

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
MICROORGANISMOS QUE FORMAN EL BIOFILM
INTRACONDUCTO MEDIANTE
ESPECTOMETRIA DE
MASAS.”**

Por

C.D. DAVID ADRIAN RODRÍGUEZ NAVA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

ABRIL 2025

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
MICROORGANISMOS QUE FORMAN EL BIOFILM
INTRACONDUCTO MEDIANTE
ESPECTOMETRIA DE
MASAS.”**

David Adrián Rodríguez Nava

Comité de Tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
MICROORGANISMOS QUE FORMAN EL BIOFILM
INTRACONDUCTO MEDIANTE
ESPECTOMETRIA DE
MASAS.”**

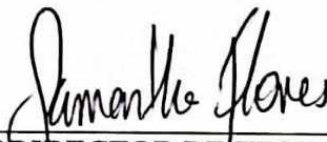


**FIRMA
TESISTA**

**David Adrián Rodríguez Nava
Comité de Tesis**



**FIRMA
DIRECTOR DE TESIS
Dr. Claudio Cabral Romero**



**CODIRECTOR DE TESIS
Dra. Samantha Maribel Flores Treviño**



**ASESOR METODOLÓGICO
Dr. Gustavo Israel Martínez González**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar, primeramente, mi más grande agradecimiento a mis padres, Uriel Rodríguez y Angélica Nava, quienes han sido el pilar principal de todo este gran camino recorrido. Gracias por apoyarme, darme la confianza y siempre estar presentes en cada paso que he dado.

Agradezco también al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño coordinador del posgrado de endodoncia por permitirme realizar la maestría en el Posgrado de Endodoncia de la UANL, y por todo su conocimiento compartido a lo largo de estos 2 años.

Dr. Claudio Cabral Romero, quien fue mi director de tesis, gracias por enseñarme el gusto por la investigación y a cuestionar el porqué de las cosas, además de siempre compartir su conocimiento y apoyarme en las dudas que surgían durante este proceso. También agradezco a la Dra. Samantha Flores Treviño por abrirme las puertas del Laboratorio de Infectología del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la UANL y apoyarme en todo momento durante la realización de este proyecto.

Dr. Miguel Álvarez, Dr. Alejandro Torres, Dra. Mayra Martínez, Dr. Rene Hernández, por nunca dudar en extenderme su mano cuando lo necesitaba y compartir su conocimiento y habilidades para cada día ser mejor en lo que hago.

Compañeros de laboratorios que se volvieron mis amigos, Eder, Rodrigo, Aldo y Samantha, quienes siempre me ayudaron para resolver mis dudas, me apoyaban en algún ensayo que no supiera realizar y hacerme sentir parte de ellos en todo momento.

Por último, a mis amigos de generación que hicieron que estos dos años se fueran volando, y volvieron de el posgrado un lugar no solo de estudio y trabajo, sino de risas y momentos felices.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	4
NOMENCLATURA	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. HIPÓTESIS	12
3.OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos particulares.....	13
4. ANTECEDENTES	14
4.1 Endodoncia.....	14
4.1.2 Infección endodóntica.....	14
4.1.2.1 Infección endodóntica primaria.....	14
4.1.2.2. Infección endodóntica secundaria.....	14
4.1.2 Periodontitis apical.....	15
4.2 Tratamiento endodóntico	15
4.2.1 Preparación mecánica.....	15
4.2.2 Tratamiento químico.....	16
4.3 Etiología de la infección endodóntica.....	16
4.4 Fracaso endodóntico.....	17
4.4.1 biofilm.....	18
4.4.1.1 Formas de evaluar el biofilm.....	19
4.4.1.1.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	19
4.5.1. MALDI biotyper.....	20
4.4.1.1.2 Sistemas basados en placas de microtitulación.....	20
4.4.1.1.3 Desplazamiento de flujo en modelo de biofilm.....	21
4.4.1.1.4 Dispositivo de Robbins modificado.....	21
4.4.1.1.5 Microscopía confocal laser.....	21
4.4.1.1.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	22
4.4.2 Biofilm endodóntico.....	22
4.4.3 Bacterias intraconducto.....	23
4.4.4 Enterococcus faecalis.....	23
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
5.1 Obtención de microorganismos aislados de paciente.....	25
5.1.1 Toma de muestras de pacientes con infección primaria.....	25
5.1.2 Toma de muestra de pacientes con infección secundaria/persistente.....	25
5.2 Aislamiento de muestras de paciente.....	26
5.3 Aislamiento de Microorganismos por MALDI BioTyper system.....	26
5.4 Perfil de susceptibilidad a los antibióticos.....	27
5.5.1 Preparación de antibióticos.....	27
5.5.2 Susceptibilidad en células planctónicas.....	27

6. RESULTADOS	29
6.1 Aislamiento de Microorganismos por MALDI BioTyper system	29
6.3 Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas.....	35
7. DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	39
9. LITERATURA CITADA	40
RESUMEN BIOGRÁFICO	44

NOMENCLATURA

PAA	Periodontitis apical asintomática
PAS	Periodontitis apical sintomática
AAA	Absceso apical agudo
AAC	Absceso apical crónico
PS	Periodonto sano
NP	Necrosis pulpar
PTX	Pieza previamente tratada

TESISTA: David Adrián Rodríguez Nava
DIRECTOR DE TESIS: Dr. Claudio Cabral Romero
CODIRECTOR DE TESIS: Dra. Samantha Maribel Flores Treviño
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
MICROORGANISMOS QUE FORMAN EL BIOFILM INTRACONDUCTO
MEDIANTE ESPECTOMETRÍA DE MASAS”**

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El biofilm intraconducto es el causante de la infección endodóntica, con el uso de la espectrometría de masas se busca, obtener un resultado de los microorganismos que forman este biofilm, e intentar descifrar el mecanismo de acción de estas bacterias sobre la pulpa dental. **OBJETIVO:** El objetivo de este estudio es realizar el aislamiento, identificación y caracterización de los microorganismos que forman el biofilm intraconducto mediante espectrometría de masas. **METODOLOGÍA:** Se obtuvieron 50 muestras de pacientes, con puntas de papel estéril de piezas dentales con infección endodóntica y fueron incubadas en medio BHI, el aislamiento se realizó en placas de agar sangre, la identificación por espectrometría de masas se llevó a cabo por medio de MALDI-TOF, el perfil de susceptibilidad se realizó mediante dilución seriada de la concentración de antibiótico y se determinó mediante los valores del CLSI, y la capacidad de formación de biopelícula se midió mediante densidad óptica. **RESULTADOS:** Dentro de los resultados obtenidos fue se identificó a *E. faecalis* con un total de 13 muestras (26%), seguido de *S. mitis oralis* con un total de 5 muestras (10%), también se lograron identificar bacterias como *E. faecium* (3), *P. mirabilis* (4), *C. albicans* (2) *K. pneumoniae* (2), entre otras. No se observó resistencia por parte de las cepas frente a ninguno de los dos antibióticos probados, con MIC menores a 2 en el caso de la amoxicilina y menores a .5 en el caso de vancomicina, por lo que todas las cepas fueron susceptibles a ambos antibióticos de manera planctónica. **CONCLUSIONES:** Se aislaron, identificaron y caracterizaron los microorganismos presentes en pacientes mexicanos con infección endodóntica. *E. faecalis* y *S. mitis* constituyen las bacterias más prevalentes y no presentaron resistencia a antibióticos como amoxicilina ni vancomicina.

TESISTA: David Adrián Rodríguez Nava
DIRECTOR DE TESIS: Dr. Claudio Cabral Romero
CODIRECTOR DE TESIS: Dra. Samantha Maribel Flores Treviño
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
MICROORGANISMOS QUE FORMAN EL BIOFILM INTRACONDUCTO
MEDIANTE ESPECTOMETRIA DE MASAS”**

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN: An intracanal root biofilm is the leading cause of endodontic infection and may using MALDI BioTyper System is possible to identify with high quality the different strains of microorganisms present in the root canal biofilm and let their study. **OBJETIVO:** The objective of this work was to isolate, identify and characterize the microorganisms contained into the intracanal biofilm of patients with endodontic infection by mass spectrometry. **METODOLOGÍA:** 50 samples of patients were obtained employing sterile paper from tooth pieces with endodontic infection and were incubated in BHI culture media and the isolation was made in blood agar plates and the identification was made by using MALDI TOF. Also, antibiotic susceptibility was evaluated taken into account the CLSI values. **RESULTADOS:** Among the results obtained was identified to *E. faecalis* with a total of 13 samples (26%), follow of *S. mitis oralis* with 5 samples (10%), also were detected bacteria like *E. faecium* (3), *P. mirabilis* (4), *C. albicans* (2) *K. pneumoniae* (2), and others. No antimicrobial resistance was diagnosed among the clinical isolates again anyone of the antibiotics tested (amoxicillin and vancomycin) due to all samples being sensible and their planktonic growth was inhibited. **CONCLUSIONS:** Were isolated, detected and characterize microorganisms present into the root canal biofilm of Mexican endodontic patient being *E. faecalis* and *S. mitis* the bacteria most prevalent and no antimicrobial resistance to amoxicillin and vancomycin was detected.

1.- INTRODUCCIÓN

El biofilm intraconducto es el causante de la infección endodóntica, y existen múltiples descripciones de este, sin embargo todas estas descripciones han sido realizadas por medio de pruebas moleculares como PCR, por lo que con el uso de la espectrometría de masas se busca, obtener un resultado mas confiable, en cuanto a los microorganismos que forman este biofilm, además de que se obtienen aislados de este para, poder estudiar e intentar descifrar el mecanismo de acción de estas bacterias sobre la pulpa dental.

El biofilm bacteriano intraconducto es un tema que se ha investigado por mucho tiempo, actualmente existen diferentes metodologías para identificar microorganismos, por ejemplo, PCR en tiempo real es una de las metodologías más utilizadas por autores como Siquiera Ricucci y Chavez de Paz. Pero debido a que las muestras son amplificadas y no son aislados este tipo de metodologías puede dar como resultado falsos-positivos, además de que no brindan la posibilidad de realizar a aislados específicos de los microorganismos encontrados por lo que limita la capacidad de realizar estudios posteriores.

Es de vital importancia identificar cuales especies bacterianas están presentes en el biofilm intraconducto para poder comprender la etiología de la infección endodóntica, esto es poder explicar u ofrecer una hipótesis de como este biofilm intraconducto puede conducir a la muerte de las células pulpares.

Utilizando un método nuevo de identificación bacteriana MALDI Biotyper ¿podremos obtener una descripción mas completa de las bacterias que forman el biofilm bacteriano intraconducto?

A pesar de los diferentes intentos por identificar los microorganismos presentes en el biofilm bacteriano intraconducto que causa la infección endodóntica, no existe una descripción de los microorganismos que forman este biofilm intraconducto en México. Con la ayuda de MALDI BioTyper que realiza una identificación rápida, de alta confianza, y una clasificación taxonómica de bacterias, levaduras y hongos, además de que es posible obtener un aislado específico de los microorganismos identificados. Por lo que en este estudio se busca obtener un panorama de los microorganismos que forman el biofilm intraconducto en México y conseguir los aislados de estos microorganismos para realizar una caracterización de estos. Y que esta caracterización pueda contribuir a ofrecer una hipótesis de como estos microorganismos pueden llevar a la muerte de las células pulpares debido a que, hasta ahora,

la conclusión a la que se ha llegado es que la presencia bacteriana depende o varía entre cada individuo, sin embargo, la respuesta de cómo se conduce a la muerte de las células pulpares continúa sin resolver. Por eso vale la pena realizar estudios con nuevas metodologías como MALDI BioTyper que utiliza espectrometría de masas, la cual ayuda a aislar las cepas bacterianas por lo tanto se pueden estudiar a diferencia de una prueba PCR en donde solo se realiza una amplificación y no un aislamiento.

El objetivo de este estudio es obtener el aislamiento, identificación y caracterización de los microorganismos que forman el biofilm intraconducto mediante espectrometría de masas.

Las muestras de pacientes fueron obtenidas con puntas de papel estéril, e incubadas en medio BHI, el aislamiento se realizó en placas de agar sangre, y la identificación por espectrometría de masas se llevó a cabo por medio de MALDI-TOF

2.- HIPÓTESIS

Con la ayuda de MALDI BioTyper System se pueden conseguir aislados exitosos de microorganismos que forman el Biofilm intraconducto en pacientes con infecciones endodónticas primarias y secundarias/persistentes, en pacientes mexicanos, y al tener a los microorganismos aislado, poder realizar pruebas de resistencia a sustancias antimicrobianas.

3.- OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar el aislamiento, identificación y caracterización de los microorganismos que forman el biofilm intraconducto mediante espectrometría de masas (MALDI biotyper sistem).

Objetivos específicos

- Obtener aislados de Biofilm intraconducto de pacientes con pulpa necrótica.
- Identificar los microorganismos presentes en el biofilm intraconducto a partir de aislados de pacientes utilizando espectrometría de masas.
- Evaluar la susceptibilidad a antibióticos los microorganismos previamente aislados e identificados.

4. ANTECEDENTES

4.1 *Endodoncia*

El objetivo de una endodoncia es realizar una correcta preparación del conducto radicular, buena irrigación y conseguir un sellado confiable. Si el tratamiento se realiza de manera correcta y se coloca una restauración de calidad, la función dental a largo plazo está garantizada. (Vadachkoria, et al.,2019), con estos procesos se busca, eliminar bacterias, biopelículas microbianas y subproductos del sistema de conductos radiculares y prevenir una contaminación posterior. (Tonini, et al., 2022) El éxito del tratamiento endodóntico depende de la erradicación de los microbios del sistema de conductos radiculares y de la prevención de la reinfección. (Haapasalo M et al., 2010).

4.1.2 *Infección endodóntica*

Las infecciones endodónticas ocurren cuando las bacterias invaden la pulpa y se propagan a los tejidos circundantes; esto debido a caries dentales, traumatismos o procedimientos dentales. (Erazo y Whetstone, 2023)

4.1.2.1 *Infección endodóntica primaria*

La infección primaria implica una inflamación de la pulpa y la infección del conducto radicular después de la invasión de microbios o subproductos microbianos, lo que eventualmente resulta en inflamación de los tejidos de soporte, es decir, una periodontitis apical. Este tipo de infecciones se dice que son polimicrobianas. Y las especies que más predominan son: las especies *Bacteroides*, *Prophyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* y *Camphylobacter*. (Neelakantan, et al., 2017)

4.1.2.2. *Infección endodóntica secundaria*

La infección secundaria (o infección post tratamiento) ocurre como reinfección que puede ser adquirida o emergente, esto debido a persistencia de bacterias o una infección recurrente en dientes que han sido previamente tratados de conducto, pero sin un sellado correcto (apical o coronal). (Neelakantan, et al., 2017)

La flora microbiana que se encuentra en las infecciones secundarias, por lo general, son microorganismos con mayor resistencia y pueden sobrevivir en condiciones adversas, como

un amplio rango de pH y condiciones nutrimentales limitadas. Los estudios han demostrado la prevalencia de ciertas especies en dientes con infección posterior al tratamiento, como Enterococos, Estreptococos, Lactobacilos, Actinomyces y hongos (como Candida). En particular, se observó una alta proporción de Enterococcus fecalis en casos con periodontitis apical persistente. (Neelakantan, et al., 2017)

4.1.2 Periodontitis apical

La periodontitis apical es una lesión inflamatoria de los tejidos perirradiculares que aparece debido a la salida de irritantes, como bacterias y toxinas, de una pulpa necrótica. (Cope, et al., 2018)

Una vez que se establece la necrosis pulpar, las toxinas de las bacterias, sus agentes inmunológicos y los productos de la degeneración pulpar y la necrosis tisular, llegan los tejidos perirradiculares a través de varias vías, principalmente el foramen apical, lo que provoca reacciones inflamatorias e inmunológicas lo cual dará resultado a una periodontitis apical. (Segura-Egea, et al., 2019)

4.2 Tratamiento endodóntico

Las tres fases más importantes del tratamiento de conductos son la instrumentación, la desinfección quimio-mecánica y la obturación. (Ali, et al., 2022)

Los objetivos principales al realizar un tratamiento de endodoncia son el poder brindar comodidad, función, estética y prevenir reinfecciones a largo plazo. Todos estos objetivos se logran mediante la limpieza (tratamiento químico), conformación completa (mecánica), la obturación de los conductos y la restauración de los dientes afectados. (Torabinejad y White, 2016)

4.2.1 Preparación mecánica

La preparación mecánica consta a grandes rasgos de 4 pasos: 1) acceso, 2) desbridamiento, 3) modelado y 4) preparación apical. Estos procedimientos pueden ser complicados, debido a que los sistemas de conductos tienen irregularidades morfológicas y son complejos. Al realizar estos 4 pasos de manera eficiente esto ayudara a eliminar la mayoría de los

contaminantes bacterianos del conducto, así como los restos necróticos y la dentina contaminada. (Anthony, 2001)

La instrumentación es considerada en gran medida un medio para dar acceso al paso de los irrigantes hacia el conducto radicular, para que estos posterior a la instrumentación realicen la mayor parte de la limpieza y desinfección (Boutsioukis y Arias-Moliz, 2022)

4.2.2 Tratamiento químico

La limpieza química (irrigación) es una parte esencial del desbridamiento del conducto radicular. Ya que brinda una desinfección más allá de lo que podría lograrse solo con la instrumentación. Esta fase ayuda eliminando microorganismos, desechos barrillo dentinario del sistema de conductos radiculares. (Saber y Hashem, 2011) Esta también se encarga de humectar los conductos para que los instrumentos trabajen de manera adecuada, funcionan como un solvente de tejido necrótico, de desechos, tejido pulpar y gérmenes de las paredes dentinarias irregulares cuando entran en contacto con la sustancia y ayuda en la limpieza de restos de tejido de los conductos auxiliares y laterales donde los instrumentos no pueden llegar. (Ali, et al., 2022)

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es actualmente el irrigante de elección, debido a que es un compuesto altamente oxidante, tiene propiedades para disolver restos de pulpa dental, además de actuar como agente antimicrobiano. Estas características impulsaron el uso de NaOCl en endodoncia. Normalmente se utiliza en concentraciones de 0,5% 5,25%. (Virdee, et al., 2022), (Gołabek, et al., 2019)

4.3 Etiología de la infección endodóntica

La infección endodóntica tiene una etiología microbiana y es una de las enfermedades más comunes que afectan a los humanos. Se han encontrado hongos, arqueas y virus asociados, pero las bacterias son, con mucho, los microorganismos más prevalentes y dominantes en la infección endodóntica. (Siquiera y Rôças, 2022)

Los diferentes tipos de infecciones endodónticas están compuestos por comunidades bacterianas multiespecies. Esto también es cierto para las infecciones persistentes/secundarias asociadas con los dientes tratados. (Chávez de Paz, et al., 2015).

La infección bacteriana del sistema de conductos radiculares solo ocurre cuando la pulpa está necrótica o una vez que la pulpa se haya extraído por un tratamiento previo. En casos específicos, como los abscesos agudos y crónicos, la infección bacteriana logra afectar los tejidos perirradiculares. (Siquiera y Rôças, 2022)

Las bacterias intraconducto se observan generalmente en forma de biopelícula que se encuentran adheridas a las paredes del conducto radicular. La infección en el conducto radicular principal puede extenderse a otras áreas como lo son conductos secundarios, accesorios o incluso a los túbulos dentinarios. Se han detectado más de 500 especies bacterianas en infecciones endodónticas, pero solo un grupo seleccionado de 20 a 30 especies se detecta con mayor frecuencia al cual se le denomina microbioma central. Las especies anaerobias obligadas son las más comúnmente encontradas intraconducto de los dientes con infección endodóntica primaria, mientras que tanto las anaerobias como las facultativas dominan las comunidades en la infección endodóntica secundaria/persistente. (Siquiera y Rôças, 2022)

Existe una gran variabilidad interindividual en la composición de las comunidades bacterianas endodónticas en dientes con la misma enfermedad clínica. Esto quiere decir que cada individuo tiene su microbiota endodóntica única en términos de diversidad de especies. Este hallazgo indica que la periodontitis apical tiene una etiología heterogénea. (Chávez de Paz, et al., 2015).

4.4 Fracaso endodóntico

El éxito o fracaso de una endodoncia se evalúa por los signos y síntomas clínicos, así como por los hallazgos radiológicos post tratamiento de los dientes tratados. Los síntomas y signos clínicos que pueden definir el éxito son: Ausencia de dolor, ausencia de inflamación y fístulas, si estas estaban presentes antes del tratamiento, así como el mantenimiento del diente funcional y firme en su alvéolo. (Prada, et al., 2010)

Según reportes mencionan que la persistencia de microorganismos dentro del sistema de conductos radiculares después del tratamiento es la causa principal del fracaso del tratamiento. (Neelakantan, et al., 2017). Esta persistencia puede ser debido a una preparación quimicomecánica deficiente y/o un relleno inadecuado del sistema de conductos. (Prada, et al., 2010).

Las bacterias que logran sobrevivir después de un tratamiento de endodoncia suelen tener características específicas que les permiten evitar la instrumentación mecánica y química que se lleva a cabo durante el tratamiento endodóntico. Dentro de las características se encuentran: la capacidad de crear biopelículas fuertemente adheridas colonizar áreas distantes de los conductos principales (deltas apicales, istmos, conductos laterales) que son casi imposibles de alcanzar con la instrumentación, quedando protegidas por restos de tejido, dentina, suero y restos de tejido muerto. Capacidad de inactivar o disminuir la eficacia de los agentes antimicrobianos. (Prada, et al., 2010).

4.4.1 biofilm

Los microorganismos pueden vivir en forma libre o en un grupo de especies diferentes o iguales, llamado biopelícula. (Rather, et al., 2021)

Las biopelículas han sido descritas de muchas maneras, pero la primera vez que se describió fue en el siglo XVII por Van Leeuwenhoek quien examinó los “animálculos” en la placa de sus propios dientes, pero la teoría general del predominio de biopelículas no se promulgó hasta 1978. (Donlan y Costerton, 2002)

Las biopelículas se definen como "agregados de microorganismos en los que las células se pegan con frecuencia en una matriz de producción propia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que se adhieren entre sí y/o a una superficie". (Flemming, et al., 2016) vivas o no vivas y muestran variaciones en términos de tasa de crecimiento y expresión génica cuando se comparan con su forma planctónica. (Rather, et al., 2021)

Las células bacterianas dentro de las biopelículas son más resistentes a la presencia de cualquier condición de estrés o al sistema inmunitario del huésped. (Ruhel y Kataria, 2021)

La biopelícula se desarrolla preferentemente en superficies inertes o en tejido muerto, y pueden ocurrir en dispositivos médicos, fragmentos de tejido muerto sobre tejidos vivos, por ejemplo, en los casos de endocarditis. La biopelícula crece lentamente, en uno o más lugares, y las infecciones por biopelículas a menudo tardan en producir síntomas evidentes. Las células bacterianas sésiles liberan antígenos y estimulan la producción de anticuerpos, pero los anticuerpos no son efectivos para matar las bacterias dentro de las biopelículas. (Costerton, et al., 1999).

Los antibióticos pueden revertir los síntomas que causan las células planctónicas que son liberadas de la biopelícula, pero no son capaces de eliminar la biopelícula. Es por esto que, las infecciones por biopelículas suelen mostrar síntomas recurrentes, después de ciclos de terapia con antibióticos, por lo que hasta que la biopelícula es eliminada de forma mecánica del cuerpo esta infección seguirá persistiendo. (Costerton, et al., 1999).

Un mecanismo de resistencia de la biopelícula a los agentes antimicrobianos es la incapacidad de un agente para penetrar en toda la profundidad de la biopelícula. (Costerton, et al., 1999).

4.4.1.1 Formas de evaluar el biofilm

En la actualidad, los biofilms se estudian de dos formas: la primera es evaluando a los microorganismos de forma individual, mientras que la segunda forma es, estudiando los efectos y relaciones entre una especie y otra. Gracias a los avances en tecnología y biología computacional, es posible estudiar la expresión de genes y proteínas en dichas comunidades, revelando así el papel que cada especie tiene en esa comunidad específica. (Neelakantan, et al., 2017)

Los más recientes estudios se han centrado en las biopelículas bacterianas de múltiples especies para dar un enfoque más realista de lo que sucede en la situación real in vivo en el sistema de conductos radiculares. En las infecciones endodónticas se puede observar una gran diversidad microbiana, y las propiedades complejas de estas biopelículas no se pueden observar en estudios donde se analice una sola especie. (Neelakantan, et al., 2017)

La apreciación de las bacterias que viven en biopelículas de múltiples especies en lugar de comunidades de una sola especie, o en un estado planctónico, ha hecho que las metodologías para estudiar bacterias en laboratorio cambien. (Neelakantan, et al., 2017)

4.4.1.1.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF

En la actualidad las tecnologías de espectrometría de masas (MALDI-TOF) son más rápidas, más asequibles y, a menudo, con mayor precisión de lo que era factible en la antigüedad. De acuerdo con la secuencia de proteínas revelada por cada especie microbiana, se utiliza un láser UV para la desorción y ionización la biomasa bacteriana y fúngica encerrada en la matriz, frecuentemente ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (C₁₀H₇NO₃). Con MALDI-TOF

MS, las partículas se ionizan, se separan según su relación masa-carga (m/z) y se miden por su tiempo de llegada a los detectores. Con base en los valores de masa a carga a lo largo del eje x y la intensidad a lo largo del eje y, los espectros generados se comparan con los espectros de microorganismos conocidos. En comparación con enfoques más antiguos, esta tecnología puede identificar de manera confiable micobacterias, levaduras y mohos, junto con varios tipos de bacterias, generalmente por género y especie. (Elbehiry, et al., 2022)

4.5.1. MALDI biotyper

Los sistemas MALDI Biotyper proporcionan identificación de alta velocidad, alta confianza y clasificación taxonómica de bacterias, levaduras y hongos. La clasificación y la identificación se basan en huellas digitales proteómicas utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF de alto rendimiento (agsanalitica.com).

La introducción de MALDI-TOF ha revolucionado la microbiología clínica. Esto se afirmó en 2009 cuando se realizó primer informe sobre la introducción del MALDI Biotyper en laboratorios de microbiología clínica. (Kostrzewa, et al., 2018)

La identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF demuestra ser un método eficaz y rentable para una identificación rápida y rutinaria de aislados bacterianos en laboratorios de microbiología clínica. (Seng, et al., 2009)

La medición en un espectrómetro de masas MALDI-TOF moderno se realiza en unos pocos segundos cuando se trata de una sola muestra y en menos de media hora para un aproximado de 96 muestras. Los costos para una medición MALDI-TOF son muy bajos a comparación de pruebas bioquímicas o incluso moleculares. (Kostrzewa, et al., 2018)

4.4.1.1.2 Sistemas basados en placas de microtitulación

El sistema basado en placas de microtitulación es utilizado para realizar varias pruebas al mismo tiempo, lo que puede ser ideal para la detección rápida de métodos para la desinfección y eliminación de biofilm. La cuantificación de biopelículas con placas de microtitulación se puede clasificar en ensayos de biomasa, ensayos de viabilidad y ensayos de cuantificación de matriz. (Neelakantan, et al., 2017)

El cultivo de biopelículas en placas de microtitulación (MTP) es un sistema ampliamente utilizado este tiene ventajas importantes como el hecho de que es un método fácil de usar, y

puede ser utilizado en la mayoría de los laboratorios de microbiología. Es un método económico debido a que solo se requieren pequeños volúmenes de medios de crecimiento y/o sustancias de prueba. También es bueno para medir el efecto de diferentes sustancias y determinar la eficacia de estos en el biofilm y por último este método es muy flexible, ya que se pueden modificar fácilmente los parámetros como el medio de cultivo y la temperatura de crecimiento. (Vandecandelaere, et al., 2016)

4.4.1.1.3 Desplazamiento de flujo en modelo de biofilm

En este sistema, el medio contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento y además se van agregando más nutrientes de manera constante, al mismo tiempo los productos de desecho y las toxinas del biofilm se eliminan van eliminando. El concepto de desplazamiento de flujo se basa en la premisa de que se debe formar una película inicial de componentes macromoleculares sobre una superficie para permitir la adhesión microbiana. El flujo de fluido asegura de manera óptima la adhesión de las células microbianas a un sustrato, lo cual es una propiedad característica de cualquier biofilm. (Neelakantan, et al.,2017)

4.4.1.1.4 Dispositivo de Robbins modificado

El dispositivo de Robbins modificado (MRD) es un sistema modelo de biofilm in vitro que permite la formación de varios biofilms microbianos en diversos sustratos en condiciones de flujo controlado. (Coenye, et al., 2008)

Este dispositivo puede utilizar discos de silicona o hidroxiapatita como sustrato para el crecimiento del biofilm, y puede o no agregarse agentes que modifiquen el crecimiento microbiano (favorezcan o inhiban). La mayor ventaja es que se pueden evaluar uno o más agentes en cuanto a su capacidad antibiofilm en el mismo experimento. (Neelakantan, et al.,2017)

4.4.1.1.5 Microscopía confocal laser

La microscopía confocal laser es una herramienta valiosa para el estudio de biopelículas y, en particular, de la matriz de biopelículas, ya que permite la visualización en tiempo real de especímenes vivos completamente hidratados. (Schlafer y Meyer, 2017)

Este es un muy buen método para estudiar la estructura del biofilm, ya que no es necesaria la destrucción de estos ecosistemas para su estudio. El uso de marcadores fluorescentes permite apuntar a células particulares o incluso a ciertos componentes de la matriz extracelular. (Neelakantan, et al.,2017)

El uso de tinciones específicas (Live and dead) nos permiten diferenciar bacterias vivas de bacterias muertas dependiendo el tipo de señal que emitan (verde o roja) Esta técnica nos permite tener una idea más clara sobre la efectividad de las soluciones y técnicas de irrigación contra el biofilm al realizar una reconstrucción tridimensional de la biomasa para estudiar la arquitectura del biofilm. (Neelakantan, et al.,2017)

Este tipo de microscopios se encuentran en muchos laboratorios de investigación por lo que, los métodos basados en este han evolucionado considerablemente en la última década para recuperar información sobre la composición y las propiedades de la matriz del biofilm. (Schlafer y Meyer, 2017).

4.4.1.1.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es una técnica que ayuda a investigar la colonización bacteriana de superficies que sean bióticas o abióticas además es útil para revelar detalles ultraestructurales en las relaciones bacteria-bacteria y bacteria-superficie. Las imágenes por SEM brindan una resolución más alta que un microscopio óptico y si se utiliza el aumento necesario nos brinda una visión más detallada de la muestra microbiana. (Vuotto y Donelli, 2014)

El SEM nos proporciona imágenes de gran aumento de las bacterias individuales y de células de levadura, así como su ubicación e interacción dentro de la matriz extracelular amorfa del biofilm, lo cual es importante para comprender la morfología y la fisiología de este. (Hrubanova, et al., 2018).

4.4.2 Biofilm endodóntico

Las biopelículas microbianas de los conductos radiculares son altamente resistentes a los agentes desinfectantes utilizados en el tratamiento de endodoncia. La compleja e impredecible anatomía de estos y las biopelículas formadas por múltiples especies aumentan la dificultad para erradicar las biomasas microbianas. (Neelakantan, et al.,2017)

Según un estudio del Dr. Ricucci y el Dr. Siquiera encontraron que morfológicamente, los biofilms bacterianos intrarradiculares son gruesos y están compuestos por varias capas de células bacterianas. También observaron que comúnmente había diferentes morfotipos por biofilm y las proporciones relativas entre las células/poblaciones bacterianas y la matriz extracelular fueron muy variables. Por lo tanto, la morfología del biofilm endodóntico difirió consistentemente de un individuo a otro (variabilidad interindividual) e incluso cuando se examinaron diferentes áreas del mismo conducto (variabilidad intraindividual). (Chávez de Paz, et al., 2015).

A pesar del gran número de taxones bacterianos identificados hasta el momento en muestras de conductos radiculares infectados, existen de 20 a 30 especies bacterianas las cuales se encuentran invariablemente entre las más prevalentes en diferentes estudios y a estas bacterias se les consideran los principales patógenos causantes de las infecciones endodónticas. (Chávez de Paz, et al., 2015).

4.4.3 Bacterias intraconducto

La terapia endodóntica se realiza más comúnmente por un problema de infección. Esto significa que el enfoque principal del tratamiento es eliminar la infección del conducto radicular para mantener la pieza afectada a largo plazo y que esta no provoque enfermedades inflamatorias o algún efecto adverso en la salud sistémica. (Bergenholtz, 2016).

La microflora bacteriana del conducto radicular inicialmente se encuentran bacterias del tipo aerobias y anaerobias facultativas. A medida que la enfermedad progresa, la ecología dentro del sistema de conductos radiculares comienza a cambiar. (Neelakantan, et al., 2017)

Las bacterias son, los microorganismos más comunes que se encuentran en las infecciones endodónticas y luego están implicadas en la etiología de la periodontitis apical. las bacterias endodónticas se pueden dividir en 18 diferentes especies, las más comunes pertenecen a los tipos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes y Synergistetes. (Chávez de Paz, et al., 2015).

4.4.4 Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) es un coco anaerobio grampositivo que se encuentra en la cavidad oral el cual demuestra una buena adaptación a entornos con niveles ricos en

nutrientes, bajos de oxígeno y con ecología compleja. (Alghamdi, et al., 2020). Es considerado un importante patógeno bacteriano implicado en infecciones endodónticas y contribuye considerablemente a la periodontitis periapical. (Wang, et al., 2015).

E. faecalis es uno de los microorganismos más resistentes a los irrigantes antimicrobianos y a los medicamentos intraconducto, también puede soportar situaciones de privación nutricional, este microorganismo se ha asociado con mayor frecuencia a pulpas necróticas e infecciones periapicales persistentes en dientes tratados con endodoncia. (Bolhari, et al., 2018)

Se piensa que la resistencia de este microorganismo se relaciona con algunos de sus factores de virulencia. Los factores de virulencia más importantes de *E. faecalis* están regulados por el quorum-sensing y representan una amenaza médica y ambiental significativa. Las proteínas reguladoras de detección de quorum-sensing como gelatinasa, serina proteasa, enterocina O16 y citolisina son contribuyentes clave en la patogenia de *E. faecalis* en varios modelos de infección. (Ali, et al., 2017), (Bolhari, et al., 2018)

Dentro de los factores de virulencia de *E. faecalis* de mayor relevancia se encuentra el factor de proteína de superficie enterocócica (esp) el cual desempeña un papel importante en la adherencia de *E. faecalis* a los tejidos del huésped, ya que contribuye a la colonización y persistencia de la infección. Se sugiere que esp promueve la formación de biopelículas; sin embargo, es posible que existan algunos factores adicionales que contribuyan a la formación de biopelículas en *E. faecalis*. (Bolhari, et al., 2018).

La citolisina que es una exotoxina bacteriana expresada y secretada por *E. faecalis* representa otro factor de virulencia importante de esta bacteria, (Lang, et al., 2020). La citolisina es una toxina lítica de dos péptidos, es única entre las toxinas hemolíticas bacterianas y las bacteriocinas por haber incorporado ambas actividades en un solo sistema. No se conoce ningún otro sistema peptídico bacteriano que incorpore tanta actividad lítica contra una multitud de tipos de células de una amplia gama de organismos, es letal tanto para células procariotas como para eucariotas debido a su capacidad de señalar y activar su propia expresión. (Coburn y Gilmore, 2003)

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Obtención de microorganismos aislados de paciente

A todos los pacientes que participaron en este estudio se les entregó un consentimiento informado y se les notificó acerca de la toma de muestra antes de realizar todo el protocolo. Se tomaron muestras de pacientes adultos que presentaron infección endodóntica primaria o secundaria/persistente. Se realizó la recolección de 50 muestras de dientes humanos que cumplieron con los siguientes requisitos: piezas unirradiculares o multirradiculares, íntegras, con diagnóstico de necrosis pulpar o pieza previamente tratada y ápice cerrado. Todas las muestras fueron analizadas radiográficamente, y se excluyeron aquellas que presentaron conductos calcificados, fracturas, ápices abiertos, diagnóstico pulpar diferente a necrosis pulpar o pieza previamente tratada, pacientes bajo tratamiento médico sistémico, o piezas con poste.

5.1.1 Toma de muestras de pacientes con infección primaria

Los dientes fueron aislados con diques de hule, y se desinfectó la zona de trabajo con peróxido de hidrógeno al 30% y, posteriormente, se colocó Isodine al 5%. Se eliminó el tejido carioso o restauración defectuosa con una fresa de carburo de bola #2, de tallo largo. Una vez que se expuso la cavidad pulpar, el diente y el dique de hule se desinfectaron nuevamente con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5.25%. Luego, se inactivó el NaOCl frotando la cavidad con una solución de tiosulfato de sodio al 5%. A continuación, se colocó solución salina en el conducto y se realizó un limado con una lima #15 tipo K para desprender tejido dentinario, realizando movimientos de cepillado en todo el conducto. Posteriormente, se introdujeron 2 puntas de papel estériles para recolectar el tejido desprendido con el limado. Una vez que se tomó la muestra, las puntas de papel estériles se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 ml de infusión cerebro-corazón (BHI) y se incubaron durante 24 a 72 horas a 37°C.

5.1.2 Toma de muestra de pacientes con infección secundaria/persistente

Los dientes fueron aislados con diques de hule, y se desinfectó la zona de trabajo con peróxido de hidrógeno al 30% y, posteriormente, se colocó Isodine al 5%. Se eliminó el tejido carioso o restauración defectuosa con una fresa de carburo de bola #2, de tallo largo. Se utilizaron limas manuales tipo Headstrom, sin solventes, para retirar la gutapercha contaminada. (Cuando fue posible, se colocó la gutapercha contaminada en el tubo

Eppendorf junto con las puntas de papel). Una vez que se removió la gutapercha, el diente y el dique de hule se desinfectaron nuevamente con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5.25%. Luego, se inactivó el NaOCl frotando la cavidad con una solución de tiosulfato de sodio al 5%. A continuación, se colocó solución salina en el conducto y se realizó un limado con una lima #15 tipo K para desprender tejido dentinario, realizando movimientos de cepillado en todo el conducto. Posteriormente, se introdujeron 2 puntas de papel estériles para recolectar el tejido desprendido con el limado. Una vez que se tomó la muestra, las puntas de papel estériles se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 ml de infusión cerebro-corazón (BHI) y se incubaron durante 24 a 72 horas a 37°C.

5.2 Aislamiento de muestras de paciente

Pasadas las 24 a 72 horas de la toma de muestra, se debió confirmar el crecimiento bacteriano mediante la presencia de turbidez en el medio. Si en el medio no se observó turbidez, la muestra fue desechada. En caso de presentar crecimiento, se procedió a realizar el aislado de la muestra, tomando una asada con un asa bacteriológica de la parte más profunda del tubo Eppendorf y fue sembrada en una placa de Agar sangre. Esta siembra se mantuvo en incubación por 24 horas a 37°C en una incubadora de dióxido de carbono.

5.3 Aislamiento de Microorganismos por MALDI BioTyper system

Los sistemas MALDI Biotyper proporcionaron identificación de alta velocidad, alta confianza y clasificación taxonómica de bacterias, levaduras y hongos. La clasificación y la identificación se basaron en huellas digitales proteómicas utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF de alto rendimiento.

Los aislados fueron identificados por desorción/ionización de láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF) espectrometría de masas (Sistema Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremer, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se depositó una colonia de cultivos cultivados en placas de agar sangre e incubados a 37°C durante 24 horas en pocillos de una placa de destino de acero inoxidable de 86 puntos (Bruker Daltonics, Bremer, Alemania). Posteriormente, se adicionó 1 µL de ácido fórmico al 70% y, después del secado, se agregó 1 µL de solución de matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A continuación, la placa se introdujo en el equipo, donde se analizó con el software MALDI

Biotyper 3.0 para comparar la base de datos de perfiles de espectros. Finalmente, los aislamientos se clasificaron de acuerdo con los criterios de identificación de puntuación recomendados por el fabricante, en los que una puntuación entre 2.000 y 2.299 permitió una identificación a nivel de género aceptable y una puntuación de 2.300 a 3.000 permitió la identificación a nivel de especie aceptable.

5.4 Perfil de susceptibilidad a los antibióticos

5.5.1 Preparación de antibióticos

Se incluyeron dos antibióticos de uso común en infecciones endodónticas con relevancia clínica: vancomicina (VAN) y amoxicilina (AMX), adquiridos de Sigma-Aldrich, BA, Estados Unidos. Se prepararon soluciones stock de cada antibiótico a concentraciones de 128 µg/mL y 512 µg/mL, respectivamente, a partir del antibiótico en forma de polvo. Se consideró la potencia especificada por el fabricante para cada antibiótico y se utilizó el disolvente recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en el documento M100 para su preparación (CLSI, 2022). Las soluciones stock fueron esterilizadas mediante filtros desechables estériles de 0.22 µm (Corning Inc, NY, Estados Unidos) y se almacenaron a -80 °C en ultracongelación.

Se emplearon las cepas control de *E. coli* ATCC 25922 y *E. faecalis* ATCC 29212 para verificar la calidad de las soluciones stock preparadas.

5.5.2 Susceptibilidad en células planctónicas

Se utilizó el método de microdilución descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en los documentos M07-A10 y M100 para evaluar los antibióticos en estudio (CLSI, 2022). A partir de cultivos puros de *E. faecalis* incubados por 24 horas en agar sangre (Becton Dickinson Diagnostic, NJ, Estados Unidos), se prepararon inóculos de cada aislamiento suspendiendo 3-5 colonias en tubos con solución salina estéril al 0.85%, ajustando la turbidez a 0.5 en la escala de McFarland. Este inóculo se diluyó 1:150 en caldo Müller-Hinton para los antibióticos vancomicina (VAN) y amoxicilina (AMX).

Luego, se transfirieron 100 µL de esta dilución a cada pocillo de un panel de antibióticos que contenía 100 µL de diluciones seriadas de los antibióticos a probar. Cada placa incluyó un pocillo sin inocular como control negativo y un pocillo para cada aislamiento con la bacteria sin antibiótico como control positivo. Las placas se incubaron a 35 °C durante 20

horas para AMX y 24 horas para VAN, asegurándose de no apilar más de 4 cajas para evitar diferencias en la temperatura durante la incubación.

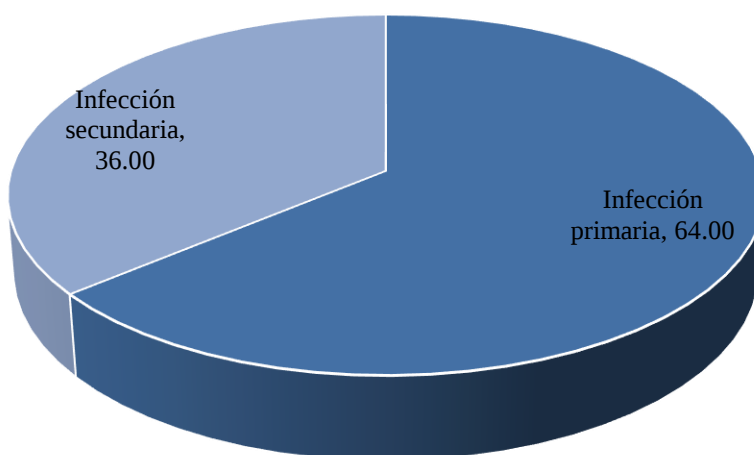
Después de la incubación, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración de antibiótico en la cual no se observó crecimiento bacteriano a simple vista.

6. RESULTADOS

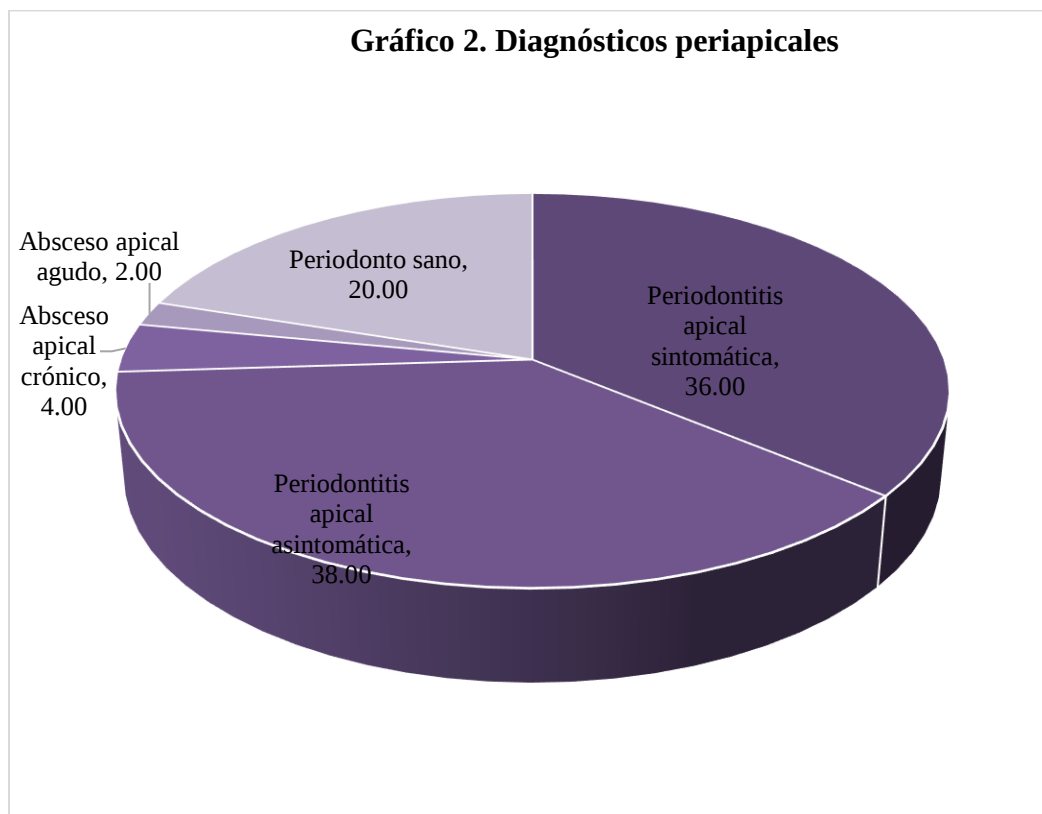
6.1 Aislamiento y caracterización de Microorganismos por MALDI BioTyper system

Dentro de los resultados obtenidos en este estudio, se analizaron 50 muestras de pacientes con infección endodóntica siendo 32 (64%) muestras de infección endodóntica primaria y 18 (36%) muestras de infecciones secundaria/persistente (Gráfico 1), también se tomó en cuenta los diferentes diagnósticos periapicales siendo 18 (36%) pacientes con diagnóstico periodontal de periodontitis apical asintomática, 19 (38%) pacientes con periodontitis apical sintomática, 2 (4%) pacientes con absceso apical crónico, 1 (2%) paciente con absceso apical agudo y 10 (20%) pacientes con periodonto sano.

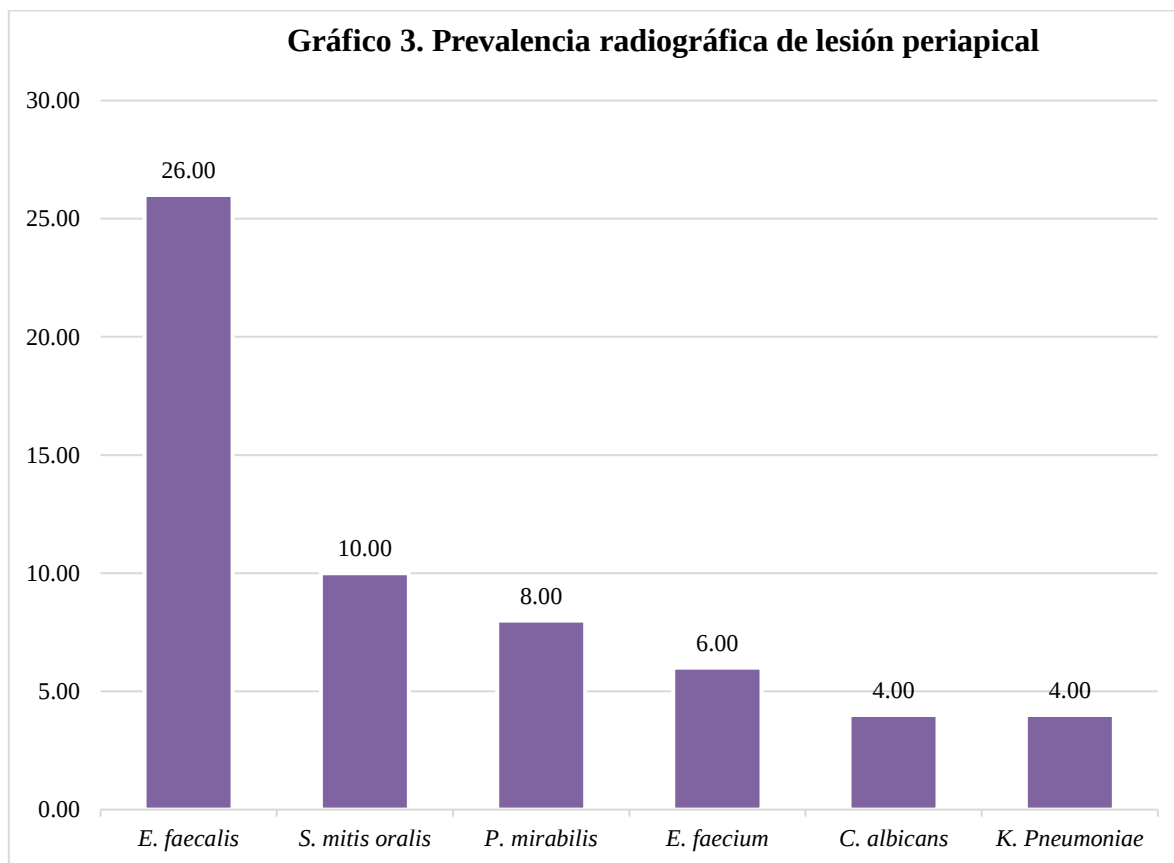
Gráfico 1. Tipo de infección endodóntica



Se tomo en cuenta también la presencia radiográfica de lesión periapical de los cuales 34 (68%) pacientes presentaban lesión periapical y 16 (32%) no presentaban presencia de lesión periapical radiográficamente (Grafico 2).



La bacteria que mayormente se identificó fue *E. faecalis* con un total de 13 muestras (26%; Grafico 3), seguido de *S. mitis oralis* con un total de 5 muestras (10%), también se lograron identificar bacterias como *E. faecium* (3), *P. mirabilis* (4), *C. albicans* (2) *K. pneumoniae* (2), entre otras (Figura 1).



Nro.de muestra	Diagnóstico	Lesión/Sin lesión	Resultado	Resultado
1	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	
2	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	
3	PIS-PS	Sin lesión	<i>Enterococcus faecalis</i>	
4	NP-PAA	Sin lesión	No desarrollo bacteriano	
5	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Streptococcus oralis</i>	
6	TxPT	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
7	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
8	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
9	NP-PS	Sin lesión	<i>Levilactobacillus hammesii</i>	
10	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Candida albicans</i>	
11	NP-PAS	Sin Lesión	<i>Sin desarrollo bacteriano</i>	
12	TxPT	Lesión periapical	<i>Proteus mirabilis</i>	
13	NP-AAC	Lesión periapical	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
14	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
15	NP-PAA	Sin lesión	<i>Enterococcus faecalis</i>	
16	PI-PASS	Sin lesión	<i>Neisseria sicca</i>	
17	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
18	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

19	NP-PAA	Sin lesión	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Ralstonia picketti</i>
20	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	
21	NP-PAA	Sin lesión	<i>Streptococcus mitis oralis</i>	
22	PAT-PS	Sin lesión	<i>Enterococcus faecium</i>	
23	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Streptococcus mitis oralis</i>	
24	NP-AAA	Lesión periapical	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
25	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	
26	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Corynebacterium simultans</i>	
27	TXPT	Sin lesión	<i>Enterococcus faecalis</i>	
28	NP-PAA	Lesión periapical	Sin identificación	
29	TXPT	Sin lesión	Sin identificación	
30	NP-PAA	Sin lesión	<i>Candida albicans</i>	
31	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	
32	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
33	TX-PPS	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	
34	PTX-PAS	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	
35	TX-PPA	Lesión periapical	<i>Streptococcus salivarius</i>	
36	TX-	Lesión periapical	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
37	TX- PSANO	Sin lesión	<i>Escherichia coli</i>	
38	TX-PSANO	Sin lesión	Sin Identificación	

39	NP-AAC	Lesión periapical	<i>Streptococcus gordonii</i>	
40	N-PAS	Sin lesión	Sin identificación	
41	PX-PAS	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
42	PX-PAA	Sin lesión	Sin Crecimiento	
43	PX-PAA	Lesión periapical	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
44	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Bacillus altitudinis</i>	
45	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecium</i>	
46	PX-PAA	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecium</i>	
47	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
48	NP-PAS	Lesión periapical	<i>Neisseria flavescens</i>	
49	NP-PAS	Lesión periapical	Sin identificación	
50	NP-PAA	Lesión periapical	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Figura 1. Microorganismo aislado de cada identificación de las muestras de paciente.

6.2 Susceptibilidad a los antibióticos en células planctónicas

Se realizó el ensayo de susceptibilidad a las 13 muestras identificadas de *E. faecalis* donde no se observó resistencia por parte de las mismas frente a ninguno de los dos antibióticos probados (Figura 2), con MIC menores a 2 en el caso de la amoxicilina y menores a .5 en el caso de vancomicina, a excepción del aislamiento No. 3 el cual la MIC fue de 1, sin embargo

sigue teniendo un resultado susceptible a vancomicina, por lo que todas las cepas fueron susceptibles a ambos antibióticos de manera planctónica.

Número de Aislamiento	MIC de Amoxicilina	MIC de Vancomicina
1	<2	<.5
2	<2	<.5
3	<2	1
6	<2	<.5
14	<2	<.5
15	<2	<.5
25	<2	<.5
27	<2	<.5
31	<2	<.5
33	<2	<.5
34	<2	<.5
41	<2	<.5
50	<2	<.5

Figura 2. Susceptibilidad y/o resistencia a antibióticos de los aislamientos de *E. faecalis*.

7. DISCUSIÓN

Identificar cuáles microorganismos son los agentes causales de la infección endodóntica ha sido un reto que aun esta por superar a nivel mundial. Existen muy pocos reportes acerca de cuáles bacterias están colonizando cámara pulpar o canal intraconducto y más aún en que proporciones se encuentran cada uno de ellos y cuál fue su rol en el establecimiento de la infección. Sabemos que se forma un biofilm heterogéneo y que algunos microorganismos presentes como *E. faecalis* tiene la capacidad para formar individualmente biofilm intraconducto, sin embargo, el mecanismo patogénico que conlleva a la muerte de las células de la pulpa aun es un misterio. Previamente se ha reportado que cepas de *E. faecalis* tienen la capacidad de producir y excretar una exoenzima llamada citolisina, sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que aislados de canal intraconducto expresen y secreten dicha exoenzima, solo han confirmado la presencia del gen mediante técnicas de biología molecular como PCR en tiempo real. Actualmente existen otras metodologías que pueden contribuir al aislamiento y caracterización de cepas con mayor grado de confiabilidad y que nos permitirán estudiar tanto la etiología como el proceso patogénico de la infección endodóntica.

La espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) se ha vuelto un método estándar en microbiología clínica hace casi una década y es un método de elección para la identificación de microorganismos en laboratorios clínicos. Debido a que MALDI-TOF MS es una tecnología precisa, rápida y rentable se ha vuelto un método para realizar diagnósticos clínicos de rutina (Al-Manei K. et al., 2022).

En este estudio se realizó la toma de muestras de paciente con limas #10 tipo K, y puntas de papel estériles como en los artículos de Tzanetaki, et al., 2022 y Pervine H. Sharaf, et al., 2022. Donde se introduce la lima #10 hasta la longitud de trabajo se cortó la parte metálica de la lima y se colocó en medio BHI, a continuación, se colocó solución salina dentro de los conductos y se introdujeron puntas de estéril para tomar lo desprendido de barrillo dentinario.

A diferencia del estudio de Bober, et al., 2023, en donde las muestras no fueron cultivadas en placas de agar, sino que se realizó la extracción de material genético mediante un método

de decantación, en nuestro estudio todas las muestras fueron sembradas en placas de agar sangre para su cultivo, identificación y aislamiento.

Dentro de los resultados obtenidos en este estudio, se analizaron 50 muestras de pacientes con infección endodóntica siendo 32 (64%) muestras de infección endodóntica primaria y 18 (36%) muestras de infecciones secundaria/persistente, también se tomó en cuenta los diferentes diagnósticos periapicales siendo 18 (36%) pacientes con diagnóstico periodontal de periodontitis apical asintomática, 19 ((38%) pacientes con periodontitis apical asintomática, 2 (4%) pacientes con absceso apical crónico, 1 (2%) paciente con absceso apical agudo y 10 (20%) pacientes con periodonto sano. La bacteria que mayormente se identificó fue *E. faecalis* con un total de 13 muestras (26%), seguido de *S. mitis oralis* con un total de 5 muestras (10%), también se lograron identificar bacterias como *E. faecium* (3), *P. mirabilis* (4), *C. albicans* (2) *K. pneumoniae* (2), entre otras. Siquiera y colaboradores reportaron la identificación de 26 tipos diferentes de microorganismos presentes en el biofilm intraconducto (Siquiera 2004). Entre los microorganismos identificados coincide con nuestro estudio en; *E. faecalis* y *Streptotococcus mitis*, los más prevalentes en las muestras analizadas en nuestro estudio. Sin embargo, es relevante resaltar que el estudio de Siquiera no detectó a *Candida albicans* que si se identificó en nuestro estudio y la respuesta está en la metodología diferente entre cada tipo de estudio. En el caso del Dr. Siquiera al realizar ensayos de PCR de tiempo real se emplean sonda y primers específicos para cada tipo de microorganismo que se busca y si no se incluyeron pues simplemente no se detectara, aunque estén presentes en la muestra de estudio. Previamente Chávez de Paz también realizó un estudio similar al del Dr. Siquiera reportando la presencia de *S. mutans* bacteria ausente en los reportes de Siquiera. Estos datos nos muestran la gran variabilidad que puede existir entre cada paciente y la colección específica de microorganismos que integran su biofilm endodóntico.

En nuestro estudio no se observó resistencia por parte de las cepas frente a ninguno de los dos antibióticos probados, con MIC menores a 2 en el caso de la amoxicilina y menores a .5 en el caso de vancomicina, por lo que todas las cepas fueron susceptibles a ambos antibióticos de manera planctónica. Estos datos coinciden en que hasta el momento no se ha aislado ninguna cepa de *E. faecalis* que sea resistente a vancomicina. Este dato es muy relevante

porque resalta la utilidad del uso de antibióticos como parte del tratamiento para erradicar las bacterias presentes en el biofilm endodóntico y no depender solo de la instrumentación y/o irrigación con hipoclorito de sodio. Es interesante mencionar que aislados médicos a partir de infecciones urinarias de pacientes, *E. faecalis* si ha mostrado resistencia a diferentes antibióticos incluyendo vancomicina. También se identificó la presencia de plásmidos con genes codificantes a factores de virulencia y resistencia antimicrobiana.

Como perspectiva de este estudio queda pendiente la caracterización microbiológica de los aislados obtenidos, sobre todo de *E. faecalis*. Se debe buscar la presencia de plásmido que contiene el gen codificante a citolisina, corroborar la síntesis de dicha exoenzima por electroforesis y evaluar su potencial efecto patogénico sobre células de la pulpa dental. Datos que podrían contribuir a explicar los mecanismos moleculares de la etapa temprana de la etiología de la infección endodóntica.

8. CONCLUSIONES

Se aislaron, identificaron y caracterizaron los microorganismos presentes en pacientes mexicanos con infección endodóntica. *E.faecalis* y *S. mitis* constituyen las bacterias más prevalentes y coinciden con reportes previos de Squeira en un estudio realizado empleando una metodología distinta a la nuestra. Los datos obtenidos también refuerzan la hipótesis de una gran variabilidad de los microorganismos presentes entre cada paciente con infección endodóntica y se confirmó la ausencia de resistencia antimicrobiana entre los aislados clínicos obtenidos.

9. LITERATURA CITADA

- 1 Ali A, Bhosale A, Pawar S, Kakti A, Bichpuriya A, Agwan MA. Current Trends in Root Canal Irrigation. *Cureus*. 2022 May 8;14(5):e24833.
- 2 Ali L, Goraya MU, Arafat Y, Ajmal M, Chen JL, Yu D. Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2017 May 3;18(5):960.
- 3 Al-Manei K, Ghorbani M, Naud S, Al-Manei KK, Sobkowiak MJ, Lund B, Hazirolan G, Sällberg Chen M, Özenci V. Clinical Microbial Identification of Severe Oral Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry in Stockholm County: an 11-Year (2010 to 2020) Epidemiological Investigation. *Microbiol Spectr*. 2022 Dec 21;10(6):e0248722.
- 4 Anthony J. Rotary instrumentation. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2001 Aug;16(3):182-5.
- 5 Bergenholtz G. Assessment of treatment failure in endodontic therapy. *J Oral Rehabil*. 2016 Oct;43(10):753-8.
- 6 Bolhari B, Bahador A, Khoshkhounejad M, Afshar MS, Moghaddaszadeh M. Evaluation of the Effect of MTAD on Expression of *Enterococcus faecalis* Virulence Factors Considering the Role of Different Obturating Materials. *J Dent (Tehran)*. 2018 Nov;15(6):382-392.
- 7 Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [Bacterial identification methods in the microbiology laboratory]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Oct;29(8):601-8. Spanish
- 8 Boutsoukis C, Arias-Moliz MT. Present status and future directions - irrigants and irrigation methods. *Int Endod J*. 2022 May;55 Suppl 3(Suppl 3):588-612.
- 9 Chavez L, Sedgley C, Kishen A. The root canal biofilm. Berlin Heidelberg: Springer; 2015, (citado 2 de julio 2023). pp 103-125, disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-47415-0>
- 10 Coburn PS, Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol*. 2003 Oct;5(10):661-9.

- 11 Coenye T, De Prijck K, De Wever B, Nelis HJ. Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *J Appl Microbiol*. 2008 Sep;105(3):733-40.
- 12 Cope AL, Francis N, Wood F, Chestnutt IG. Systemic antibiotics for symptomatic apical periodontitis and acute apical abscess in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Sep 27;9(9):CD010136.
- 13 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318-22.
- 14 Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93.
- 15 Elbehiry A, Aldubaib M, Abalkhail A, Marzouk E, ALbeloushi A, Moussa I, Ibrahim M, Albazie H, Alqarni A, Anagreyah S, Alghamdi S, Rawway M. How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. *Vaccines (Basel)*. 2022 Nov 8;10(11):1881.
- 16 Erazo D, Whetstone DR. Dental Infections. 2022 Sep 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–.
- 17 Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Aug 11;14(9):563-75.
- 18 Gołębek H, Borys KM, Kohli MR, Brus-Sawczuk K, Strużycka I. Chemical aspect of sodium hypochlorite activation in obtaining favorable outcomes of endodontic treatment: An in-vitro study. *Adv Clin Exp Med*. 2019 Oct;28(10):1311-1319.
- 19 Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am*. 2010 Apr;54(2):291-312.
- 20 Hrubanova K, Krzyzanek V, Nebesarova J, Ruzicka F, Pilat Z, Samek O. Monitoring *Candida parapsilosis* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms by a Combination of Scanning Electron Microscopy and Raman Spectroscopy. *Sensors (Basel)*. 2018 Nov 22;18(12):4089.

- 21 Kostrzewa M. Application of the MALDI Biotyper to clinical microbiology: progress and potential. *Expert Rev Proteomics*. 2018 Mar;15(3):193-202.
- 22 Lang S, Demir M, Duan Y, Martin A, Schnabl B. Cytolysin-positive *Enterococcus faecalis* is not increased in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int*. 2020 Apr;40(4):860-865.
- 23 Luis E. Chávez de Paz, Christine M. Sedgley, Anil Kishen. The root canal biofilm. Volumen 9. Portland Oregon USA: Springer; 2015.
- 24 Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 11;18(8):1748.
- 25 Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019 May 1;24(3):e364-e372.
- 26 Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol*. 2021 Dec;52(4):1701-1718.
- 27 Ruhal R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiol Res*. 2021 Oct;251:126829
- 28 Saber Sel-D, Hashem AA. Efficacy of different final irrigation activation techniques on smear layer removal. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1272-5.
- 29 Schlafer S, Meyer RL. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *J Microbiol Methods*. 2017 Jul;138:50-59.
- 30 Segura-Egea JJ, Cabanillas-Balsera D, Jiménez-Sánchez MC, Martín-González J. Endodontics and diabetes: association versus causation. *Int Endod J*. 2019 Jun;52(6):790-802.
- 31 Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009 Aug 15;49(4):543-51.

- 32 Sharaf PH, El Backly RM, Sherif RA, Zaazou AM, Hafez SF. Microbial identification from traumatized immature permanent teeth with periapical lesions using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *BMC Oral Health*. 2022 Dec 31;22(1):661.
- 33 Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J*. 2022 May;55 Suppl 3:512-530.
- 34 Tonini R, Salvadori M, Audino E, Sauro S, Garo ML, Salgarello S. Irrigating Solutions and Activation Methods Used in Clinical Endodontics: A Systematic Review. *Front Oral Health*. 2022 Jan 31;3:838043.
- 35 Torabinejad M, White SN. Endodontic treatment options after unsuccessful initial root canal treatment: Alternatives to single-tooth implants. *J Am Dent Assoc*. 2016 Mar;147(3):214-20.
- 36 Tzanetakis GN, Koletsi D, Tsakris A, Vrioni G. Prevalence of Fungi in Primary Endodontic Infections of a Greek-living Population Through Real-time Polymerase Chain Reaction and Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
- 37 Vadachkoria O, Mamaladze M, Jalabadze N, Chumburidze T, Vadachkoria D. evaluation of three obturation techniques in the apical part of root canal. *Georgian Med News*. 2019 Jul-Aug;(292-293):17-21.
- 38 Vandecandelaere I, Van Acker H, Coenye T. A Microplate-Based System as In Vitro Model of Biofilm Growth and Quantification. *Methods Mol Biol*. 2016;1333:53-66.
- 39 Virdee SS, Farnell DJJ, Silva MA, Camilleri J, Cooper PR, Tomson PL. The influence of irrigant activation, concentration and contact time on sodium hypochlorite penetration into root dentine: an ex vivo experiment. *Int Endod J*. 2020 Jul;53(7):986-997.
- 40 Vuotto C, Donelli G. Field emission scanning electron microscopy of biofilm-growing bacteria involved in nosocomial infections. *Methods Mol Biol*. 2014;1147:73-84.

RESUMEN BIOGRÁFICO

David Adrián Rodríguez Nava

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Endodoncia

Tesis: ***“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS QUE FORMAN EL BIOFILM INTRACONDUCTO MEDIANTE ESPECTOMETRIA DE MASAS”.***

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Monterrey Nuevo León, hijo de Uriel Rodríguez Gómez y Angelica María Nava García.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en 2021.

Experiencia profesional: Instructor de la unidad de aprendizaje de microbiología oral.