos son cocos Gram-positivos esféricos u ovoides, con un tamaño de 0,6-2,0 × 0,6-2,5 µm, que se presentan apareados como diplococos, en forma de pares o de cadenas cortas; no producen esporas. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Presentan requerimientos nutricionales complejos. Son catalasa negativos o más comúnmente, débilmente positivos. Crecen usualmente en un rango de temperatura entre 5 °C a 50 °C. La temperatura óptima, mínima y máxima de acuerdo con el modelo Rosso, es de 42.7, 6.5 y 47.8 °C respectivamente, en agar infusión cerebro corazón (BHI) bajo condiciones

² WALTIMO TM, SEN BH, MEURMAN JH, ORSTAVIK D, HAAPASALO MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14:128-37

³ SILVA BL, NELSON FP, FARIA G, SOUZA SM, ITO IY. Bacterial profile in primary teeth with necro/c pulp and periapical lesions. *Braz Dent J* 2006;17(2):144-48.

anaeróbicas⁴. Algunas especies son móviles como *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*.

Son difíciles de distinguir de los *Streptococcus* basándose solo en las características físicas. Dos especies de enterococos son comensales en el intestino humano: *E. faecalis* y *E. faecium*. En infecciones endodónticas secundarias, *E. faecalis* es el microorganismo más a menudo asociado con lesiones periapicales crónicas asintomáticas⁵. Se confirmó que *E. faecalis* es el organismo encontrado con mayor frecuencia en infecciones endodónticas secundarias/persistentes⁶. Es responsable de un 80-90% de las infecciones causadas por enterococos y por lo general, es la única especie aislada en fracasos de dientes obturados endodónticamente.

Este último hallazgo referente a su supervivencia, puede ser atribuida a sus factores de virulencia, además de su capacidad para competir con otros microorganismos, invadir los túbulos dentinarios y resistir etapas de privación nutricional⁷. El *E. faecalis* mantiene su viabilidad en largos periodos de hambruna, además de ser resistente a la radiación UV, calor, NaOCl, peróxido de hidrógeno, etanol y ácidos. Lo anterior demuestra su capacidad de adaptación y tolerancia que lo lleva a sobrevivir en conductos

⁴ DOMIG KJ, MAYER HK, KNEIFEL W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. International journal of food microbiology. 2003;88(2-3):165-88.

⁵FOUAD AF, BARRY J, CAIMANO M, CLAWSON M, ZHU Q, CARVER R, HAZLET K, RADOLF JD. PCR-Based identification of bacteria associated with endodontic infections. J Clin Microbiol 2002; 40:3223-31

⁶ ROCAS, I.N., SIQUEIRA JR., J.F., SANTOS, K.R.N., 2004. Association of coccus faecalis with different forms of periradicular diseases. J. Endod. 30, 315e320.

⁷ ZOLETTI G.O., SIQUEIRA J.F., K.R.N. SANTOS. August 2006. Identification of Enterococcus faecalis in Root-filled Teeth With or Without Periradicular Lesions by Culture-dependent and—Independent Approaches. J. Endod. Volume 32, Issue 8 , Pages 722-726

radiculares infectados, donde los nutrientes son escasos y están expuestos a medicamentos⁸.

Un importante factor de virulencia es la proteína ESP, codificada por el gen *esp*. Esta proteína participa en la formación de biofilm por *E. faecalis*, dificultando el efecto bactericida de la medicación con hidróxido de calcio en conductos radiculares infectados⁹. *E. faecalis* también produce la enzima hialuronidasa, que actúa sobre el ácido hialurónico del tejido conectivo humano, facilitando la diseminación bacteriana. Esta enzima se ha aislado de la dentina cariada, contribuyendo a su destrucción y facilitando el paso de la infección de la pulpa a la región periapical; sin embargo, este último factor no ha sido comprobado¹⁰.

Según esto, *E. faecalis* juega un papel esencial en el fracaso persistente de tratamientos de endodoncia. Se ha sugerido que parte de su virulencia es debida a su resistencia a los medicamentos intracanales y su supervivencia en el conducto como un solo organismo, sin el apoyo de otras bacterias¹¹.

Estudios moleculares y epidemiológicos han proporcionado valiosa información aclarando algunos conceptos erróneos con respecto a infecciones por *E. faecalis*, como demostrar que algunas de estas son causadas por transmisión nosocomial en lugar de provenir de la propia flora

⁸ KAYAOGU G, ØRSTAVIK D.. Virulence Factors of Enterococcus faecalis: Relationship to Endodontic Disease. International and American Associations for Dental Research. 2004. 15 (5):308-320

⁹ ROCAS Y COLS., Op cit , Pag. 13

¹⁰HASHIOKA K, SUZUKI K, YOSHIDA T, NAKANE A, HORIBA N, NAKAMURA H. Relationship between clinical symptoms and enzyme-producing bacteria isolated from infected root canals. J Endod. 1994;20:75-7

¹¹LOVE RM. Enterococcus faecalis-a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001;34:399-405.

intestinal prehospitalaria del paciente¹². Los métodos de cultivo modernos han sido esenciales para la caracterización de la infección polimicrobiana en el conducto radicular infectado¹³. Un número de métodos de tipificación fenotípica y genotípica se han aplicado para diferenciar subespecies de cepas de enterococos. Entre los métodos fenotípicos que se han utilizado en el pasado se incluyen la serotipificación y la electroforesis de enzimas multilocus¹⁴. Entre los genotípicos se incluyen entre otros PCR, PFGE (pulsed – field gel electrophoresis) , y (Multilocus sequence typing) MLST, entre otras ¹⁵. Por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), resulta mucho más fácil identificar, con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de patologías. Se encuentran resultados concordantes con PFGE (pulsed – field gel electrophoresis) en la identificación de relaciones clonales entre aislamientos de *E. faecalis*¹⁶. PCR es menos costosa y requiere menor tiempo de trabajo que PFGE, además de ser una alternativa a la caracterización bioquímica y serológica empleada tradicionalmente en la identificación de *Enterococcus*. Los métodos bioquímicos convencionales de identificación estudian muchas características, haciéndola lenta, compleja y de rendimiento limitado; incluso en algunas oportunidades no permite diferenciar adecuadamente especies fenotípicamente similares¹⁷.

¹²GORDILLO, M. E., K. V. SINGH, AND B. E. MURRAY. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 1993. 31:1570-1574.

¹³YOUNG G, TURNER S, DAVIES JK, SUNDQVIST G, FIGDOR D. Bacterial DNA Persists for Extended Periods after Cell Death *J. Endod.* 2007. Volume 33, Pages 1417-1420

¹⁴ MCBRIDE, S. M., V. A. FISCHETTI, D. J. LEBLANC, R. C. MOELLERING, JR., AND M. S. GILMORE.. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. 2007. *PLoS ONE* e582

¹⁵ WAAR, K., R. J. WILLEMS, M. J. SLOOFF, H. J. HARMSSEN, AND J. E. DEGENER. Molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients at University Hospital Groningen. *J. Hosp. Infect.* 2003.5553-60

¹⁶ KUMTHORN MALATHUN, KAVINDRA V. SINGH. J. Repetitive Sequence-Based PCR versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing of *Enterococcus faecalis* at the Subspecies Level. *Clin. Microbiol.* January 1998 vol. 36 no. 1 211-215

¹⁷ SEPÚLVEDA MARCELA, BELLO HELIA, RUIZ MERY, HORMAZÁBAL F JOSÉ, DOMÍNGUEZ MARIANA, GONZÁLEZ GERARDO, MELLA SERGIO M, ZEMELMAN RAÚL. *Classic and*

Foschi y cols en 2005, identifican por PCR algunas especies bacterianas, incluida *E. faecalis* en periodontitis apical aguda y crónica exacerbada. El 71% de los casos con infecciones endodónticas primarias y el 29% de las infecciones endodónticas recurrentes (secundaria), están asociadas con *E. faecalis*.¹⁸.

Kumthorn Malathum, Kavindra V. Singh, George M. Weinstock, y Barbara E. Murray, en el estudio denominado “Secuencia repetitiva basada en PCR frente a PFGE para tipificación de subespecies de *Enterococcus faecalis*”, compararon PCR con la imprimación BOXA2R y PFGE por la facilidad de uso y la capacidad de discriminar cepas de *Enterococcus faecalis* obtenidas de varias fuentes. Los resultados de PCR fueron generalmente concordantes con los de PFGE en la identificación de relaciones clonales entre aislamientos de *E. faecalis*.¹⁹.

Debido a la supervivencia de este microorganismo en el ámbito hospitalario y en el sistema de conductos radiculares, se hizo necesario conocer su comportamiento y las posibles subespecies asociadas a este. ¿Se logran identificar subespecies de *enterococcus faecalis* en las infecciones endodónticas?

molecular methodologies for the identification of Enterococcus species. Rev. méd. Chile , Santiago ene. 2002. v.130 n.1

¹⁸ FOSCHI F, CAVRINI F, MONTEBUGNOLI L, STASHENKO P, SANBRI V, PRATI C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20:289-95.

¹⁹ WAAR Op cit, Pag. 15

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de subespecies de *enterococcus faecalis* en dientes con periodontitis apical.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la subespecie y/o subespecies de *e. faecalis* predominantes en periodontitis apical asintomática y periodontitis apical sintomática.
- Identificar la presencia de otras especies del grupo cocos en las muestras aisladas.
- Determinar la asociación del factor género con las patologías periodontitis apical sintomática y asintomática.

3. JUSTIFICACION

Las técnicas de cultivo han sido utilizadas tradicionalmente para investigar la microbiota asociada a las infecciones endodónticas. Estas han mostrado que *Enterococcus faecalis* es la especie más frecuentemente encontrada en infecciones intracanales, persistentes y secundarias, asociadas con fracaso endodóntico.²⁰

Sin embargo, en la actualidad existe una variedad de técnicas que han precisado las características relevantes, el modo de supervivencia y los factores de virulencia de muchos microorganismos, incluyendo los que participan directamente en periodontitis apical. La no concordancia entre las características morfológicas y/o fenotípicas observables del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no la definitiva.

La obtención de una muestra significativa del conducto radicular es una tarea difícil. Esta dificultad se acentúa en pacientes que requieren retratamiento en endodoncia, ya que el número de microorganismos accesibles en el conducto puede ser menor y pueden perderse durante la remoción del material de obturación. Como consecuencia, el número de células que se utilizan como muestra puede caer en un rango de detección y la prevalencia de una especie dada, subestimada.²¹

²⁰ SUNDQVIST G, FIGDOR D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford T editor. Essential endodontology. Oxford (England): Blackwell Science Ltd; 1998;p. 242–277

²¹ SAKAMOTO M, SIQUEIRA JF, ROÇAS IN, BENNO Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. Oral Microbiol Immunol 2008; 23: 275-281.45.

Recientemente, diversos métodos moleculares se han utilizado para investigar la microbiota de las infecciones endodónticas. Estas técnicas moleculares tienen la capacidad de identificar especies de enterococos de forma más rápida y adecuada. La mayoría de estos métodos se basan en los ácidos nucleicos e incluyen PCR y análisis electroforético de los productos de ésta. La recopilación bacteriológica de la ATCC (American Type Culture Collection) cuenta con 69 aislamientos de *Enterococcus faecalis* comercializados actualmente. Cada uno con un número ATCC y designación diferente.²²

Teniendo en cuenta la diversidad de los microorganismos participantes en la periodontitis apical, el estudio está orientado a precisar las especies de *e. faecalis* que se encuentran asociadas a conductos radiculares infectados y obtener un conocimiento del rol de dicho microorganismo en la microbiota de este sistema.

²² PÉREZ ALFAYATE R., DÍAZ-FLORES GARCÍA V., ALGAR PINILLA J., VALENCIA DE PABLO O., ESTÉVEZ LUÑA R., CISNEROS CABELLO R. Actualización en microbiología endodóntica. *Cient. Dent.* 2013; 10; 1: 27-39.

4.

MARCO TEORICO

4.1 Generalidades

Actualmente existen numerosas investigaciones que ponen en evidencia la participación de múltiples microorganismos en la patología pulpar y periapical, los cuales pueden utilizar diversas puertas de entrada. En función de su magnitud y proximidad, la patología se instaura rápidamente o de forma prolongada.²³

Periodontitis apical (AP) es la inflamación y destrucción de los tejidos periapicales. Si es de origen endodóntico, se presenta como consecuencia a diversos estímulos negativos sobre la pulpa dental, incluyendo infección, trauma físico y químico; así como después de un tratamiento de endodoncia o por los efectos de los materiales de obturación dentro del conducto radicular.²⁴

Los hongos y más recientemente los virus, se han encontrado en asociación con infecciones endodónticas²⁵, pero las bacterias son indiscutiblemente los principales microorganismos implicados en la patogénesis de la periodontitis apical. Algunas infecciones endodónticas se derivan de la microbiota oral normal bajo condiciones predisponentes. En etapas avanzadas del proceso infeccioso, aparecen organizaciones bacterianas que se asemejan a biofilm y pueden observarse adheridas a las

²³ GROSSMAN LOUIS I., W. BENJAMIN . MEIMAN..Solution of pulp tissue by chemical agents.J. EndodVolume 8, Supplement. January 1982 . Pages S10-S12.

²⁴ GRAUNAITE, I; LODIENE, G; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. En: 2012; vol. 2 N° 4, p. e1. eCollection 2012

²⁵ SABOIA-DANTAS CJ, COUTRIN DE TOLEDO LF, SAMPAIO-FILHO HR, SIQUEIRA JF., Jr Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. Oral Microbiol Immunol. 2007;22:320–5

paredes de la dentina²⁶. Por lo tanto, existe una tendencia para incluir a la periodontitis apical en el grupo de las enfermedades infecciosas causadas por biofilm bacteriano.

La microflora de los conductos radiculares infectados es una mezcla de bacterias con predominio de anaerobios estrictos y facultativos. Los istmos, ramificaciones, deltas, irregularidades y túbulos dentinarios son irregularidades anatómicas que crean condiciones específicas para la supervivencia de bacterias y su resistencia a las medidas de desinfección.²⁷

Las razones por las que un caso asintomático con infección de larga data se vuelve sintomático no están plenamente esclarecidas. Podría estar asociada con los cambios en la composición de la microbiota. Se ha demostrado que la composición de las comunidades bacterianas en los dientes sintomáticos es significativamente diferente de la encontrada en los dientes asintomáticos.²⁸

Las lesiones apicales son una consecuencia de la infección por diversos géneros de microorganismos tales como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Dialister*, *Fusobacterium*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium* y *Pyramidobacter* presentes en el espacio

²⁶ MOLVEN O, OLSEN I, KEREKES K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1991;7:226-9

²⁷ MATSUO T, SHIRAKAMI T, OZAKI K, NAKANISHI T, YUMOTO H, EBISU S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod* 2003;29:194-200

²⁸ SIQUEIRA JF JR, ROCAS IN, ROSADO AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:363-70

intraradicular²⁹. Estas lesiones representan una patogenia inflamatoria e inmune que afecta al tejido periapical incluyendo al hueso circundante.

La patología endodóntica y periapical es de origen polimicrobiano, siendo las bacterias anaerobias estrictas y facultativas las más comunes, dentro de un 90% y 70 % dependiendo del diente considerado. Este proceso periapical se inicia principalmente por la infección bacteriana en la pulpa necrótica.

Su persistencia, la progresión de las lesiones y la destrucción crónica de las estructuras óseas, son producto de la incapacidad de los mecanismos de defensa del hospedero para erradicar la infección.³⁰

La presencia de *E. faecalis* en lugares de la boca como el surco gingival, la lengua y amígdalas, sugiere que estos sitios anatómicos se convierten en un reservorio que facilita la invasión de este microorganismo hacia los conductos radiculares.³¹ En el estudio de Ardila y cols³², se destaca que este microorganismo posee factores de virulencia cruciales en la patogénesis de las infecciones periapicales.

4.2 *Enterococcus spp*: RESEÑA HISTÓRICA

²⁹ ROCAS, IN; SIQUEIRIA, JF JR. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. En: Journal of clinical microbiology. 2012; vol. 50, N° 5. p. 1721-1724

³⁰ AZUMA, MM; SAMUEL, RO; GOMES-FILHO, JE; DEZAN-JUNIOR, E; CINTRA, LT. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. En: International endodontic journal. 2014; vol. 47, N° 7, p. 615-621

³¹ NAIR PN, HENRY S, CANO V, VERA J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2005;99(2):231-52.

³² ARDILA M. CARLOS; MAGGIOLO V. SILVANA; ARROYO, ERIK; ARMIJO P. JACQUELINE; SILVA, NORA. Enterococcus faecalis in teeth with apical asymptomatic periodontitis. jul.-ago. 2014. AMC vol.18 no.4 Camagüey

El género *Enterococcus spp* ha tenido grandes cambios en la taxonomía durante los últimos años. El término *Enterococcus* fue utilizado por primera vez por el microbiólogo francés Thiercelin (1899) para referirse a un diplococo Gram positivo encontrado en el intestino humano.³³

La denominación de *Streptococcus faecalis* fue acuñada por Andrewer y Horder (1906), para designar a un microorganismo aislado de un paciente con endocarditis aludiendo el nombre específico al hábitat de dicho microorganismo: el intestino.

Sherman en 1930, clasificó a los estreptococos en cuatro clases: pyogenes, lactis, viridans y Enterococos; a estos últimos los denominó estreptococos del grupo D, aunque mantuvo la palabra Enterococos para definir a los estreptococos fecales.³⁴ Posteriormente Schleifer y Kilpper-Bälz (1984), utilizaron las técnicas de hibridación ADN-ADN y ADN-ARN para demostrar que *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* no tenían relación filogenética con el resto de los *Streptococcus*. Por ello, transfirieron estas dos especies a un nuevo género: Enterococos,³⁵ en el que posteriormente se incluyeron las especies: *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus solitarius*, y *Enterococcus pseudoavium*. En la actualidad se registran hasta 40 especies, las cuales pertenecen al reino

³³ STILES ME, HOLZAPFEL WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International journal of food microbiology. 1997;36(1):1-29.

³⁴ SOOD S, MALHOTRA M, DAS BK, KAPIL A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. The Indian journal of medical research. 2008;128(2):111-21.

³⁵ FOULQUIE MORENO MR, SARANTINOPOULOS P, TSAKALIDOU E, DE VUYST L. The role and application of enterococci in food and health. International journal of food microbiology. 2006;106(1):1-24.

bacteria, filum firmicutes, clase bacilli, orden lactobacillales y familia enterococcaceae.³⁶

4.3 *Enterococcus spp.* ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS:

Enterococcus spp. Son células esféricas u ovoides, con un tamaño de 0,6-2,0 × 0,6-2,5 µm. Son cocos grampositivos que no producen esporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Algunas especies son móviles como *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Presentan requerimientos nutricionales complejos. Son catalasa negativos o, más comúnmente, débilmente positivos. Crecen usualmente en un rango de temperatura entre 5 °C a 50 °C. La temperatura óptima, mínima y máxima de acuerdo con el modelo Rosso es de 42.7, 6.5 y 47.8 °C respectivamente, en agar infusión cerebro corazón (BHI) en condiciones anaeróbicas.³⁷ Pueden crecer a pH entre 4.6-9.9, con un valor óptimo de 7.5 con un 40 % de bilis y 6,5 % de NaCl. De igual forma posee un catión homeostático, el cual se cree contribuye a su resistencia al pH, sales, metales y desecación. Adicionalmente, casi todas las cepas son homo-fermentativas, produciendo ácido láctico como producto final de la fermentación de glucosa. Portan el antígeno D del grupo Lancefield y poseen el carbohidrato C. Sobreviven después del calentamiento a 60 °C durante 30 min, haciendo el género *Enterococcus* distinguible de los *Streptococcus*.³⁸ El *E. faecalis* es la especie más representativa del género *Enterococcus* y se encuentra como parte de la flora normal humana a nivel de la mucosa intestinal y genital. Sin embargo, también pueden ser aislados de infecciones dentales. Este

³⁶ FISHER K, PHILLIPS C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009;155(Pt 6):1749-57.

³⁷ DOMIG, Op cit., pág. 13

³⁸ FOULQUIE, Op cit., Pág. 22

microorganismo constituye un patógeno oportunista implicado en la persistencia de la infección, influyendo en el pronóstico del tratamiento de conductos.³⁹ Diferentes autores han aislado esta bacteria entérica en estudiantes con altos índices de caries (60 %) y en el 70 % de infecciones endodónticas.⁴⁰

4.4 DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD EN *E. faecalis*

La virulencia en los Enterococos ha evolucionado muy probablemente de una forma similar a linajes patogénicos de otras especies bacterianas⁴¹ como por ejemplo *Escherichia coli* O157 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)⁴². *E. coli* posee islas de patogenicidad que codifican para numerosas toxinas, adhesinas y diversos genes de virulencia. Una vez estos elementos se integran en los huéspedes bacterianos se generan nuevos linajes patogénicos capaces de adaptarse, sobrevivir y diseminarse en su nuevo nicho biológico⁴³. Entre los factores de virulencia más importantes presentes en *E. faecalis* se encuentran: sustancia de agregación, adhesinas o proteínas de superficie, feromonas sexuales, ácido lipoteicoico, superóxido extracelular, gelatinasa, hialuronidasa y hemolisina. Gracias a la presencia de estos factores, *E. faecalis* es capaz de sobrevivir en medios con escasos nutrientes, e invadir

³⁹ KOVAC, J; KOVAC, D; SLOBODNIKOVA, L; KOTULOVA, D. Enterococcus faecalis and Candida albicans in the dental root canal and periapical infections. En: Bratislavské lekárske listy. 2013; vol. 114, N° 12, p. 716-720.

⁴⁰ HALLER C, BERTHOLD M, WOBSE D, KROPEC A, LAURIOLA M, SCHLENSAK C, Y COLS. Cell-Wall Glycolipid Mutations and Their Effects on Virulence of *E. faecalis* in a Rat Model of Infective Endocarditis. PLoS One. 2014 Mar;9(3):e91863

⁴¹ FINLAY BB. Interactions of enteric pathogens with human epithelial cells. Bacterial exploitation of host processes. Advances in experimental medicine and biology. 1997;412:289-93

⁴² KREISWIRTH B, KORNBLUM J, ARBEIT RD, EISNER W, MASLOW JN, MCGEER A, Y COLS. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science. 1993;259(5092):227-30.

espacios anatómicos complejos donde la preparación biomecánica, la medicación intracanal o el uso de irrigantes, no son capaces de actuar y eliminarlo.

4.4.1 SUSTANCIA DE AGREGACION

La sustancia de agregación es una adhesina bacteriana plásmido-codificada receptiva a las feromonas, que media en el contacto entre el donador y la bacteria receptora, causando agregación o agrupación y facilitando el intercambio de plásmidos. Mientras que la sustancia de agregación es expresada por la célula donadora, el proceso de conjugación bacteriana requiere que la "sustancia vinculante" sea expresada en la superficie de la célula receptora. En este sentido, tanto el material genético como la resistencia antibiótica pueden ser transferidos de las cepas de *E. faecalis* a otras especies.⁴⁴

La sustancia de agregación puede servir como determinante de virulencia a *E. faecalis* en diferentes formas: 1. Juega un papel importante en la diseminación de los factores de virulencia codificados por plásmidos, como la citolisina enterocócica y determinadas resistencias antibióticas, entre las especies; 2. Facilita la adherencia de *E. faecalis* a las células epiteliales renales e intestinales, y a la colonización de estas superficies⁴⁵; 3. Protege al microorganismo contra los leucocitos polimorfonucleares y de la lisis

⁴³ HACKER J, BLUM-OEHLER G, MUHL DORFER I, TSCHAPE H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology*. 1997;23(6):1089-97.

⁴⁴ KAYA OGLU, Op cit., Pag. 13

⁴⁵ OLMSTED SB, DUNNY GM, ERLANDSEN SL, WELLS CL. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *The Journal of infectious diseases*. 1994;170(6):1549-56.

mediada por macrófagos⁴⁶. El mecanismo para esta protección puede deberse a una modificación de la maduración fagosomal; 4. La sustancia de agregación y las citolisinas tienen acciones sinérgicas, lo cual aumenta la virulencia; esto resulta en daño tisular e invasión tisular profunda; 5. Media la unión con proteínas de la matriz extracelular, incluyendo colágeno tipo I, siendo de especial importancia para las infecciones endodónticas ya que es el principal componente orgánico de la dentina.⁴⁷

4.4.2 PROTEÍNA DE SUPERFICIE (ESP)

El gen esp fue inicialmente detectado en un *E. faecalis* resistente a gentamicina (MMH594) causante de una epidemia hospitalaria a mediados de los años ochenta⁴⁸. Pocos años después se determinó que este gen existía en un elemento genómico de gran tamaño (153 kb), que presentaba características de una isla de patogenicidad (PAI) con un bajo contenido de GC (32.2 %) comparado con el resto del genoma de *E. faecalis* (promedio 37.5 %) y presentaba determinantes de virulencia, reguladores transcripcionales y transposasas⁴⁹.

⁴⁶ VANEK NN, SIMON SI, JACQUES-PALAZ K, MARISCALCO MM, DUNNY GM, RAKITA RM. Enterococcus faecalis aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. FEMS immunology and medical microbiology. 1999;26(1):49-60.

⁴⁷ ROZDZINSKI E, MARRE R, SUSAN M, WIRTH R, MUSCHOLL-SILBERHORN A. Aggregation substance-mediated adherence of Enterococcus faecalis to immobilized extracellular matrix proteins. Microbial pathogenesis. 2001;30(4):211-20

⁴⁸ SHANKAR V, BAGHDAYAN AS, HUYCKE MM, LINDAHL G, GILMORE MS. Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. Infection and immunity. 1999;67(1):193-200.

⁴⁹ SHANKAR N, BAGHDAYAN AS, GILMORE MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis. Nature. 2002;417(6890):746-50.

El gen esp codifica para la proteína de superficie denominada ESP (“enterococal surface protein”), polipéptido de gran tamaño, altamente conservado en sus dominios repetitivos y es detectado frecuentemente en aislamientos de origen clínico⁵⁰. Es así como Willems y cols. reportaron que 41 % de los aislamientos provenientes de pacientes con endocarditis presentaban este gen mientras que solo el 3% de los aislamientos provenientes de heces eran portadores de dicho gen. Estos resultados sugirieron que la presencia de ESP en aislamientos de *E. faecium* podría tener un papel relevante a nivel de virulencia⁵¹.

4.4.3 PROTEÍNA DE UNIÓN AL COLÁGENO (ACE)

La proteína de superficie denominada “adhesion of collagen from *E. faecalis*” (Ace), fue la primera proteína descrita perteneciente a la familia de las adhesinas conocidas como “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”, (MSCRAMMs) en *enterococcus*. Ace es ubicua entre cepas de *E. faecalis* comensales y patógenas, por lo cual se ha propuesto que se puede utilizar para identificar las cepas de *E. faecalis* por hibridación. Esta adhesina media la unión al colágeno tipo I, colágeno tipo IV, laminina y dentina. Fue identificada con base en homología de secuencia con el factor de virulencia cna del *S. aureus*, el cual se encuentra bien caracterizado⁵².

⁵⁰ TENDOLKAR PM, BAGHDAYAN AS, SHANKAR N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2003;60(12):2622-36.

⁵¹ WILLEMS RJ, HOMAN W, TOP J, VAN SANTEN-VERHEUVEL M, TRIBE D, MANZIOROS X, Y COLS. . Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. Lancet. 2001;357(9259):853-5.

⁵² KOWALSKI WJ, KASPER EL, HATTON JF, MURRAY BE, NALLAPAREDDY SR, GILLESPIE MJ 2000;68(9):5218-24. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. Journal of endodontics. 2006;32(7):634-7.

4.4.4 FEROMONAS SEXUALES

Las feromonas sexuales son péptidos hidrofóbicos pequeños codificados cromosomalmente, a lo largo de 7 u 8 aminoácidos, los cuales promueven la transferencia conjugativa de plásmidos de ADN entre las cepas⁵³. Se describen como feromonas porque ellas obtienen una respuesta específica de unión de las células donadoras transportadoras de plásmidos. Normalmente, son secretadas simultáneamente múltiples feromonas por una cepa de *E. faecalis*. Adicionalmente a las feromonas, cada plásmido receptor de feromonas codifica un péptido secretado que actúa como inhibidor competitivo de su feromona correspondiente⁵⁴. A pesar de que *E. faecalis* secreta normalmente múltiples feromonas y los efectos quimiotácticos de las feromonas aparecen en bajas concentraciones, se desconoce por qué estos péptidos y sus inhibidores modulan significativamente la respuesta inflamatoria *in vivo*⁵⁵.

4.4.5 ÁCIDO LIPOTEICOICO

Se ha reportado que los ácidos lipoteicoicos aislados de cepas de *E. faecalis* o de otras bacterias Gram positivas, pueden estimular a los leucocitos a liberar numerosos mediadores, los cuales juegan un papel

⁵³ CLEWELL DB, WEAVER KE. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*. 1989;21(3):175-84.

⁵⁴ DISTEL JW, HATTON JF, GILLESPIE MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of endodontics*. 2002;28(10):689-93.

⁵⁵ SANNOMIYA P, CRAIG RA, CLEWELL DB, SUZUKI A, FUJINO M, TILL GO, Y COLS. Characterization of a class of nonformylated *Enterococcus faecalis*-derived neutrophil chemotactic peptides: the sex pheromones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(1):66-70.

importante en varias fases de la respuesta inflamatoria⁵⁶. Ehrenfeld y cols, señalan que los ácidos lipoteicoicos han sido considerados como un componente de la sustancia vinculante de *E. faecalis* y actúan como un receptor para la sustancia de agregación producida por la célula donadora. Esta conclusión proviene de experimentos donde ácidos lipoteicoicos libres aislados de *E. faecalis* inhiben grupos celulares inducidos por feromonas, actuando como un inhibidor competitivo de la sustancia vinculante celular. Por esto, los ácidos son considerados moléculas que ayudan a la virulencia de *E. faecalis* a través de la facilitación de formación agregada y la transferencia de plásmidos.⁵⁷

4.4.6 SUPERÓXIDO EXTRACELULAR

Los aniones superóxidos son radicales de oxígeno altamente reactivos relacionados con el daño tisular y celular en una gran variedad de desórdenes, incluyendo las enfermedades inflamatorias⁵⁸. Huycke et al señalan que *E. faecalis* produce superóxido extracelular sustancial y especies derivadas del oxígeno reactivo como el H₂O₂ y radicales hidroxilos. Ellos evaluaron el daño producido por *E. faecalis* sobre el ADN de las células eucariotas y observaron que las cepas de microorganismos donde hubo presencia de superóxido extracelular, produjeron mayor daño sobre el ADN que aquellas cepas mutadas. Estos hallazgos sugieren que la

⁵⁶ BHAKDI S, KLONISCH T, NUBER P, FISCHER W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infection and immunity*. 1991;59(12):4614-20.

⁵⁷ EHRENFELD EE, KESSLER RE, CLEWELL DB. Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *Journal of bacteriology*. 1986;168(1):6-12.

⁵⁸ CROSS CE, HALLIWELL B, BORISH ET, PRYOR WA, AMES BN, SAUL RL, Y COLS. Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*. 1987;107(4):526-45.

producción de radicales libres extracelulares por parte de *E. faecalis* promueve la inestabilidad cromosomal y el daño causado en el ADN⁵⁹.

4.4.7 GELATINASA (GELE) Y PROTEASA (SPRE)

El gen *gelE* codifica para una proteína secretada de tipo extracelular, metaloproteasa, dependiente de zinc, denominada gelatinasa, la cual al hidrolizar gelatina, colágeno y caseína, suministra nutrientes a la bacteria por degradación del tejido del hospedero. Esta proteína se encuentra relacionada con la producción de biofilm. Se ha demostrado que tiene un papel importante en la virulencia *in vivo* cuando se ha evaluado en modelos animales de peritonitis, endocarditis, endoftalmitis y en el modelo del nematodo *Caenorhabditis elegans*⁶⁰.

4.4.8 HIALURONIDASA

La hialuronidasa es una enzima capaz de descomponer el sustrato hialuronidato (ácido hialurónico o hialuronano). Actúa como un ácido hialurónico y es principalmente degradativa, asociada con daño tisular como consecuencia de su función⁶¹. Es considerada como facilitador de la proliferación bacteriana, así como de sus toxinas, a través de los tejidos del hospedero. Además de su propio efecto dañino, también es capaz de

⁵⁹ HUYCKE MM, GILMORE MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid*. 1995;34(2):152-6.

⁶⁰ MAKINEN PL, CLEWELL DB, AN F, MAKINEN KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain 0G1-10). *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(6):3325-34.

⁶¹ HYNES WL, WALTON SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology letters*. 2000;183(2):201-7.

permitir los efectos deletéreos de otras toxinas bacterianas, incrementando así la magnitud del daño⁶² .

4.4.9 CITOLISINA (CYL)

Anteriormente llamada hemolisina, es una enzima tóxica codificada por plásmidos, producida por cepas de *E. faecalis*. Es capaz de destruir eritrocitos, neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, células bacterianas y reducir el acto de la fagocitosis⁶³ .

En los últimos años se le ha dado especial atención al rol que cumple el laboratorio de microbiología en el diagnóstico de los microorganismos de la cavidad bucal. Es por ello que se han desarrollado y perfeccionado diversas técnicas microbiológicas para conocer mejor la ecología microbiana y a su vez, los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos más relevantes, asociados a diferentes enfermedades.

4.5 METODOS DE IDENTIFICACION MOLECULAR: REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Todas las especies en la cavidad oral tienen la posibilidad de penetrar en el conducto radicular. Muchos organismos pueden invadir pero sólo un grupo restringido tiene la capacidad de establecer una infección viable. Esto se debe a que el conducto radicular es un ambiente único que selecciona un

⁶² ABOU-RASS M, BOGEN G. Microorganisms in closed periapical lesions. International endodontic journal. 1998;31(1):39-47

⁶³ MIYAZAKI S, OHNO A, KOBAYASHI I, UJI T, YAMAGUCHI K, GOTO S. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. Microbiology and immunology. 1993;37(4):265-70.

grupo limitado de la flora oral. Los métodos modernos de cultivo han sido esenciales para la caracterización polimicrobiana en el conducto radicular infectado.

Actualmente, en el laboratorio de microbiología se conocen tres métodos para identificar al agente etiológico responsable de un cuadro infeccioso: fenotípicos, moleculares y recientemente proteómicos⁶⁴.

Hoy día, la identificación bacteriana se realiza por métodos fenotípicos, por costo y asequibilidad. Se basan en las características «observables» de las bacterias, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, su sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación.
65

La no concordancia entre las características observables, morfológicas y fenotípicas del aislamiento en estudio, hacen que los métodos fenotípicos sean identificables al microorganismo, pero no es definitivo. No todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica ya que

⁶⁴ BOUA GERMÁN, FERNÁNDEZ OLMOS -ANA B, GARCÍA C. CELIA , SÁEZ-NIETO D JUAN ANTONIO Y VALDEZATE SYLVIA D. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–608

⁶⁵ ISENBERG HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2004. p. 3213–323

una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos.⁶⁶

La PCR fue creada por Kary Mullis en 1983, quien ganó el Premio Nobel de Química en 1.993. La invención y el desarrollo del PCR es uno de los avances técnicos más importantes en la tecnología molecular en el siglo pasado. El método se basa en la replicación *in vitro* del ADN, a través de ciclos repetitivos de reacciones simples. Los principales reactivos utilizados en la PCR son el ADN diana a amplificar, un filamento de oligonucleótidos (cebadores) complementarios a secuencias conocidas del ADN diana, cantidades en exceso de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) y una ADN polimerasa estable al calor. La ADN polimerasa más comúnmente utilizada es la aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa). Las reacciones de amplificación se llevan a cabo utilizando termocicladores de ADN especiales⁶⁷.

Con la PCR, varias especies de difícil cultivo han sido aisladas con mas frecuencia del conducto radicular. La biología molecular para identificación microbiana ha dejado claro que varios patógenos orales habían sido pasados por alto debido a las limitaciones de los métodos tradicionales de cultivo. Además, la PCR puede detectar microorganismos cultivables con mayor sensibilidad y especificidad. La técnica de reacción en cadena de la taq polimerasa es un método innovador que se basa en el ensayo de ácido nucleico y posee más alta sensibilidad que cualquier otra técnica microbiología para la identificación de bacterias.

⁶⁶ BOUA, Op cit., pag 61

⁶⁷ KOLMODIN, LA; BIRCH, DE. Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice. En: Methods in molecular biology. 2002; vol. 192, p. 3-18.

Un tipo de PCR denominado amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) o PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR), utiliza uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorios y de corta longitud (8-12 nucleótidos), que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja estringencia (temperatura de anillamiento a 36-45 °C y > 2 mM MgCl₂)⁶⁸. Las ventajas más interesantes de la AP-PCR son su rapidez, flexibilidad, fácil interpretación y relativamente bajo costo. Existen diversos estudios que indican que la AP-PCR posee una baja reproducibilidad (sobre todo cuando se comparan patrones de bandas entre laboratorios diferentes), por lo que se recomienda que se valide y optimice en cada laboratorio. La baja reproducibilidad de la AP-PCR se debe a que es muy sensible a pequeñas variaciones metodológicas, como el procedimiento de extracción de ADN, el tipo de termociclador, la concentración de molde de ADN, la temperatura de anillamiento, la concentración de iones magnesio, etc.

En general, la AP-PCR suele tener un poder de discriminación inferior al de la PFGE, aunque puede incrementarse con la utilización de varios cebadores y mediante la optimización de la PCR. La AP-PCR se ha utilizado en diversos estudios para tipificar bacterias (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella pneumophila*, etc.) y hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*)⁶⁹.

La rep-PCR es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetitivas (secuencias rep) que se

⁶⁸ WELSH J, MCCCELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7213-8

⁶⁹ LASKER BA. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 2002;40:2886-92

encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias, algunas bacterias grampositivas y hongos.⁷⁰ La técnica de REP-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su bajo costo una vez que se dispone de un termociclador.

ERIC-PCR es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gramnegativas como *A. baumannii*. Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR.⁷¹

⁷⁰VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to DNA fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;19:6823-31.

⁷¹ GRÄSER Y, CLARE I, HALLE E, GANTENBERG R, BUCHHOLZ P, JACOBI HD, y cols. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol* 993;31:2417-20

5. METODOLOGIA

5.1. TIPO DE ESTUDIO:

Este estudio fue de tipo experimental *in vitro*, que permitió determinar la presencia de especies específicas determinantes de la periodontitis apical sintomática y asintomática.

5.2. POBLACION:

- POBLACION DIANA: pacientes que acudieron a consulta odontológica en la facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena en el año 2015
- POBLACION ACCESIBLE: pacientes que asistieron al postgrado de Endodoncia y consulta de pregrado de la Universidad de Cartagena en el año 2015.
- POBLACION ELEGIBLE: pacientes que asistieron al postgrado de endodoncia y pregrado de la Universidad de Cartagena para tratamiento de conducto radicular y que además cumplieran con los siguientes criterios: Criterios de Inclusión: dientes con diagnóstico de periodontitis apical sintomática y periodontitis apical asintomática (con presencia de zona radiolúcida asociada al ápice). Criterios de Exclusión: dientes con tratamiento endodóntico previo, dientes con conductos calcificados, dientes con ápice inmaduro, dientes con fracturas verticales, dientes previamente tratados. Criterios de eliminación: fractura de limas durante el proceso de toma de muestra, dientes que al momento de toma de muestra evidencien supuración intracanal.

5.3. MUESTRA

Se seleccionaron veinte (20) dientes de pacientes que acudían a la Clínica del Postgrado de Endodoncia de la Universidad de Cartagena, de los cuales cuatro (4) arrojaron diagnóstico de periodontitis apical sintomática y dieciséis (16) periodontitis apical asintomática, y que cumplieran con los criterios ya descritos.

5.4 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

El cálculo del tamaño muestral, se realizó aplicando la fórmula estadística definida para población conocida; se seleccionaron 20 participantes empleando un muestreo de tipo sistemático en la fase de reclutamiento hasta agotar el tamaño muestral.

5.5 VARIABLES

Las variables que se definieron fueron: 1. presencia de subespecies de *E. faecalis* detectadas en periodontitis apical sintomática y periodontitis apical asintomática; 2. Presencia de otras especies del grupo cocos en las muestras recolectadas; 3. La asociación del factor género con las patologías descritas. Las variables eran de tipo cualitativa; el nivel de medición fue nominal para ambas patologías y la unidad de medida: presencia/ ausencia.

5.6 METODO DE TRABAJO

Este se realizó basado en los mismos pasos de la prueba piloto, descrito a continuación.

5.6.1 PRUEBA PILOTO

Se recolectaron dos (2) muestras correspondientes al diagnóstico de periodontitis apical asintomática, pacientes a los cuales se les aplicó consentimiento informado, historia clínica endodóntica y formato de recolección de la información.

5.7 RECOLECCION DE LA MUESTRA

Los pacientes que se seleccionaron según los criterios de inclusión ya descritos y que asistían a la consulta endodóntica de la Universidad de Cartagena, firmaron un consentimiento informado de manera voluntaria donde se especificó el objetivo del estudio y el procedimiento a realizar.

ASEPSIA DEL CAMPO OPERATORIO: Se tuvo en cuenta la asepsia del campo operatorio y todo el instrumental estaba previamente esterilizado.

TECNICA ANESTESICA: Se colocó técnica anestésica infiltrativa con Roxicaína (Lidocaina) al 2%, 1: 80.000 marca Rophsen Therapeutics.

AISLAMIENTO: Se realizó aislamiento absoluto del campo, con grapa HuFriedy (de acuerdo al órgano dentario seleccionado) y tela de caucho marca Nic Tone (MDC dental).

5.8 PROTOCOLO DE LABORATORIO

5.8.1 ETAPA 1. PROCEDIMIENTOS CLÍNICOS Y MUESTREO

Las muestras fueron obtenidas de tejido pulpar necrótico a nivel de conductos radiculares infectados con periodontitis apical sintomática o asintomática. Luego del aislamiento del diente, se desinfectó el área con peróxido de hidrogeno al 30% y luego con tintura de yodo al 5%. Los desinfectantes halógenos se inactivaron con tiosulfato de sodio al 5%; seguidamente se accedió a la cámara pulpar con una fresa estéril. De haber presencia de líquido seroso en el canal, se tomaban muestras de este con puntas de papel fino de diferentes tamaños. Una lima tipo K # 15 fue introducida hasta 1mm, basado en radiografía, de la parte apical del diente, realizando unos ligeros movimientos. Si el canal estaba seco, una pequeña cantidad de solución salina estéril se introducía en el canal para facilitar la toma de muestra.

Seguidamente, dos puntas de papel # 15 o 20 marca previamente esterilizadas fueron introducidas a la misma profundidad y retenidas en esa posición por 60 segundos, para tomar el líquido del canal. Todas las muestras clínicas colectadas fueron inmediatamente transferidas a un tubo Eppendorf estéril de 2-mL, el cual contenía el medio de transporte VMGA III.

Los tubos Eppendorf que contenían las muestras en el medio de transporte VMGA III, fueron inicialmente pre-incubadas por 30 minutos a 37°C y agitadas vigorosamente en un supermezclador por 60 segundos. Luego se

realizaron 10 diluciones en serie en 1% de agua peptona estéril; 0.1 mL de cada dilución fue distribuida sobre agar sangre. Las cajas de Petri fueron incubadas en una jarra anaerobia a 37°C por 72 h. Las colonias obtenidas fueron subcultivadas múltiples veces sobre agar sangre hasta obtener una colonia homogénea. La pureza de los cultivos fue confirmada por tinción de Gram, morfología de la colonia y actividad hemolítica en agar sangre. Se prepararon y guardaron cultivos en caldo tripticasa soya/glicerol a -80°C para la conservación de cepas y análisis posteriores. Todas las muestras clínicas bacterianas aisladas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales.

5.8.2 ETAPA 2. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción del ADN total se realizó mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200 µl de agua destilada estéril. Estas suspensiones se congelaron a 20 °C durante 30 min y luego se sometieron a ebullición durante 15 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13 000 g durante 5 min a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf estéril, el cual se almacenó a 20 °C hasta el momento de su uso (Millan et al., 2014). Luego de este proceso se midió la calidad y concentración del DNA en el nanodrop. La identificación a nivel de especie de los aislamientos se realizó por pruebas bioquímicas manuales. Las cepas aisladas fueron conservadas en TSA (Agar Tripticasa Soya) para su posterior diagnóstico fenotípico. Los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a 20°C hasta la realización de la amplificación de los genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La presencia del DNA bacteriano fue determinado por la presencia de un amplicón de 1,505 pares de bases, visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

5.8.3 ETAPA 3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La inoculación directa de las muestras fue realizada en agar CAA (Cefalexina, Aztreonam, Arabinosa), selectivo para enterococos y también sobre agar sangre. La identificación de especies enterococales fue realizada inicialmente usando test fenotípicos y pruebas de identificación bioquímica.

La identificación molecular de *E. faecalis* fue realizada mediante PCR, utilizando cebadores o primers especie específicos blancos para los fragmentos de la región del gen 16S rRNA de *E. faecalis*.⁷²

5.8.4 INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE LA INFORMACION

Para la recolección de datos, se utilizó la historia clínica del Postgrado de Endodoncia de la Universidad de Cartagena (ver anexo 1). De acuerdo a la anamnesis y examen oral, se pudo determinar el diagnóstico y así cumplir con los criterios de inclusión para el estudio; posteriormente, se verifico por medio de un Formato de recolección de muestra, la suficiencia, calidad y grado de contaminación de la misma (ver **anexo 2**).

5.8.5 ANÁLISIS ESTADISTICO

⁷² HAMMAD, A. M., HASSAN, H. A. AND SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of Enterococcus spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. Food Control 50 (2015) 815-820

Los resultados fueron registrados en una tabla diseñada en Microsoft Excel 2010, donde se tuvo en cuenta las variables asignadas: PRESENCIA – AUSENCIA, y las patologías descritas PERIODONTITIS APICAL SINTOMATICA (PAS) – PERIODONTITIS APICAL ASINTOMATICA (PAA). Además, se tuvo en cuenta el factor género con relación a las dos patologías.

5.9 CONSIDERACIONES ETICAS

De acuerdo al artículo 11 de la resolución 8430 de 1993, en la cual se establecen las categorías para las investigaciones, se considera este estudio como *riesgo mínimo*, ya que la intervención incluyó toma de muestras con limas y conos de papel. Cada paciente debía firmar un consentimiento informado (**ver anexo 3**) con previa explicación de los objetivos y la finalidad del estudio; a su vez debía asentir que había entendido la explicación dada. Esta aceptación era voluntaria y en ningún momento ocasionaría lesión física o mental.

6. RESULTADOS

Un total de 20 muestras se recolectaron entre Octubre de 2015 a Abril de 2016, de las cuales cuatro (4) correspondían al diagnóstico de periodontitis apical sintomática y dieciséis (16) a periodontitis apical asintomática. Las muestras en su totalidad fueron cultivadas en medios microbiológicos selectivos para el aislamiento de *Enterococcus spp*, de acuerdo con los protocolos estandarizados del laboratorio de Microbiología Clínica y Ambiental del Programa de Biología de la Universidad de Cartagena. **Fig 1.**

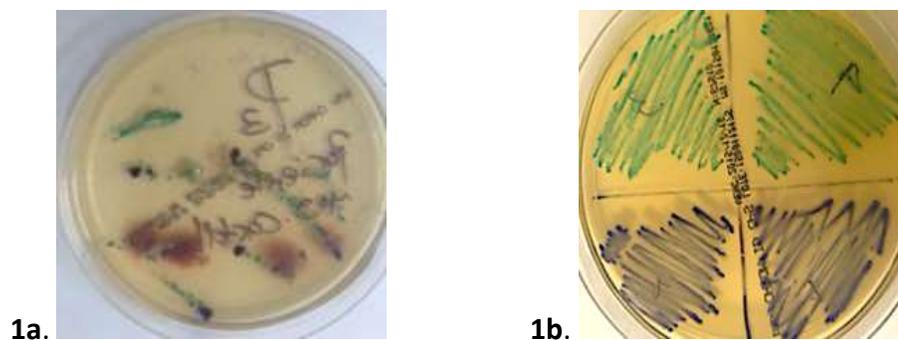


Fig. 1a. Aislamiento de cepas de *Enterococcus spp* en agar cromogénico. **Fig. 1b.** Crecimiento presuntivo de *E. faecalis*.

El porcentaje de aislamiento presuntivo de *Enterococcus spp* de todas las muestras procesadas fue 100%. Sin embargo, se realizaron diferentes test confirmatorios para especie y se encontró que todas las cepas bacterianas

no correspondían a *E. faecalis*, encontrándose cepas presuntivas para *Enterococcus faecium* (*E. faecium*).

Para la diferenciación de las diversas especies de *Enterococcus*, se realizaron varios test basados en el consumo de los diferentes sustratos como test de bilis esculina, arabinosa, sucrosa, piruvato, xilosa, sorbitol y crecimiento en un medio de cultivo con alto porcentaje de cloruro de sodio (NaCl 6,5%). El resultado de la caracterización fenotípica de *Enterococcus* fue 43% de las cepas aisladas presuntivas para *E. faecium* y el 57% presuntiva para *E. faecalis*. **Fig 2.**

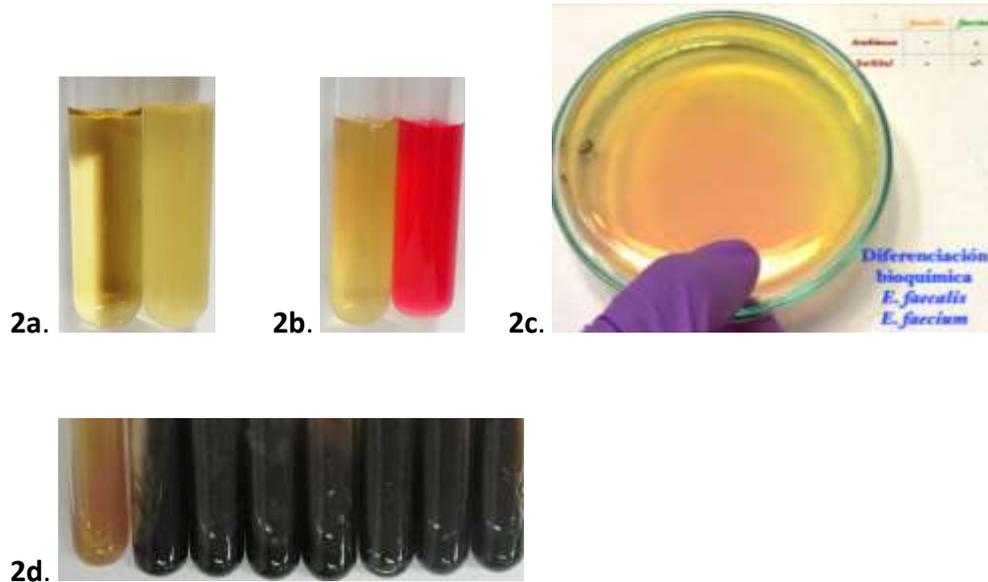


Figura 2. **2a** (Caldo BHI /NaCl 6,5%), **2b** (Utilización de carbohidratos Caldo rojo fenol-sorbitol (+)), **2c** (diferenciación bioquímica *E. faecalis* y *E. faecium*) y **2d** (agar bilis esculina).

Detección molecular de género *Enterococcus* por PCR

Con el fin de determinar si los microorganismos aislados correspondían al género *Enterococcus spp*, se llevaron a cabo pruebas moleculares para su identificación definitiva a través de PCR. Para este fin, se utilizaron oligonucleótidos (primers) específicos para detectar muestras positivas para el género *Enterococcus* (ver Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos (Primers) usados para la identificación de los aislamientos.

Primer	Gen	Secuencia 5'- 3'	Referencia
Ent 1	<i>Tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG	Ke et al., 1999
Ent 2		AACTTCGTCACCAACGCGAAC	
E1	<i>ddl E. faecalis</i>	ATCAAGTA CAGTTAGTCTT	Dutka – Malen et al., 1995
E2		ACGATTCAAAGCTAACTG	
F1	<i>ddl E. faecium</i>	GCAAGGCTTCTTAGAGA	Dutka – Malen et al., 1995
F2		CATCGTGTAAGCTAACTTC	

De las muestras evaluadas por PCR se identificó el género *Enterococcus* en el 100% de los aislados (Figura 3).

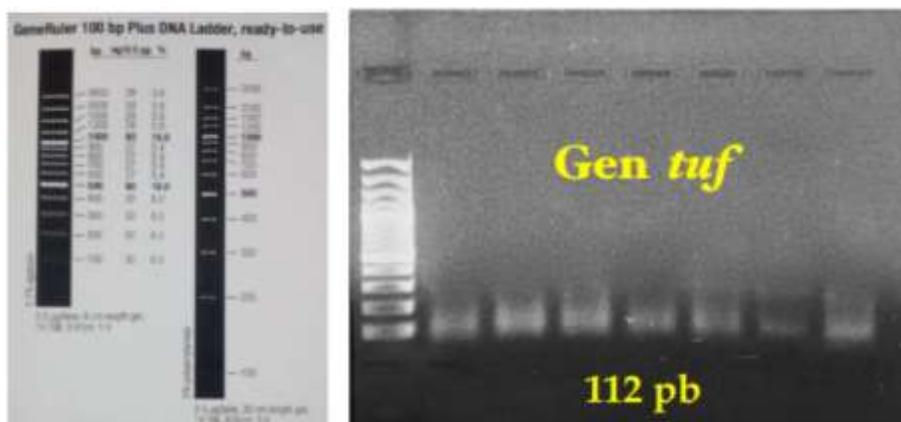


Figura 3. Patrón electroforético del gen *tuf* de las cepas aisladas

Detección molecular de *E. faecalis* por PCR

Todas las cepas aisladas que fueron sometidas a PCR, con el gen *ddl E. faecalis*, se logró identificar la especie *E. faecalis* en el 57% de los casos. La figura 4, representa el corrido del patrón electroforético de muestras positivas de periodontitis apical y el control positivo ATCC *E. faecalis* 29212.

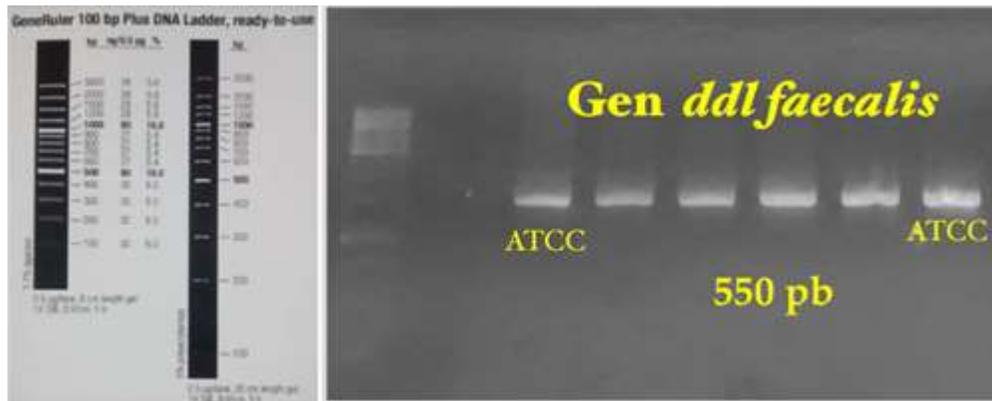


Fig. 4 Gen *ddl E. faecalis*

Detección molecular de *E. faecium* por PCR

Las cepas que fueron sometidas a PCR y arrojaron resultado negativo con el gen *ddl E. faecalis*, se les realizó una PCR adicional con el gen *ddl E. faecium* logrando identificar que el 43% de las cepas aisladas correspondían *E. faecium* como muestra la figura 5.

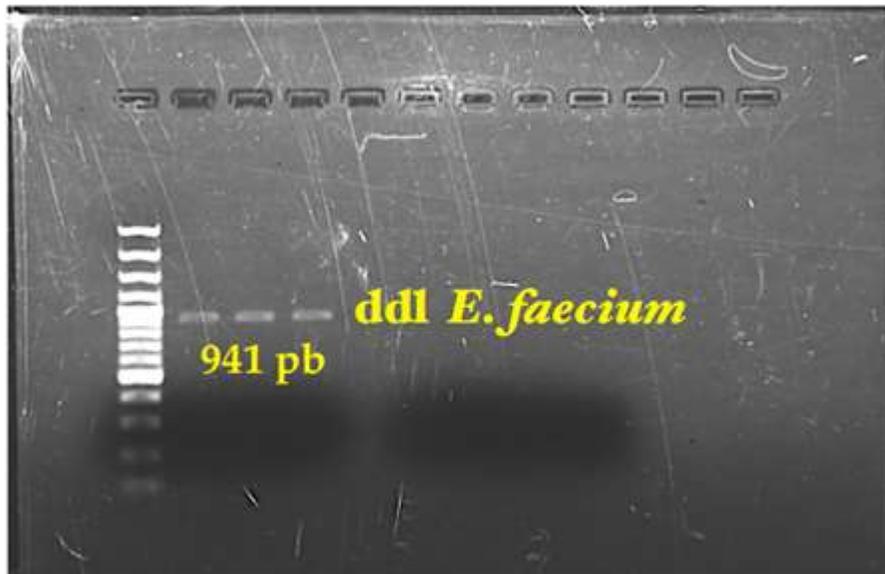


Fig. 5 Gen *ddl E. faecium*

En el presente estudio, todas las muestras aisladas fueron consideradas presuntivas de *Enterococcus faecalis* al realizar su identificación en medios de cultivos específicas como agar sangre, agar Slanez-Barlet y la prueba de bilis esculina. Al realizar la prueba de fermentación de sorbitol, los aislados presentaron ambigüedad para identificar las especies, indicando diferencias bioquímicas en los mismos. Estas diferencias fueron esclarecidas preliminarmente con el test de arabinosa, concluyendo la presencia de dos especies diferentes: *E. faecalis* y *E. faecium*.

Teniendo en cuenta estos resultados, fueron realizados los ensayos de amplificación del gen *ddl*, para *E. faecalis* y *E. faecium*, esclareciendo la presencia de once (11) *Enterococcus* de la especie *faecalis* y nueve (9) de la especie *faecium*. Estos resultados sugieren la identificación especie-específica de cepas aisladas.

En relación con las patologías periodontitis apical sintomática y asintomática, no hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la determinación del factor género, la media fue de 48.95 ± 9.8 , y un $P < 0,05$ (0,217).

7. DISCUSION

El género Enterococo está constituido por 54 especies diferentes, sobresaliendo por su importancia clínica, dos subespecies concretas: *E. faecalis* y *E. faecium*. *E. faecalis* es el responsable de la mayoría de las infecciones por enterococos en seres humanos, ocasionando hasta el 80% de las mismas. *E. faecium* provoca el 5-10% de las infecciones por enterococos. Sin embargo, este último ocasiona la mayoría de las infecciones por enterococos con resistencia adquirida a antibióticos y multirresistentes.

El género Enterococo posee uno de los mayores potenciales patogénicos de la naturaleza, por diversos factores como: el hecho de ser un constituyente habitual de la flora intestinal, la multirresistencia intrínseca, la colonización constante en ambientes hospitalarios, la extraordinaria plasticidad genómica y la eficiencia en la adquisición de nuevos genes de resistencia.⁷³

Diferentes tipos de sondas moleculares han sido usadas para la identificación a nivel de especie. Sondas de oligonucleótidos de ADN complementarias a secuencias del gen 23S rRNA son específicas para *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*. Las sondas marcadas fluorescentemente en hibridación *in situ*, han sido usadas para un gran número de especies pero los resultados han mostrado gran variabilidad entre una especie y otra. Por ejemplo, al utilizar sondas marcadas con biotina generadas a partir del DNA genómico de las cepas ATCC *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, y *E. casseliflavus*, fue posible caracterizar más de 100 aislados enterocococales de diferentes regiones geográficas previamente identificados por métodos bioquímicos estándar

⁷³ O'DRISCOLL T, CRANK CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist.* 2015 Jul 24; 8:217-30.

(Donabedian et al., 1995)⁷⁴. No obstante, luego de realizar cortes con la enzima de restricción EcoRI, cinco aislados, 4 *E. faecium* y uno *E. gallinarum* previamente identificados bioquímicamente, hibridaron con sondas de *E. gallinarum* y *E. cassellflavus*, respectivamente. En el mismo trabajo, patrones diferentes también fueron encontrados al utilizar la enzima de restricción SmaI por electroforesis de campo pulsado (PFGE), variando en las mismas especies o conservados en gran número de especies. Sin embargo permitió la clasificación de especies no móviles y no pigmentadas de *E. gallinarum* y *E. cassellflavus*, respectivamente. El presente estudio evidenció la presencia de *enterococcus faecalis* en una selección de dientes con periodontitis apical sintomática y asintomática, aplicando métodos moleculares como PCR, para generar un grado de confiabilidad a este resultado.

Otros estudios han sido desarrollados con sondas específicas de genes de resistencia intrínseca a antibióticos tales como el gen *aac*, que confiere moderados niveles de resistencia a tobramicina, kanamicina, sisomicina y netilmicina. Fue encontrado en todos los 58 aislados de *E. faecium* pero no en 13 de otras especies enterococcales (Costa et al., 1993; Coque et al., 1995)⁷⁵. Los genes *vanC-1* y *vanC-2* confieren bajo nivel de resistencia a vancomicina y están siendo encontrados en *E. gallinarum* y *E. casseflavus* respectivamente, pero no en otras especies, indicando que ellos son especie específicas. Estos genes están siendo detectados por hibridación y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Similarmente, los genes que codifican para el dipéptido terminal D-Ala-D-ala, diana de la vancomicina (*ddl*), de *E. faecalis* y *E. faecium*, fueron encontrados

⁷⁴ DONABEDIAN, S., CHOW, J. W , SHLAES, D M., GREEN, M., AND ZERVOS, M J DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococct to the specieslevel J Clin Mzcrobzol (1995) . 33, 141-145

⁷⁵COQUE, M T., AND MURRAY, B E Identification of Enterococcus faecalzs strains by DNA hybridization and pulsed-field electrophoresrs gel J Clan Mzcroblol (1995) . 33,3368-3369.

solo para estas especies, indicando que ellos son específicos para la identificación de las mismas.⁷⁶

La aplicación de análisis de genes *tuf* a la identificación molecular ha sido evaluada para muchas especies bacterianas, incluyendo *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Campylobacter* y especies de *Aeromonas*. En el estudio denominado “La utilización de *tuf* como un gen para la secuencia basada en identificación de cocos Gram-positivos del género *Enterococcus*, *Streptococcus* coagulasa negativos, *Staphylococcus* y *Lactococcus*”, demuestra que la amplificación del gen *tuf* por PCR, utilizando cebadores diseñados específicamente, seguido de análisis de la secuencia, es un enfoque molecular adecuado para la identificación de *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus*⁷⁷.

En el estudio de Sanchez y cols. indicaron que 83/84 (98%) cepas seleccionadas corresponden a *E. faecalis*, confirmadas por PCR, como bandas amplificadas de 941 pb obtenidos con los cebadores específicos para esta especie en todos los ensayos. *E. faecium* (2%) fue la única cepa con diferentes características identificadas a través de pruebas fenotípicas y moleculares. En este caso, un producto de amplificación de 550 pb se obtuvo usando cebadores específicos para esta especie⁷⁸, lo cual coincide con nuestro estudio, ya que los resultados exhiben

⁷⁶DUTKA-MALEN, S., EVERS, S , AND COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin. Microbiol (1995.) 33, 24-27.

⁷⁷ XUERUI LI, JUAN XING, BAOYU LI, PU WANG AND JIXING LIU. Use of *tuf* as a target for sequence-based identification of Gram-positive cocci of the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, and *Lactococcus*. Li et al. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2012, 11:31 <http://www.ann-clinmicrob.com/content/11/1/31>

⁷⁸ SÁNCHEZ-SANHUEZA GABRIELA, GONZÁLEZ-ROCHA GERARDO, DOMINGUEZ MARIANA, BELLO-TOLEDO HELIA. *Enterococcus* spp. isolated from root canals with persistent chronic apical periodontitis in a Chilean population. Braz. J. Oral Sci. vol.14 no.3 Piracicaba July/Sept. 2015

la presencia de *E. faecalis* en la mayor parte de las muestras cultivadas (57%), y donde, *E. faecium* representa una población menor en las muestras recolectadas (43%).

Consecuentemente con el estudio de Covo M. Eduardo, Gutiérrez Z. Gina y Palacios M. Liliana, el porcentaje de aislamientos presuntivos por cultivo de *E. faecalis* en las muestras procesadas fue de 54,38%. Sin embargo, de las 57 muestras con diagnóstico de periodontitis apical asintomática, se obtuvo 57,8 % (33/57) de muestras positivas para crecimiento bacteriano de acuerdo a las características macroscópicas propias de *E. faecalis*.⁷⁹

Se ha descrito en la literatura que la frecuencia del *E. faecalis* en infecciones endodónticas primarias es del 4%, siendo estas infecciones de naturaleza polimicrobiana; mientras que en lesiones periapicales persistentes se presenta con una frecuencia del 77%, siendo capaz de sobrevivir como microorganismo único o como mayor componente de la flora microbiana bucal⁸⁰.

Para que los enterococos puedan actuar como patógenos, primero deben adherirse a los tejidos del hospedero; éstos pueden hacerlo a través de ligandos adhesivos específicos a la matriz extracelular de los mismos. Durante el proceso de invasión a los tejidos, los enterococos deben encontrarse en un medio ambiente con potenciales de óxido reducción elevados, nutrientes esenciales limitados, leucocitos fagocíticos y otras defensas del hospedero. Todos estos

⁷⁹COVO M. EDUARDO, GUTIÉRREZ Z. GINA Y PALACIOS M. LILIANA, Tesis de grado PREVALENCIA DE Enterococcus Faecalis EN CONDUCTOS RADICULARES DE PACIENTES CON PATOLOGÍA PULPAR Y PERIAPICAL. UNIVERSIDAD DE CARTAGENA. PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN ENDODONCIA. 2014

⁸⁰GOMES B, PINHEIRO E, JACINTO R, ZAIA, FERRAZ C, SOUZA-FILHO F. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. Journal of endodontics 2008; 34(5):537- 540

factores ayudan a que se expresen genes que favorecen el crecimiento de estos microorganismos.⁸¹

A diferencia de nuestro resultado, en el estudio de Selcuk M. y cols., *E. faecalis* se detectó en 9 de 36 (25%) conductos radiculares con periodontitis apical crónica (infecciones endodónticas primarios), lo cual no fue considerado significativo en comparación con los hallazgos en dientes con fracaso endodóntico (74,4%).⁸²

⁸¹ PARDI GERMAN, GUILARTE CAROLINA, CARDOZO ELBA Y BRICEÑO ELSI. Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta odontológica Venezolana*. 2009;47

⁸² SELCUK M. OZBEKI; AHMET OZBEKII; AZIZ S. ERDORGANI. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *J. Appl. Oral Sci.* Sept./Oct. 2009. vol.17 no.5

8. CONCLUSIONES

- Se evidenció la presencia de *enterococcus faecalis* en una selección de dientes con periodontitis apical sintomática y asintomática, aplicando métodos moleculares (PCR) para generar un grado de confiabilidad a este resultado.
- Se identificó especie específica de *Enterococcus faecalis*.
- Se detectó otra especie específica de *Enterococcus faecium*.
- No hubo diferencia significativa en cuanto al factor género con respecto a las dos patologías determinantes.
- Los métodos moleculares constituyen procedimientos discriminatorios y sensibles para la identificación de cepas de Enterococos, incluso en aislamientos con características bioquímicas ambiguas.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda el estudio exhaustivo de las características de *enterococcus faecalis*, el cual es potencialmente patógeno en periodontitis apical sintomática y asintomática, además del aumento del tamaño de la muestra. Así mismo, la profundización de la presencia de subespecies en este tipo de patologías, lo cual es considerado un método de alto costo.

10. BIBLIOGRAFIA

ABOU-RASS M, BOGEN G. EN: Microorganisms in closed periapical lesions. International endodontic journal. 1998;31(1):39-47

ARDILA M. CARLOS; MAGGIOLO V. SILVANA; ARROYO, ERIK; ARMIJO P. JACQUELINE; SILVA, NORA. EN: Enterococcus faecalis in teeth with apical asymptomatic periodontitis. AMC vol.18 no.4 Camagüey jul.-ago. 2014

AZUMA, MM; SAMUEL, RO; GOMES-FILHO, JE; DEZAN-JUNIOR, E; CINTRA, Lt. EN: The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. En: International endodontic journal. 2014; vol. 47, N° 7, p. 615-621

BHAKDI S, KLONISCH T, NUBER P, FISCHER W. EN: Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. Infection and immunity. 1991;59(12):4614-20.

BOUA GERMÁN, FERNÁNDEZ OLMOS -ANA B, GARCÍA C. CELIA, SÁEZ-NIETO D JUAN ANTONIO Y VALDEZATE SYLVIA D. EN: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecc Microbiol Clin. 2011;29(8):601–608

CLEWELL DB, WEAVER KE. EN: Sex pheromones and plasmid transfer in Enterococcus faecalis. Plasmid. 1989;21(3):175-84.

COQUE, M T., AND MURRAY, B E. EN: Identification of Enterococcus faecalis strains by DNA hybridization and pulsed-field electrophoresis gel J Clin Microbiol (1995) . 33,3368-3369.

COVO M. EDUARDO, GUTIÉRREZ Z. GINA Y PALACIOS M. LILIANA, EN: Tesis de grado Prevalencia de *Enterococcus Faecalis* en conductos radiculares de pacientes con patología pulpar y periapical. Universidad de Cartagena. Programa de especialización en endodoncia. 2014.

CROSS CE, HALLIWELL B, BORISH ET, PRYOR WA, AMES BN, SAUL RL, Y COLS. EN: Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*. 1987;107(4):526-45.

DISTEL JW, HATTON JF, GILLESPIE MJ. EN: Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of endodontics*. 2002;28(10):689-93.

DOMIG KJ, MAYER HK, KNEIFEL W. EN: Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *International journal of food microbiology*. 2003;88(2-3):165-88.

DONABEDIAN, S., CHOW, J. W , SHLAES, D M., GREEN, M., Y ZERVOS, M J EN: DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococci to the species level *J Clin Microbiol* 1995. 33, 141-145

DUTKA-MALEN, S., EVERS, S , AND COURVALIN, P.)a. EN: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin. Microbiol* . 1995. 33, 24-27.

EHRENFELD EE, KESSLER RE, CLEWELL DB. EN: Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence

of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *Journal of bacteriology*. 1986;168(1):6-12.

FINLAY BB. Interactions of enteric pathogens with human epithelial cells. Bacterial exploitation of host processes. EN: *Advances in experimental medicine and biology*. 1997;412:289-93

FISHER K, PHILLIPS C. EN: The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009;155(Pt 6):1749-57.

FOSCHI F, CAVRINI F, MONTEBUGNOLI L, STASHENKO P, SANBRI V, PRATI C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. EN: *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20:289-95.

FOUAD AF, BARRY J, CAIMANO M, CLAWSON M, ZHU Q, CARVER R, HAZLET K, RADOLF JD. PCR-Based identification of bacteria associated with endodontic infections. EN: *J Clin Microbiol* 2002; 40:3223-31

FOULQUIE MORENO MR, SARANTINOPOULOS, TSAKALIDOU E, DE VUYST L. The role and application of enterococci in food and health. EN: *International journal of food microbiology*. 2006;106(1):1-24

GOMES B, PINHEIRO E, JACINTO R, ZAIA A, FERRAZ C, SOUZA-FILHO F. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. EN: *Journal of endodontics* 2008; 34(5):537- 540

GORDILLO, M. E., K. V. SINGH, y B. E. MURRAY. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. EN: J. Clin. 1993. Microbiol. 31:1570-1574.

GRAUNAITE, I; LODIENE, G; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. En: 2012; vol. 2 N° 4, p. e1.

GRASER Y, CLARE I, HALLE E, GANTENBERG R, BUCHHOLZ P, JACOBI HD, et al. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by polymerase chain reaction fingerprinting. EN: J Clin Microbiol 1993;31:2417-20

GROSSMAN LOUIS I., W.BENJAMIN. M.. EN: Solution of pulp tissue by chemical agents. J. Endod Volume 8, Supplement. January 1982. Pages S10-S12.

HACKER J, BLUM-OEHLER G, MUHLDORFER I, TSCHAPE H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. EN: Molecular microbiology. 1997;23(6):1089-97.

HALLER C, BERTHOLD M, WOBSE D, KROPEC A, LAURIOLA M, SCHLENSAK C, y COLS. EN: Cell-Wall Glycolipid Mutations and Their Effects on Virulence of *E. faecalis* in a Rat Model of Infective Endocarditis. PLoS One. 2014 Mar;9(3):e91863

HAMMAD, A. M., HASSAN, H. A. y SHIMAMOTO, T. EN: Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. Food Control 50 (2015) 815-820

HASHIOKA K, SUZUKI K, YOSHIDA T, NAKANE A, HORIBA N, NAKAMURA H. Relationship between clinical symptoms and enzyme-producing bacteria isolated from infected root canals. EN: J Endod. 1994;20:75-7

HUYCKE MM, GILMORE MS. EN: Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. Plasmid. 1995;34(2):152-6.

HYNES WL, WALTON SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. EN: FEMS microbiology letters. 2000;183(2):201-7.

ISENBERG HD, editor. EN: Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2004. p. 3213–323

KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. EN: Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20:340–9.

KAYAOGLU G, ORSTAVIK D. 2004. Virulence Factors of Enterococcus faecalis: Relationship to Endodontic Disease. EN: International and American Associations for Dental Research. 15 (5):308-320

KOLMODIN, LA; BIRCH, DE. Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice. EN: Methods in molecular biology. 2002; vol. 192, p. 3-18.

KOVAC, J; KOVAC, D; SLOBODNIKOVA, L; KOTULOVA, D. Enterococcus faecalis and Candida albicans in the dental root canal and periapical infections. En: Bratislavské lekárske listy. 2013; vol. 114, N° 12, p. 716-720.

KOWALSKI WJ, KASPER EL, HATTON JF, MURRAY BE, NALLAPAREDDY SR, GILLESPIE MJ 2000;68(9):5218-24. Enterococcus faecalis adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. EN: Journal of endodontics. 2006;32(7):634-7.

KREISWIRTH B, KORNBLUM J, ARBEIT RD, EISNER W, MASLOW JN, McGEER A, et al. EN: Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Science. 1993;259(5092):227-30.

KUMTHORN MALATHUN, KAVINDRA V. SINGH. J. Repetitive Sequence-Based PCR versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing of Enterococcus faecalis at the Subspecies Level. EN: Clin. Microbiol. January 1998 vol. 36 no. 1 211-215

LASKER BA. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of Aspergillus fumigatus isolates. EN: J Clin Microbiol 2002;40:2886-92

LOVE RM. Enterococcus faecalis-a mechanism for its role in endodontic failure. EN: Int Endod J. 2001;34:399-405.

MAKINEN PL, CLEWELL DB, AN F, MAKINEN KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from Streptococcus faecalis (strain OG1-10). EN: The Journal of biological chemistry. 1989;264(6):3325-34.

MATSUO T, SHIRAKAMI T, OZAKI K, NAKANISHI T, YUMOTO H, EBISU S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. EN: J Endod 2003;29:194-200

McBRIDE, S. M., V. A. FISCHETTI, D. J. LEBLANC, R. C. MOELLERING, Jr., y M. S. GILMORE. EN: Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. PLoS ONE e582. 2007

MIYAZAKY S, OHNO A, KOBAYASHI I, UJI T, YAMAGUCHI K, GOTO S. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. EN: Microbiology and immunology. 1993;37(4):265-70

MOLVEN O, OLSEN I, KEREEKES K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. EN: Endod Dent Traumatol. 1991;7:226-9

NAIR PN, HENRY S, CANO V, VERA J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. EN: Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2005;99(2):231-52.

O'DRISCOLL T, CRANK CW. EN: Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. Infect Drug Resist. 2015 Jul 24; 8:217-30.

OLMSTED SB, DUNNY GM, ERLANDSEN SL, WELLS CL. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its

internalization by cultured intestinal epithelial cells. EN: The Journal of infectious diseases. 1994;170(6):1549-56.

PARDI GERMAN, GUILARTE CAROLINA, CARDOZO ELBA Y BRICEÑO ELSI. Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. EN: Acta odontológica Venezolana. 2009;47

PÉREZ ALFAYATE R., DÍAZ-FLORES GARCÍA V., ALGAR PINILLA J., VALENCIA DE PABLO O., ESTÉVEZ LUAÑA R., CISNEROS CABELLO R. EN: Actualización en microbiología endodóntica. Cient. Dent. 2013; 10; 1: 27-39

ROCAS, IN; SIQUEIRIA, JF JR. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. EN: Journal of clinical microbiology. 2012; vol. 50, N° 5. p. 1721-1724

ROCAS, IN, SIQUEIRA JR., J.F., SANTOS, K.R.N., 2004. Association of coccus faecalis with different forms of periradicular diseases. EN: J. Endod. 30, 315e320.

ROZDZINSKI E, MARRE R, SUSAN M, WIRTH R, MUSCHOLL-SILBERHORN A. EN: Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. Microbial pathogenesis. 2001;30(4):211-20

SABOIA-DANTAS CJ, COUTRIN DE TOLEDO LF, SAMPAIO-FILHO HR, SIQUEIRA JF., Jr Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. EN: Oral Microbiol Immunol. 2007;22:320-5

SAKAMOTO M, SIQUEIRA JF, ROÇAS IN, BENNO Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. EN: Oral Microbiol Inmunol 2008; 23: 275-281.45.

SANCHEZ-SANHUEZA GABRIELA, GONZALEZ-ROCHA GERARDO, DOMINGUEZ MARIANA, BELLO-TOLEDO HELIA. Enterococcus spp. isolated from root canals with persistent chronic apical periodontitis in a Chilean population. Braz. EN: J. Oral Sci. vol.14 no.3 Piracicaba July/Sept. 2015

SANNOMIYA P, CRAIG RA, CLEWELL DB, SUZUKI A, FUJINO M, TILL GO, et al. EN: Characterization of a class of nonformylated Enterococcus faecalis-derived neutrophil chemotactic peptides: the sex pheromones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990;87(1):66-70.

SELCUK M. OZBEKL; AHMET OZBEKLL; AZIZ S. ErdorganIII. Analysis of Enterococcus faecalis in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. EN: J. Appl. Oral Sci. vol.17 no.5 Bauru Sept./Oct. 2009.

SEPULVEDA MARCELA, BELLO HELIA, RUIZ MERY, HORMAZABAL F JOSE, DOMINGUEZ MARIANA, GONZALEZ GERARDO, MELLA SERGIO M, ZEMELMAN RAUL. Classic and molecular methodologies for the identification of Enterococcus species. EN: Rev. méd. Chile v.130 n.1 ene. 2002. Santiago

SHANKAR N, BAGHDAYAN AS, GILMORE MS. EN: Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. 2002;417(6890):746-50.

SHANKAR V, BAGHDAYAN AS, HUYCKE MM, LINDAHL G, GILMORE MS. EN: Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and immunity*. 1999;67(1):193-200.

SILVA BL, NELSON FP, FARIA G, SOUZA SM, ITO IY. Bacterial profile in primary teeth with necro/c pulp and periapical lesions. EN: *Braz Dent J* 2006;17(2):144-48.

SIQUEIRA JF Jr, ROCAS IN, ROSADO AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. EN: *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:363-70

SOOD S, MALHOTRA M, DAS BK, KAPIL A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. EN: *The Indian journal of medical research*. 2008;128(2):111-21.

STILES ME, HOLZAPFEL WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. EN: *International journal of food microbiology*. 1997;36(1):1-29.

SUNDQVIST G, FIGDOR D. Endodontic treatment of apical periodontitis. EN: Ørstavik D, Pitt Ford T editor. *Essential endodontology*. Oxford (England): Blackwell Science Ltd; 1998;p. 242–277

TENDOLKAR PM, BAGHDAYAN AS, SHANKAR N. EN: Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2003;60(12):2622-36.

VANEK NN, SIMON SI, JACQUES-PALAZ K, MARISCALO MM, DUNNY GM, RAKITA RM. Enterococcus faecalis aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. EN: FEMS immunology and medical microbiology. 1999;26(1):49-60.

VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI JR. EN: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to DNA fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991;19:6823-31

WAAR, K., R. J. WILLEMS, M. J. SLOOFF, H. J. HARMSEN, and J. E. DEGENER. 2003. Molecular epidemiology of Enterococcus faecalis in liver transplant patients at University Hospital Groningen. EN: J. Hosp. Infect.5553-60

WALTIMO TM, SEN BH, MEURMAN JH, ORSTAVIK D, HAAPASALO MP. EN: Yeasts in apical periodontitis. Crit RevOralBiolMed. 2003; 14:128-37

WELSH J, McCELLAND M. EN: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990;18:7213-8

WILLEMS RJ, HOMAN W, TOP J, VAN SANTEN-VERHEUVEL M, TRIBE D, MANZIOROS X, Y COLS. EN: Variant esp gene as a marker of a distinct

genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet*. 2001;357(9259):853-5.

XUERUI LI, JUAN XING, BAOYU LI, PU WANG , JIXING LIU. Use of *tuf* as a target for sequence-based identification of Gram-positive cocci of the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, and *Lactococcus*. Li et al. EN: *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2012, 11:31 <http://www.ann-clinmicrob.com/content/11/1/31>

YOUNG G, TURNER S, DAVIES JK, SUNDQVIST G, FIGDOR D. 2007 Bacterial DNA Persists for Extended Periods after Cell Death EN: *J. Endod.* Volume 33, Pages 1417-1420

ZOLETTI G.O., SIQUEIRA J.F., K.R.N. SANTOS. August 2006. Identification of *Enterococcus faecalis* in Root-filled Teeth With or Without Periradicular Lesions by Culture-dependent and—Independent Approaches. EN: *J. Endod.* Volume 32, Issue 8 , Pages 722-726

ANEXO #1



UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
Facultad de Odontología

Posgrado de
Endodoncia

PACIENTE: _____

FECHA: _____ **EDAD:** _____

DIRECCION: _____

OCUPACION: _____ **TELEFONO:** _____

DIR DEL TRABAJO: _____ **TELEFONO:** _____

NOMBRE DEL PADRE O ACUDIENTE SI ES MENOR: _____

NOMBRE DE ODONT. QUE REMITE _____

HISTORIA MÉDICA

	SI	NO
1. ESTA EN BUEN ESTADO DE SALUD?	_____	_____
2. ESTA SIENDO TRATADO POR SU MEDICO?	_____	_____
3. ESTA TOMANDO ALGUNA MEDICINA?	_____	_____
4. ES ALERGICO A: anestésicos, penicilinas u Otros medicamentos o alimentos	_____	_____
5. HA TENIDO SANGRADO EXCESIVO DURANTE ALGUNA INTERVENCION?	_____	_____
6. HA TENIDO ALGUNA ENFERMEDAD DE LAS SIGUIENTES? Presión alta, fiebre reumática, Asma, diabetes, desordenes nerviosos o Hepatitis	_____	_____
7. HA TENIDO OTRA ENFERMEDAD SERIA?	_____	_____
8. PACIENTES MUJERES SI ESTAN EMBARAZADAS QUE MES?	_____	_____

ANTECEDENTES DEL CASO Y EXAMEN CLINICO

ESTADO ACTUAL:

DOLOR: PROVOCADO ESPONTÁNEO IRRADIADO LOCALIZADO

PALPACIÓN PERCUSIÓN FÍSTULA INFLAMACIÓN

FRIO: TIEMPO DE DURACION DEL DOLOR: _____

CALOR: TIEMPO DE DURACION DEL DOLOR: _____

VITALOMETRO: RESPONDE NO RESPONDE

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS: CRICK DENTINARIO, CEMENTARIO O PRUEBA

ANESTESICA: RESPONDE NO RESPONDE

R.X: _____

DIAGNÓSTICO: _____

PRONÓSTICO: _____

INTERVENCIÓN INDICADA: _____

CONVENCIONES	
S: sano	PPF: prótesis parcial fija
A: ausente	PT: prótesis total
EX: extruido	C: caries
AM: amalgama	DI: desgaste incisal
R: resina	R.R: resto radicular
OT: obt. Temp	END: endodoncia
IM: incrus metal	MG: mesogresión
P: pónico	DG: distogresión
N: núcleo	PG:palatogresión
C.C: corona completa	VG: vestibulogresión
PR: p. removible	LG: linguogresión

DESCRIPCIÓN			
11	21	31	41
12	22	32	42
13	23	33	43
14	24	34	44
15	25	35	45
16	26	36	46
17	27	37	47
18	28	38	48

FECHA	TECNICA OPERATORIA

DIEN
TE:
GRA
PA:

ANEXO # 2

FORMATO INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE MUESTRA



Título de la investigación: DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SUBESPECIES DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EN DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL SINTOMATICA Y PERIODONTITIS APICAL ASINTOMATICA

1. NOMBRE DEL PACIENTE	
2. IDENTIFICACION	
3. EDAD	
4. TELEFONO DE CONTACTO	
5. SERIAL PACIENTE/MUESTRA N°	
6. DIAGNOSTICO	
7. MUESTRA SUFICIENTE	
8. MUESTRA INSUFICIENTE	
9. ¿HUBO CONTAMINACION DE LA MUESTRA DURANTE LA RECOLECCION, SIEMBRA Y TRANSPORTE?	
10. ¿HUBO ALGUN INCIDENTE RELACIONADO CON LA CALIDAD DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO?	

INSTRUCTIVO PARA EL DILIGENCIAMIENTO DEL FORMATO INSTRUMENTO RECOLECCION DE LA MUESTRA



Este instructivo consta de 10 ítems, los cuales deben ser diligenciados en su totalidad. Los cuatro (4) primeros puntos están directamente relacionados con los datos personales del paciente seleccionado. El ítem 5 se refiere al número asignado para llevar el orden de cada paciente/muestra; por otro lado, el ítem 6 hace referencia al diagnóstico que debe coincidir con el consignado en la historia clínica. Los ítems 7 y 8 hacen alusión a la suficiencia de la muestra, la cual es determinada por el personal del laboratorio que se encarga de la parte final de la toma de muestra (cultivo) y traslado al laboratorio; igualmente los ítems 9 y 10 serán diligenciados en el área de laboratorio, ya que allí se determinara tanto el grado de contaminación, como la calidad de la muestra.

Nota: Todos los campos deben ser diligenciados obligatoriamente.

ANEXO 3
CONSENTIMIENTO INFORMADO



PARTE I: Información acerca de la Investigación

Título de la investigación: DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SUBESPECIES DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EN DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL SINTOMATICA Y PERIODONTITIS APICAL ASINTOMATICA

Protocolo Número: NO APLICA

Patrocinador: NO APLICA

Investigador principal: EDUARDO COVO MORALES

Introducción:

Este consentimiento informado está dirigido a hombres y mujeres mayores de 20 años, atendidos en las clínicas del postgrado de Endodoncia de la Universidad _de Cartagena_ y de práctica privada, que son invitados a participar en la investigación y deberá ser firmado sólo si usted está de acuerdo en participar en este estudio. Usted recibirá una copia completa del documento.

Yo soy el Dr (a) _____ y trabajo como co-investigador en este proyecto de investigación. Estamos haciendo una investigación sobre PATOLOGIA PERIAPICAL. Se quiere estudiar LA PRESENCIA DE SUBESPECIES DE

ENTEROCOCCUS FAECALIS EN DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL SINTOMATICA Y PERIODONTITIS APICAL ASINTOMATICA .
Para esto se requiere tomar muestra necrótica. Lo voy a invitar a participar en ésta investigación y le daré toda la información que usted desee. No tiene que decidir ahora y está en libertad de hablar con la persona que usted desee sobre la investigación.

Si hay palabras que usted no entienda, puede decírmelo y nos tomamos el tiempo necesario para poder explicarle y que le quede claro, de igual manera si le surgen más preguntas puede preguntarme a mí, o a otro miembro del equipo.

Propósito:

Usted debe entender que el objetivo de ésta investigación es

1) DETERMINAR LA PRESENCIA DE SUBESPECIES DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EN DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL SINTOMATICA

2) DETERMINAR LA PRESENCIA DE SUBESPECIES DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EN DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL ASINTOMATICA

Selección de participantes

Estamos invitando a hombres y mujeres mayores de 20 años que tengan **DIAGNOSTICO DE PERIODONTITIS APICAL SINTOMATICA Y ASINTOMATICA** que asisten a la clínica odontológica de la Universidad **_DE CARTAGENA_** y a práctica privada, que quieran participar en el estudio.

Participación Voluntaria

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no,

continuarán todos los servicios que reciba en esta clínica y nada cambiará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes.

Procedimientos y Protocolo

Esta investigación incluirá una evaluación clínica completa, donde se observará los hallazgos que conlleven a diagnosticar las patologías enunciadas.

Usted será citado para:

1. Diagnóstico de la patología (y radiografía inicial)
2. Anestesia
3. Aislamiento absoluto
4. Apertura cameral
5. Localización de conductos
6. Toma de muestra (tejido necrótico)

Duración

La investigación se realizará durante 10 meses. Usted deberá asistir a 1 cita de examen inicial y las sesiones posteriores que su odontólogo tratante le programe. La duración de la toma de la muestra incluyendo los pasos previos es de 15 a 20 minutos.

Riesgos

Usted debe entender que la toma de las muestras no representa ningún riesgo. Personal profesional con experiencia realizará todos estos procedimientos utilizando medidas de seguridad estandarizadas; estas incluyen el uso de ropa protectora (blusas de clínica), guantes, tapabocas, gafas protectoras. Todos los instrumentos serán esterilizados para cada paciente (limas manuales #15 o 20)

Beneficios

El mayor beneficio que usted obtiene es el DIAGNOSTICO CONFIRMADO DE LA PATOLOGIA PERIAPICAL Y EL PLAN DE TRATAMIENTO ACORDE A SU ENTIDAD.

Incentivos

Usted no recibirá dinero por participar en el estudio. Los costos que se realicen durante el estudio serán cubiertos por los investigadores. Otros procedimientos dentales que usted requiera no serán cubiertos.

Confidencialidad

La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial (Ley de habeas data del 2012). La información acerca de usted que sea recogida durante la investigación, será puesta fuera de alcance y nadie sino los investigadores tendrán acceso a verla. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá la información encerrada en cabina con llave. No será compartida ni entregada a nadie con la excepción de que la ley requiera la información.

Compartiendo los Resultados

El conocimiento que obtengamos por realizar esta investigación se compartirá con usted antes de que se haga disponible al público. No se compartirá información confidencial. Se publicaran los resultados para que otras personas interesadas puedan aprender de nuestra investigación.

Derecho a negarse o retirarse

Usted no tiene por qué participar en esta investigación si no desea hacerlo y el negarse a participar no le afectara en ninguna forma a que sea tratado en esta clínica. Usted todavía tendrá todos los beneficios

que de otra forma tendría en esta clínica. Puede dejar de participar en la investigación en cualquier momento que desee sin perder sus derechos como paciente aquí. Su tratamiento en la clínica no será afectado en ninguna forma.

Alternativas a la Participación

Si usted no desea tomar parte en la investigación, se le proporcionará el tratamiento estándar en uso, disponible en la clínica odontológica de la Universidad o en la práctica privada

A Quién Contactar

Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea hacer preguntas más tarde, puede contactar a:

CONTACTO DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

Investigador principal del proyecto y co-investigadores: 3103609869 – 3014373649 - 3014271690

PARTE II: Formulario de firmas

He sido invitado a participar en la investigación “DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SUBESPECIES DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EN DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL SINTOMATICA Y PERIODONTITIS APICAL ASINTOMATICA”. He sido informado que los riesgos son mínimos y que pueden incluir los riesgos propios del tratamiento odontológico. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado usando el nombre y la dirección que se me ha dado de esa persona.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me han contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento

y Fecha

Nombre del Testigo (I)

Firma del Testigo (I) y

Fecha

Nombre del Testigo (II)

Firma del Testigo (II) y

Fecha

