ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE *Streptococcus mutans* A BETALACTAMICOS EN UNA POBLACIÓN DE RIESGO A ENDOCARDITIS INFECCIOSA

YADY CAROLINA TRIANA MAHECHA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2011

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE *Streptococcus mutans* A BETALACTAMICOS EN UNA POBLACIÓN DE RIESGO A ENDOCARDITIS INFECCIOSA

YADY CAROLINA TRIANA MAHECHA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

BACTERIÓLOGA

Director

Dr. HUGO DIEZ, Ph.D

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2011

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE *Streptococcus mutans* A BETALACTAMICOS EN UNA POBLACIÓN DE RIESGO A ENDOCARDITIS INFECCIOSA

Dra Ingrid Schuler, Ph.D	**Dra Diana Patiño , Bact**
Decana académica	**Directora**
Facultad de Ciencias	**Carrera Bacteriología**

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2011

NOTA DE ADVERTENCIA:

Artículo 23 de la resolución N˚13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de realizar cada una de las cosas que contribuyeron para alcanzar este proyecto y permitirme contribuir a las ciencias de la salud en pro del bienestar de las personas.

A mis padres y hermanos que me ayudaron a cumplir el sueño de estudiar Bacteriología.

A cada uno de los Docentes de la Universidad Javeriana que me brindaron todo su conocimiento y me formaron como profesional.

A cada una de las personas que hicieron parte durante esta hermosa vida Universitaria.

Al Doctor Hugo y la Doctora Margarita Chaves por su guía y conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por esta oportunidad tan maravillosa de utilizar todo el conocimiento adquirido en mi carrera para este proyecto.

Muchas gracias a mi Director Hugo Diez por darme la gran oportunidad de realizar este proyecto, por su colaboración y consejos que fueron muy importantes para realizar este trabajo.

A la Doctora Margarita Chaves quien me brindo su apoyo en el laboratorio de CIO y su conocimiento fue de mucha importancia.

Al CENTRO DE INVESTIGACIÓN ODONTOLOGICO DE LA UNIVERSIDAD JAVERIANA quienes me permitieron pertenecer a su grupo de investigación en este gran macro proyecto, además me facilitaron sus instalaciones, equipos y materiales para el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

La endocarditis infecciosa (EI) es una enfermedad inflamatoria que pone en alto riego la vida de las personas y en los últimos años las conclusiones de estudios publicados han cuestionado la eficacia de la profilaxis antimicrobiana para prevenir EI en aquellos pacientes que se someten a procedimientos dentales invasivos siendo importante resaltar que en la cavidad oral existe una flora bacteriana normal. Las superficie de las mucosa oral están pobladas por micro flora endógena, el trauma a la superficie mucosa permite que se liberen especies microbianas en forma transitoria al torrente circulatorio (bacteremia transitoria) la cual puede ser causada por Streptococos del grupo *viridans* y acompañada de otra microflora oral, esto ocurre comúnmente en extracciones dentales u otro procedimientos dentales. Los *Streptococcus mutans* son habitantes normales de la mucosa oral que tiene por función mantener el equilibrio de la flora bacteriana bucal, el *Streptococcus mutans* posee diferentes moléculas que les permiten colonizar e invadir tejido como el diente, por lo tanto esas propiedades le permiten causar EI cuando ingresa a torrente sanguíneo y encuentra tejido cardiaco que exponga fibras de colágeno que interacciones con la bacteria y para así formar vegetaciones e instaurar la enfermedad. Tradicionalmente, los estreptococos del grupo viridans han sido muy sensibles a la acción de beta lactámicos; Sin embargo se ha notificado en los últimos estudios la existencia de cepas que se han aislado clínicamente y son resistentes a este ß-lactámico, el mecanismo mas común de resistencia es la producción de enzimas como las betalactamasas. Por ello resulta interesante estudiar cual es la resistencia de *Streptococcus mutans* a un clase de antibiótico ß-lactámico mas comúnmente utilizado por los odontólogos como profilaxis para sus pacientes que es la Amoxicilina y si el mecanismo de resistencia es causado por la producción de betalactamas. Se realizo el aislamiento e identificación de las cepas de *Streptococcus mutans* obtenidas de los pacientes que asistieron al servicio de Cardiología y Estomatología del Hospital Central de la Policía Nacional y posteriormente se evaluó la susceptibilidad al antibiótico betalactamico “Amoxicilina” por el método de difusión en agar con discos y se prosiguió a la detección de enzimas betalactamasas en las cepas resistentes por el método cefalosporina cromógena nitrocefina. En conclusión se encontró que el 50% de los pacientes estudiados tenían en cavidad oral *S.mutans* y la resistencia de *S.mutans* a la amoxiclina fue (15%) y el (20%) de las bacterias presentaron como mecanismo de resistencia la producción de beta-lactamasas.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 10

2. MARCO TEORICO 11-13

3. JUSTIFICACIÓN.....13,14

4. OBJETIVOS.....14

5. METODOLOGÍA 15

5.1 Población de estudio 15

5.2 Criterios de inclusión 15

5.3 Criterios de exclusión.....15

5.4 Muestra.....16

5.5 Transporte.....16

5.6 Identificación microbiológica presuntiva 16,17

5.7 Ensayos de sensibilidad 17

5.8 Producción de betalactamasas 17,18

5.9 Conservación de cepas 18

5.10 Análisis de resultados 18

6. RESULTADOS 18-20

7. DISCUSIÓN 21,22

8. CONCLUSIÓN 22

9. BIBLIOGRAFÍA 23-26

10. ANEXOS 27

1. INTRODUCCIÓN

Los estreptococos del grupo viridans son habitantes normales de la mucosa oral, donde cumplen un importante papel como flora comensal que tiene por función prevenir la colonización de patógenos potenciales al competir metabólicamente con ellos por sustratos, mantener el equilibrio de la flora normal y bloquean los receptores celulares para patógenos orales. Las infecciones clínicas a nivel oral ocurren principalmente tras una lesión en las barreras naturales de su hábitat normal, acompañadas de un desequilibrio en la flora normal y favorecidas por una baja defensa del sistema inmune. Microorganismos de este grupo como *Streptococcus mutans* se ven beneficiados de las situaciones anteriores dado que tienen diferentes moléculas que les permiten colonizar e invadir tejido incluyendo el diente. Entre dichas moléculas tenemos proteínas de adherencia a tejidos como las proteínas de adherencia celular (PAC), proteínas de superficie de unión a colágeno y adhesina (CNM), moléculas para transferir y degradar sustratos que contribuyen a la conformación del biofilm como Glucosiltransferasas (GTFS), y Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs) entre otras, moléculas que son consideradas los factores de patogenecidad implicados en la producción del proceso cariogénico, y que facultan a la bacteria para causar bacteriemia y endocarditis bacteriana, si esta llega a alcanzar el torrente sanguíneo tras la realización de un proceso dental de carácter invasivo y el paciente tiene un factor de riesgo para la enfermedad (Kazuhiko y col, 2010). La prevalencia de cepas de *S. mutans* con CNM en la cavidad oral es del 10% a 20% y su presencia ha demostrado ser correlacionada con la caries, ya que se ha observado la estructura de un diente en proceso de caries contiene colágeno tipo I, dado que esta proteína de unión a colágeno se encontró que se une a inmovilizados de colágeno y laminina, por eso es considerado un posible factor etiológico de trastornos de válvulas de corazón (Nomura y col, 2009). Tradicionalmente, los estreptococos del grupo viridans incluyendo *S. mutans* han sido muy sensibles a la acción de beta lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, vancomicina, rifampicina, cotrimoxazol, lincosamidas y el cloranfenicol. Sin embargo, a partir de 1949, se notifica la existencia de cepas resistentes a la penicilina, y a partir de esa fecha, la frecuencia de aislamientos clínicamente significativos resistentes a este ß-lactámico, ha ido aumentando progresivamente (Wilson y col, 1995), Los mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactamicos son: Las mutaciones en las proteínas ligadoras de penicilina (PBP), las bombas de flujo y hidrólisis por medio de la producción de enzimas betalactamasas (βls) que hidrolizan el anillo betalactamico de los betalactamicos y constituye uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana, por lo tanto se han motivado la realización de estudios para detectar estas enzimas en las bacterias y de esta manera implementar el desarrollo de diferentes estrategias de tratamiento cuyo objetivo es neutralizar su acción. (Barcelona y Col, 2008) En el presente estudio, se realizó una prueba piloto en 46 individuos con alto riesgo de endocarditis Infecciosa, que asistieron al servicio de Cardiología y Estomatología del Hospital Central de la Policía Nacional encontrándose que el 50% de los individuos tienen en su cavidad oral S.mutans de los cuales el 15% presentaron resistencia a la amoxicilina, estos datos corroboran la importancia identificar la presencia y evaluar la susceptibilidad antibiótica de *S.mutans* aislados de cavidad oral en pacientes que tienen alto riesgo a endocarditis infecciosa que se puedan someter a bacteremias transitorias causadas por procedimientos odontológicos invasivos, por lo tanto es importante definir protocolos de profilaxis adecuados antes de realizar intervenciones invasivas dependiendo los resultados del laboratorio.

2. MARCO TEORICO

La endocarditis infecciosa (E.I) es una enfermedad inflamatoria, exudativa y proliferativa que afecta el endocardio con la formación de una vegetación infectada debido a la colonización por gérmenes circulantes en un agregado fibrinoplaquetar constituido sobre una lesión endotelial. Se ha demostrado que hay una relación entre determinados procedimientos y el hallazgo de bacteremia por microorganismos comúnmente asociados a endocarditis infecciosa algunos de estos procedimientos son: Quirúrgicos (Amigdalotomía, Tonsilectomía, cirugía mucosa respiratoria, cirugía de mucosa intestinal, cirugía de próstata, etc), Terapéuticos (Sonda uretral, aborto terapéutico, dispositivos intrauterinos) y dentales que incluyen procedimientos de extracción dental, procedimientos periodontales , implantes subgingivales de tiras antibióticos, implantes bandas de ortodoncia, inyección intraligamentosa de anestésicos y limpieza con sangrado, también es importante resaltar que existen procedimientos dentales en los cuales no es necesario utilizar profilaxis antibiótica como son: Inyecciones de anestésicos no intraligamentarias, quitar puntos de sutura, obtención de impresiones dentales y extracción de primera dentición.(Vallés y col, 2000). En condiciones inmunológicas normales estos microorganismos serian eliminados rápidamente del torrente sanguíneo pero en personas que tienen sus válvulas cardiacas anormales (malformaciones cardiacas congénitas, fiebre reumatoidea) las bacterias se alojan en lesiones preexistentes y en ellas se multiplican quedando atrapadas por coágulos los cuales las protegen de los anticuerpos y fagocitosis. (Tortora y col, 2007). La etiología de la endocarditis infecciosa es variada y se relaciona a bacteremias pueden ser producidas por un elevado número de microorganismos que incluye virus, hongos (candida y aspergillus) estos dos agentes se encuentran un porcentaje relativamente bajo 5% y un conjunto de bacterias que producen el 80% de las EI como son: estafilococos *(S.aureus*, *S.epidermidis)*, enterococos *(E.faecalis*) y streptococos orales del grupo viridans siendo el *S.mutans* el mas representativo.(Echeverria y col, 2002). *Streptococcus mutans* fue previamente clasificado en cuatro serotipos (c,e,f,k) los cuales se basan en la composición química de serotipo especifico de polímeros de ramnosa de glucosa son cocos gram positivos por coloración de Gram, inmóviles, acídofilo, anaerobio facultativo, catalasa negativo, hidroliza la esculina, fermenta manitol, rafinosa, inulina y sorbito además de otros azucares como la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares (glucanos) donde se distinguen 2 tipos: uno similar al dextrano y el denominado mutano. Ambos están formados por la polimerización de unidades de alfa D-glucosa unidas por enlaces o-glicosídicos alfa (1-3) y alfa (1-6) con diferente grado de ramificación (Davis HM 1986). Las dextranas son polisacáridos de elevado peso molecular, formados por glucosas unidas por enlaces alfa 1-6 al menos en el 50%, con ramificaciones enlazadas a-1.3 aunque también puede presentar otras unidas a-1.2 o a-1.4, Su formación ocurre por la acción de la enzima dextranasacarasa. (Rodríguez y col, 2005), los cuales le sirven como adherencia, por lo general son alfa o gamma hemolíticos aunque existen un bajo porcentaje beta hemolíticos. (Nomura y col, 2009) (Shigeyuky y col, 1980). En los estudios de los últimos años sobre la patogenia de EI ha involucrado a muchos microorganismos incluyendo bacterias de la cavidad oral como el *S.mutans* el cual puede entra a circulación sanguínea por la práctica de algunos procedimientos invasivos orales antes descritos y estando en sangre se adhiere al tejido cardiaco por medio de 1. proteínas de adherencia celular (PAC) cuyo peso molecular es de 190 kDa y También ha sido denominada antígeno I/II, B, IF, P_1, MSL-1. 2. proteínas de superficie de unión a colágeno y adhesina (CNM) y Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs), para el *S.mutans* se adhiera necesariamente el tejido debe estar lesionado donde se

exponen fibras de colágeno y por lo tanto se puede adherir, este proceso va acompañado de una respuesta inflamatoria donde el tejido subendotelial que esta expuesto hace que haya un adhesión plaquetaria mediante receptores de membrana: Gp Ia y Gp IIa (en endotelio) y GpIb/IX (en la membrana plaquetar) formando un puente con el factor von Willebrand (vWF) y simultáneamente en el tejido llegan los monocitos que producen factor tisular activado y citoquinas que, a su vez, activan la vía intrínseca de la coagulación que comienza con la activación del factor XII que junto con la enzima calicreina activa al factor XI y este activado activa al factor IX. El factor IX junto con el factor VII activado, calcio, tromboplastina y el factor VIII, activan al factor X, los factores X y V activados, en presencia de calcio y fosfolipidos de plaquetas transforman la protombina en trombina y esto hace que el fibrinógeno pase a fribina (Juan Mª y col, 2000), formando un deposito de fibrina y plaquetas en el cual se originan sitios de formación de trombos estériles o trombos fibroplaquetarios que ayudan a que se adhiera el *S.* mutans; todo este conjunto de agregados van creciendo lentamente a medida que se agregan por superposición mas de todos estos elementos y se forma un agregado fibrinoplaquetario no vascularizado (Vegetaciones), en cuya matriz hay colonias de bacterias y escasos leucocitos polimorfonucleares y hematíes, la concentración bacteriana es de aproximadamente 10 bacterias por gramo de tejido, el tamaño y la forma son variables. (Spicer y col, 2009). Las formas clínicas de la EI en general sin importar el agente causal son síntomas como astenia, anorexia, fenómenos embolicos o vasculares, sintomatología totalmente inespecífica y un síndrome febril prolongado de origen desconocido con un trascurso mayor de 3 semanas es una manifestación clínica muy frecuente; se han descrito dos tipos de endocarditis infecciosa dependiendo su curso clínico: aguda y subaguda. La endocarditis aguda tiene un curso clínico corto y comienzo de síntomas breves y mas graves, puede producirse en días o semanas y el estado físico del paciente se deteriora rápidamente, el agente causal suele ser de mayor virulencia se observa habitualmente *S. aureus* y Gram negativos. La endocarditis subaguda en la cual esta ubican agentes causales como los estreptococos alfa hemolíticos característica de *S.mutans* tiene un curso clínico mas largo y con una instauración gradual de los síntomas que pueden ir desde semanas e incluso meses.(Bucher L, 2004). En actualidad se resalta la necesidad del empleo de medidas profilácticas en paciente con riesgo de EI, existen recomendaciones mantenimiento de la salud oral y de la higiene para reducir la incidencia de bacteremia la cual se puedan adquirir en actividades diarias ej: sangrado de encías, así como quimioprofilaxis antes de determinados procedimientos dentales. La American Heart Association (AHA) en 1997 publica pautas de profilaxis antibiótica recomendadas en pacientes con riesgo de Endocarditis Infecciosa antes de someterse a manipulaciones odontológicas y es la utilización en primera opción amoxicilina 2g 1hr antes de la intervención y en pacientes alérgicos a la penicilina administrar Clindamicina 600 mg 1hr antes la intervención; la BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) de 1993 y la EUROPEAN CONSENSUS de 1995 proponen el mismo protocolo y solo difieren en la cantidad para administrar.(Carmona y col, 2004). La frecuencia de resistencia a multidrogas de los *estreptococos viridans* ha incrementado dramáticamente durante las pasadas dos décadas. Esta resistencia incrementada ha reducido la eficacia y el número de antibióticos disponibles para el tratamiento de EI, la amoxicilina es la elección preferida para la terapia oral por que es bien absorbida en el tracto gastrointestinal y proporciona altas y sostenidas concentraciones séricas, es un antibiótico semi-sintetico análogo de la ampicilina que pertenece al grupo de las penicilinas por que en su estructura química tienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, tiene actividad bactericida lenta, su mecanismo de acción es inducir un efecto autolítico e inhibir la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana, el peptidoglucano

esta constituido por cadenas largas de glúcidos, moléculas de N-acetilmuranico y N-acetilglucosamida que se unen entre si (transpeptidación) por la acción de las proteínas con actividad enzimatica (transpeptidasa y carboxipeptidasas) las cuales tienen como función formar tetrapeptidos y unirlos, estas enzimas también tienen la capacidad de fijar las penicilinas por lo tanto también reciben el nombre de PBP (proteínas fijadoras de penicilina), estas PBP toman el anillo betalactamico de la amoxicilina el cual tiene una estructura química similar a los péptidos (D-alanina) que conforman la pared celular y lo unen covalentemente en un lugar activo donde ocurre la transpeptidación por lo tanto bloquea la formación de peptidoglucano. (Marín y col, 2003). Algunos estudios de patrones de susceptibilidad del grupo de estreptococo viridans (S.mutans) recuperado de pacientes con EI diagnosticada se ha encontrado tasas de resistencia del 15% para amoxicilina. (Wilson y col, 2007) Esta refractariedad al tratamiento se debe a que las bacterias como *S.mutans* tienen la capacidad de desarrollar resistencia a los betalactamicos por diferentes mecanismos como el genético que puede ser cromosómico donde se producen mutaciones o plasmídico el cual es auto transferible entre bacterias. Los mecanismos implicados son: Alteraciones de permeabilidad; Modificación de las dianas en este caso las bacterias modifican las PBS y por lo tanto el antibiótico no puede ejercer su acción bactericida; Producción de enzimas el cual es considerado actualmente el principal mecanismo de resistencia a los bectalactámicos, (Marín y col, 2003) Las betalactamasas son las enzimas catalíticas que produce la bacteria contra los antibióticos betalactamicos, se han descrito mas de 190 tipos y se han dividido en 4 clases siendo la clase B metaloenzimas y la clase A, C, D las que tienen como sitio activo la serina y también están compuestas por secuencias de aminoácidos muy similares a las proteínas PBPs los cuales son el blanco de acción de los antibióticos betalactamicos, estas enzimas son producidas por bacterias que tengan peptidoglicano y por algunos hongos, además tienen como sitio activo la serina que interactua con el antibiótico,(Abarca y col, 2001) su actividad enzimática esta principalmente dirigida a la hidrólisis del anillo betalactamico antes que se una con las PBP, el grado de resistencia se determina por la concentración de esta enzima , la afinidad que tenga hacia los betalactamicos y las propiedades hidroliticas; la producción de betalactamasa puede ser constitutiva o inducible en este ultimo la bacteria posee el gen de la betalactamasa y en contacto con el antibiótico betalactamico se activan los genes que codifican para la producción de esta enzima, por lo tanto en ausencia del agente antimicrobianos se cesa la producción enzimática. Las bectalactamasas constitutivas son las enzimas que la bacteria produce continuamente. (Wilson y col, 2007) Las betalactamasas de las bacterias Gram positivas tienen como características por localización/excreción que son exoenzimas, por codificación son extracromosomicas y por lo general tienen actividad penicilinasa. (Barcelona y col, 2008)

3. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de las infecciones odontogénicas se fundamenta en dos pilares: el mecánico-quirúrgico y la antibioticoterapia. El tratamiento antibiótico normalmente se da de forma empírica, basado en la gravedad del cuadro clínico, lo cual trae como consecuencia la refractariedad al tratamiento debido entre otros a la aparición de microorganismos resistentes o incluso multiresistentes a los antibióticos (Berini,1999 y Dubreil 1994). *S. mutans* tradicionalmente es sensible a betalactamicos y como microorganismo perteneciente al grupo viridans resulta ser

resistente a los aminoglucósidos, más tradicionalmente se considera que hay una actividad sinérgica entre los dos grupos de antibióticos. Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que está relación suele ser incierta y se ha visto que hay diferencias geográficas en la resistencia que presentan las cepas en general del grupo viridans, mostrando resistencia antibiótica variable, en virtud de la especie y del origen de su aislamiento (Bresco, 2006) El *Streptococcus mutans* se incluye en el grupo con altas tasas de resistencia entre los Streptococcus, hecho que no es común y su importancia radica, que al estar relacionado con la etiología de la bacteremia – endocarditis infecciosa se requiere conocer el tipo de cepa que hay en Colombia, el grado de resistencia a betalactamicos como la amoxicilina y el mecanismo por medio del cual crea la resistencia. La aparición de esta resistencia se puede dar por dos factores fundamentales: la transferencia entre células bacterianas de genes determinantes y la presión de selección que ejercen los antibióticos que permiten la supervivencia de cepas resistentes que portan genes de resistencia. Uno de los mecanismos moleculares de resistencia mas común generado por las bacterias pero no el único contra los bectalactamicos es la inactivación enzimática mediante la producción de betalactamasas que son enzimas codificadas por genes cromosómicos de la bacteria y su acción es la degradación del antibiótico mediante la ruptura del enlace amino del anillo beta-lactamico para producir metabolitos inactivos.

PREGUNTA

¿Cual es la proporción de resistencia de *S.mutans* a los antimicrobianos betalactámicos en pacientes con alto riesgo de endocarditis infecciosa?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar la proporción de *Streptococcus mutans* resistentes a la amoxicilina mediante la producción de betalactamasas en cepas aisladas de cavidad oral en individuos con riesgo alto de endocarditis infecciosa.

4.2 Objetivos específicos

Determinar la proporción de *S.mutans*, aislados en cavidad oral en pacientes con riesgo a endocarditis infecciosa.

Determinar el porcentaje de resistencia a la amoxicilina de *S.mutans* aislados en pacientes con alto riesgo de endocarditis infecciosa.

Identificar el porcentaje de cepas de *S.mutans* productoras de enzimas betalactamasas.

5. METODOLOGÍA

MODELO DE INVESTIGACIÓN: Estudio observacional con diseño transeccional descriptivo.

5.1 Población estudio:

MUESTRA: El tamaño de la muestra se determinó por conveniencia donde se obtuvo un número total de 46 pacientes con alto riesgo a Endocarditis Infecciosa, y correspondiente a un grupo de pacientes que asistieron al servicio de Cardiología y Estomatología del Hospital Central de la Policía Nacional en el mes de agosto de 2010 y clasificados por encuesta según el riesgo en 3 grupos a saber:

ALTO RIESGO: Prótesis valvular cardiaca, historia clínicas previas de endocarditis, enfermedades congénitas (Tetralogia de Fallot, ventrículo único transposición de grandes vasos), valvulopatías pos quirúrgicas.

MODERADO RIESGO: Enfermedades congénitas (persistencia *ductus* arterioso), Comunicación interauricular *ostium primun*, coartación aorta. Aórtica bicúspide, Disfunción valvular adquirida (enfermedad cardíaca reumática,2ª enfermedades colágeno), Prolapso válvula mitral con regurgitación, Mi cardiopatía hipertrófica.

RIESGO BAJO: Comunicación interauricular tipo ostium secundum, Reparación quirúrgica comunicación interauricular, comunicación, Interventricular o de persistencia ductus arteriosos, Cirugía previa de bypass arteria coronaria, Prolapso válvula mitral sin regurgitación, Soplo fisiológico, funcional o inocente, Enfermedad de Kawasaki previa sin disfunción valvular, Antecedentes de fiebre reumática sin disfunción valvular, Portador de marcapasos o desfibrilador cardíaco, Lupus eritematoso, Artritis reumatoidea.

5.2 Criterios de inclusión:

En el estudio solo se incluyeron todos los pacientes que asistieron al servicio de Estomatología y servicio de Cardiología del Hospital Central de la Policía, durante el mes de agosto de 2010 y que estaban dentro de los grupos de riesgo ya mencionados. Es requisito para participar en el estudio fue la autorización paciente firmando el consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Clínica de la Policía Nacional y de la facultad de odontología de la Pontificia Universidad Javeriana (Wilson *et al*, 2007).

5.3 Criterios de exclusión:

Se excluyeron pacientes con factor de alto riesgo de Endocarditis con los cuales no sea posible la comunicación, pacientes que no estén de acuerdo con participar en el estudio, y paciente con alergia al algodón, material de los hisopos para la toma de la muestra.

5.4 Muestra:

Usando dos hisopos previamente esterilizados se realizó un barrido de la cavidad oral de los pacientes obteniendo muestra salival y de mucosas, se transfirieron al medio de transporte (caldo de tioglicolato) un hisopo por tubo. Se cerraron inmediatamente los tubos esto se llevo a cabo siguiendo los lineamientos establecidos por el manual de tomas de muestras microbiológicas de la secretaría distrital de salud, y de acuerdo al protocolo institucional establecido en la clínica (SDS, 2008). Dado que este trabajo estaba enmarcado dentro de un macroproyecto, las muestras fuerón tomadas en colaboración con los residentes de cirugía máxilo facial de la Facultad de Odontología Universidad Javeriana.

5.5 Transporte:

Siguiendo las indicaciones establecidas por las normas de bioseguridad y preservación de la secretaría distrital de salud para toma y transporte de muestras, estas se recolectarón en medio de transporte enriquecido para *Stafilococos/Streptococos* de cavidad oral (BHI con 30 % de glicerol y suplementado con oxacilina) y tubo adicional de tioglicolato prereducido, para su posterior embalaje y transporte al laboratorio de bacteriología especializada de la Universidad Javeriana en un período de tiempo inferior al límite crítico de 2 horas (Thomson y Miller, 2003).

5.6 Identificación microbiológica presuntiva:

Se realizó la identificación desde medio de Agar tripticasa soya y agar mitis salivarius. Se seleccionaron las colonias con características morfológicas y tintoriales (Coloración de Gram) del Género *Streptococcus* (fig.1-2), después las colonias fueron cultivadas (fig.2) y posteriormente se identificadas bioquímicamente: catalasa negativa, bilis esculina positiva, manitol e inulina (fermentan).

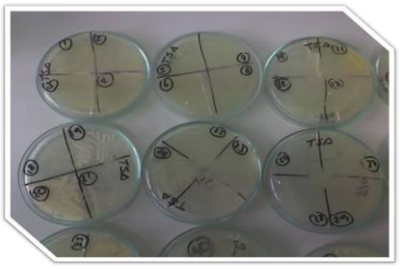

Fig 1. Crecimiento de colonias presuntivas de S.mutans

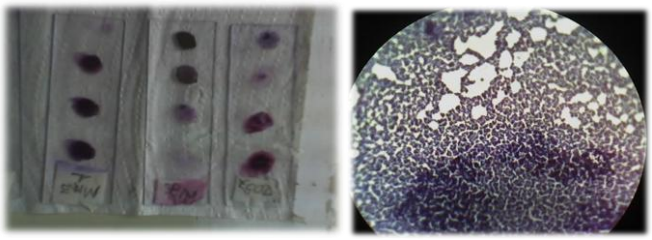

Fig 2. Coloración de Gram (Observación de cocos Gram positivos)

Fig 3. Crecimiento en medio Agar tripticasa soya S.mutans

5.7 Ensayos de sensibilidad

Las bacterias se cultivarón en 5 ml de caldo tripticasa de soya sin antibiótios durante la noche (24-78 horas). La sensibilidad a antimicrobianos se realizó por el método de difusión en agar con discos, según las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006). El antibiótico utilizado fue amoxicilina en sensidisco de 10 µg incubándose a 35 grados C por 24 h; (Koneman, 1999)

Fig 4. Sensibilidad de S.mutans a la amoxicilina

5.8 Producción de betalactamasas

Las cepas de S.mutans resistentes a la amoxicilina se les realizo la prueba de ß-lactamasa por el método cefalosporina cromógena nitrocefina. En presencia de la betactamasa y de la apertura del anillo betalactamico, aumenta la conjugación del grupo dinitroestirilo en la posición 3 de anillo dihidrotiazina con un cambio de color de amarillo a rojo. (Jean F. Mac Faddin, 2003)

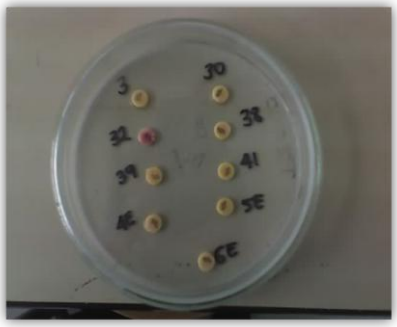

Fig 5. Prueba para la detección de betalactamasas.

5.9 Conservación de las cepas *S.mutans:*

Las cepas resistentes a amoxacilina se conservaron por el método de crioconservación a-70°C, en medio Mueller-Hinton con 30 % de glicerol y suplementado con oxacilina, con el fin de utilizarlas posteriormente en la fase II del macroproyecto correspondiente a la caracterización molecular de los genes de resistencia.

Fig 6. Alícuotas de las cepas *S.mutans* para congelar.

5.10 Análisis de resultados

Los datos se tabularon en tabla Excel y siendo un estudio descriptivo se sacaron los respectivos porcentajes para las variables de cada uno de los objetivos planteados.

6. RESULTADOS

6.1 Características de la población de estudio

La población de 46 pacientes incluida en el estudio se caracterizó porque tenía una edades entre 19 y 75 años con una media de 61.76 (DS 11,817) donde el 65% (30) correspondía a hombre y

35 % (16) a mujeres (figura 7) y de acuerdo a los criterios de inclusión acudieron a consulta por: procesos endodónticos, obturación de conductos, cirugías gingivales, y procesos dentales acompañados de sangrado y ruptura de tejido con factores asociados a riesgo de valvulopatías al 2%, endocarditis infecciosa como antecedente 2% y prótesis valvular 96%. (figura 8)

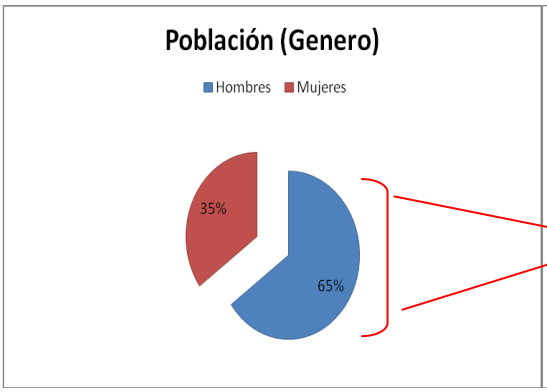

Figura 7. Distribución de población por genero

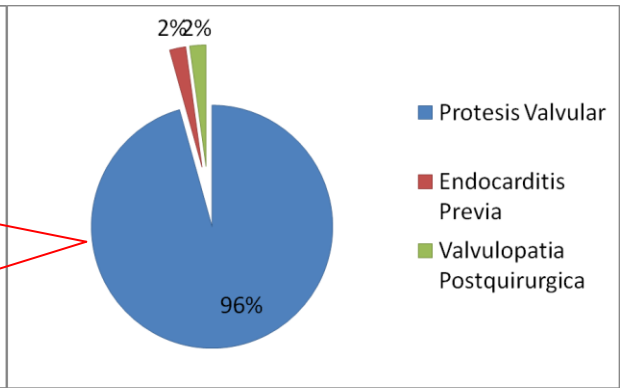

Figura 8. Distribución de factores de riesgo en los pacientes

6.2 Identificación fenotípica y porcentaje de ***S.mutans***

Para cumplir con el objetivo general del estudio, se identificaron inicialmente las cepas del genero *Streptococcus mutans* por métodos bioquímicos manuales. De la población de 46 (100%) pacientes estudiada, 27 (58%) pacientes presentaban colonias presuntivas de *S.mutans* (figura 9), después de realizar la identificación microbiológica solo 23 pacientes tenían *S.mutans* (50%) (figura 10).

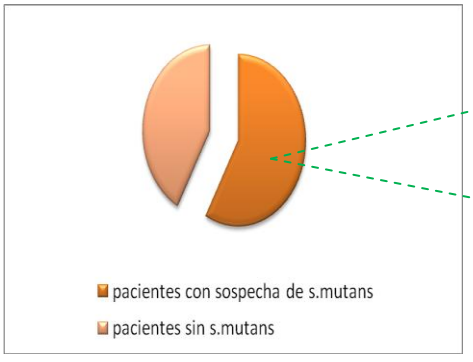

Figura 9. Porcentaje de pacientes con sospecha de *S.mutans*

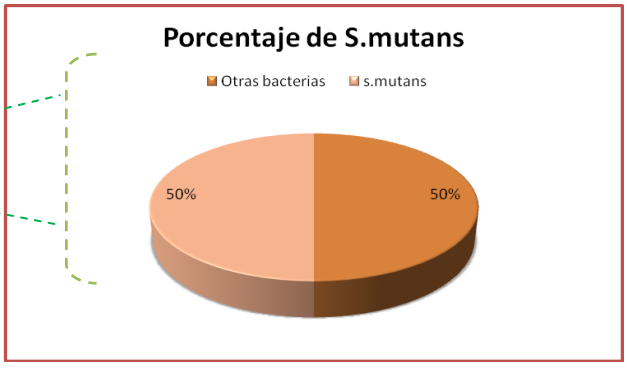

Figura 10. Porcentaje de pacientes con *S.mutans* en la población de estudio.

6.3 Identificación de *S.mutans* resistentes a los bectalactamicos (amoxicilina)

A las muestras de los pacientes que presentarón *S.mutans* se les realizo pruebas de susceptibilidad antibiótica por método manual Kirby bauer encontrándose que de los 23 (50%) pacientes con *S. mutans* , 18 (78%) pacientes presentaban *S.mutans* sensibles a la amoxicilina y 5 (22%) resistentes a la amoxicilina. (figura 11)

6.4 Detección de la enzima Betalactamasa en cepas de S.mutans

De los 5 pacientes que presentaron *S.mutans* resistentes a la amoxicilina, 4 (80%) de ellos presentan *S.mutans* no productores de la enzima betalacamasa y 1(20%) productor de la enzima. (figura 13)

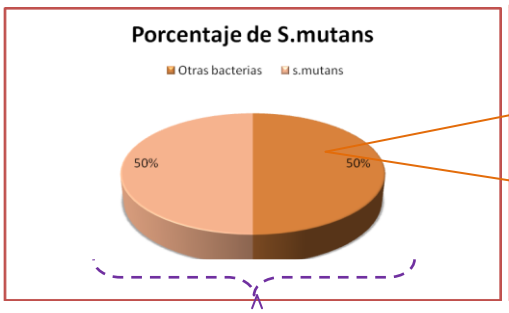

Figura 10. Porcentaje de pacientes con *S.mutans* en la población de estudio.

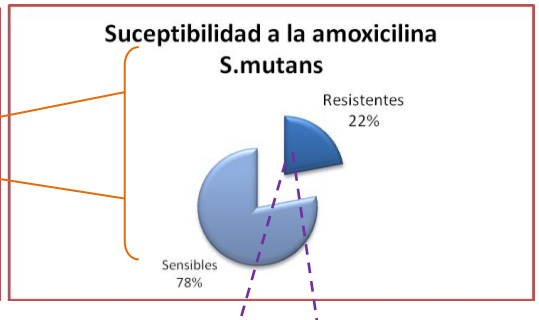

Figura 11. Porcentaje de S.mutans resistentes y sensibles a la amoxicilina

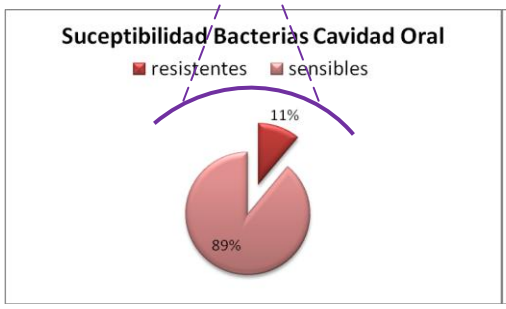

Figura 12. Porcentaje de suceptibilidad antimicrobiana de bacterias de cavidad oral en la población de estudio.

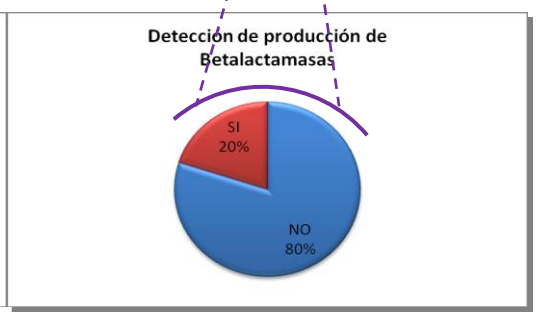

Figura 13. Porcentaje de pacientes que presentan como mecanismo de resistencia la producción de enzima betalactamasa

7. DISCUSIÓN

La endocarditis infecciosa (EI) es una enfermedad inflamatoria poco común pero que pone en alto riego la vida de las personas. En la actualidad se han obtenido avances en el diagnostico, técnicas quirúrgicas, terapia antimicrobiana, etc. A pesar de estos avances aun hay altas tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes con EI. En los últimos años las conclusiones de estudios publicados han cuestionada la eficacia de la profilaxis antimicrobiana para prevenir EI en aquellos pacientes que se someterían a procedimientos gastrointestinales, genitourinarios y dentales invasivos. Las superficie de las mucosas están pobladas por microflora endógena, el trauma a la superficie mucosa permite que se liberen especies microbianas en forma transitoria al torrente circulatorio y por lo tanto causan bacteremia transitoria causada por Streptococos del grupo *viridans* y acompañada de otra microflora oral esto ocurre comúnmente en extracciones dentales u otro procedimientos dentales y actividades de la rutina diaria. (Wilson y col, 2007)

Kazuhiko Nakano y col en 2006, demostraron la presencia de bacterias orales analizando 62 pacientes con enfermedades cardiovasculares donde 35 pacientes (entre 46 a 84 años) tenían daño en valvulas de corazón (mitral o tricúspide) y 27 pacientes (45 a 81 años) con placa de arteroma (aneurisma aortica o abdominal) siendo aislado con mayor frecuencia *streptococos orales,* para lograr la identificación de las especies que conforman el grupo de streptococos se utilizo el método PCR, encontrándose que *S.mutans* tenia una prevalencia en tejido de válvula de corazón del (68.6%) y en placa de arteroma (74.1%). En un caso clínico reportado en Francia de un paciente de 63 años alcohólico con estenosis aortica que presento episodios transitorios de fiebre durante el periodo de mayo de 1997 y diciembre de 1998, fue tratado con antibióticos por una infección del tracto urinario causada por *Escherichia coli*, se le realizaron hemocultivos los cuales eran positivos para E.coli y ecografía transesofágica donde se observaron vegetaciones en la válvula aortica, le realizaron reemplazo de la válvula por una prótesis de St. Jude, a la válvula aortica extraída le realizaron cultivo el cual salió negativo , coloración de Gram en la cual se evidencio presento cocos Gram positivos y análisis de ADN bacteriano de las vegetaciones por PCR donde se identifico *S.mutans* el cual es el agente responsable de la Endocarditis infecciosa en el paciente. (Gauduchon y col,2000). En estudios realizados por la Fundación Clínica A. Shaio (Colombia) en pacientes hospitalizados con diagnostico de Endocarditis Infecciosa pacientes entre nueve meses y 83 años, fue identificado como agente causal mas frecuente a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus viridans*, predominio de casos en el sexo masculino con relación al femenino y compromisos cardiovasculares de mayor frecuencia es la válvula aortica seguida de la válvula mitral.(Echeverria y col, 2002). El servicio de Cardiología del Hospital Reina Sofía de Cordoba y del Hospital de la Costa del Sol de Marbella realizaron un estudio prospectivo de todos los casos de EI que asistieron entre los años 1987 y 1999, de los cuales evaluaron los posibles factores de riesgo y las características diferenciales de la EI sin cardiopatía pre disponente, sus resultados fueron que el 32% sobre prótesis y el 68% de pacientes se trataba de EI sobre válvula nativa del los cuales el 37% correspondía a pacientes sin cardiopatía pre disponente localizando la infección en el lado izquierdo en mayor frecuencia que al lado derecho del corazón. Los agentes microbianos causales más frecuentes fueron *Sthaphylococcus* (37%) y *Streptococcus* (34%), en conclusión se encontró que los factores de riesgo más frecuentes para EI en pacientes sin cardiopatía pre disponente son la insuficiencia renal crónica, las enfermedades digestivas y el empleo de catéteres venosos. (Castillo y col, 2002). En consecuencia la administración extendida de antibióticos profilácticos promueven la emergencia de microorganismos resistentes que muy probablemente causan endocarditis infecciosa, la resistencia antimicrobiana se considera un problema mundial para el tratamiento de cualquier tipo de enfermedad, esto se debe al uso libre (automedicación) de antimicrobianos para infecciones menores y también se debe a la falta de

dinero para completar tratamientos formulados. (World Health Organization, 2001). La aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos utilizados para la profilaxis en la EI se puede deber al uso extendido y a menudo inadecuado de los mismos. Los estreptococos orales resistentes a la penicilina (amoxicilina) se clasifican como totalmente resistentes (CIM > 2mg/l) y relativamente resistentes (CIM 0,125-2 mg/dl), Salinas y col en un estudio publicado en el 2006 plantearon como objetivo identificar la flora bacteriana de 64 pacientes que asistieron a la Clínica Odontológicas de la Universidad de Barcelona entre el periodo del 2001 y 2002, los cuales presentaban infección odontogénica en fase aguda de etiología papular o una periocoronaritis del tercer molar inferior; el aislamiento predominante fue la especie de *S.mutans y oralis* y en el análisis de susceptibilidad antibiótica observo una alta sensibilidad de *S.mutans* a la amoxicilina con un porcentaje del 97% y resistencia del 3%. (Salinas y col, 2006). Se han realizado estudios para conocer el tipo de terapia profiláctica que recomiendan los odontólogos en casos de pacientes con EI, en España se encuestaron a 400 odontólogos por medio de llamada telefónica donde se les planteaba un caso de un paciente con riesgo a Endocarditis Bacteriana el cual se va a someter a una exodoncia, en este caso que tipo de régimen profiláctico recomendaría?, solo el 30% de los odontólogos recomendaron como régimen profiláctico el recomendado por la AHA, es decir , en pacientes que no sean alérgicos a la penicilina se les administra Amoxicilina y solo el 17.6% contestaron correctamente como tratamiento Clindamicina si el paciente es alérgico a la penicilina, ellos concluyen que es importante que los odontólogos conozcan los criterios recomendados por la AHA y además que recomienden antes un estudio de susceptibilidad antimicrobiana a las bacterias que están en cavidad oral. (Carmona y col,2004)

Los hallazgos de la literatura sobre EI causada por estreptococos del grupo viridans son corroborados por este estudio donde se encontró que el 50% de los pacientes tienen en su muestras salivales *S.mutans* lo cual nos indica que es muy posible que si estas personas evolucionan a Endocarditis infecciosa por bacteremias transitorias causadas por procedimientos odontológicos invasivos el principal microorganismo oportunista candidato para causar la infección es *S.mutans*, pero es importante resalta que es una hipótesis, para que esto llegara a ocurrir el paciente tendría que estar inmunosuprimido, no haber recibido terapia profiláctica antes de algún procedimiento odontológico invasivo y tener la presencia de *S.mutans* resistentes a la amoxicilina en este estudio 22% de los pacientes fueron resistentes a la amoxicilina y 78% sensibles esto respalda los estudios de susceptibilidad antibiótica realizadas a *S.mutans* a la amoxicilina ya que siempre se muestra un gran porcentaje de sensibilidad de la bacteria versus la resistencia.

8. CONCLUSIONES

En conclusión se encontró que el 50% de los pacientes estudiados tenían en sus muestras de barrido de cavidad oral *S.mutans,* los factores de riesgo a endocarditis infecciosa en estos pacientes son: Prótesis valvular, prótesis mitral, prótesis de valvular tricúspide, prótesis aortica, prótesis aortica mecánica, prótesis mitral mecánica, prótesis ventricular mitral, prótesis valvular mitral, prótesis aortica biológica, válvula mitral biológica, válvula mecánica mitral , STENT y endocarditis previa. La resistencia de *S.mutans* a la amoxiclina fue (15%) y el (20%) de las bacterias presentaron como mecanismo de resistencia la producción de beta-lactamasas. los pacientes que presentaron resistencia bacteriana a la amoxicilina tienen prótesis aortica, prótesis valvular, prótesis ventricular mitral y prótesis valvular.

Es importante resaltar que en general la población de nuestro estudio el 10.8% de los pacientes presentaron bacterias orales anaerobias facultativas *(S.mutans)* resistentes a la amoxicilina, en cuanto a la susceptibilidad antibiótica reportada en la literatura para bacterias anaerobias facultativas por estudios se ha encontrado que la resistencia a la amoxicilina y la amoxicilina/clavulánico es del 7% (Tanner y col, 1993) y del 4.8% y 4.0% (Salinas y col, 2006). Estos datos son muy significativos para los odontólogos que reciben pacientes con riesgo a endocarditis infecciosa y van a ser sometidos a un procedimiento dental invasivo ya que existe un

porcentaje de resistencia de la flora bucal que el odontólogo debe tener en cuenta a la hora de determinar la terapia profiláctica para el paciente.

Como aportes es importante realizar más estudios sobre la existencia en cavidad oral de *S.mutans* y su susceptibilidad antibiótica a los betalactamicos utilizados mas frecuentes como medida profiláctica de elección (amoxicilina) pacientes con riesgo alto a endocarditis en Colombia, para que de esta manera se evalué el protocolo profiláctico antibiótico publicado por la *American Heart Association (AHA)* 1997 y EUROPEAN CONSENSUS 1995.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca G, Herrera M.L, Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio, Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) 2001 v.36

2. Barcelona L, Marin M, Stamboulian D, Betalactamicos con inhibidores de betalactamasas (Amoxicilina-sulbactam), MEDICINA (Buenos Aires) 2008; 68: 65-74

3. Berini L, Gay Escoda C La infección odontogénica: concepto, etiopatogenia etiopatogenia, bacteriología y clínica. En: Gay Escoda C, Berini L, eds. Cirugía Bucal. Madrid: (1999) Ergón; 597-621

4. Berini L, Gay Escoda. La infección odontogénica: concepto, etiopatogenia, bacteriología y clínica. En: Gay Escoda C, Berini L, eds. Cirugía Bucal. Madrid: Ergón. 1999; Págs 597-621.

5. Brescó S, Costa R, Berini L, Gay E, Susceptibilidad antibiótica de las bacterias causantes de infecciones odontogénicas, Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E70-5.

6. Bucher L, Giddens J, O´brien P, Lewis S. Enfermería medicoquirúrgica: Valoracion y cuidados de problemas clínicos. Editorial ELsevier España, 6 ed. 2004. Págs 907-911.

7. Carmona T, Diz P, Limeres J, Outumurio M y col. Pautas de profilaxis antibiótica de Endocarditis Bacteriana, recomendadas por los odontólogos en España. Med Oral 2004 9: Págs 56-62.

8. Castillo JC. Anguita MP, Torres F, Siles JR, Mesa D. Factores de riesgo asociados a endocarditis sin cardiopatía predisponente. Rev Esp Cardiol 2002;55(3):304-7

9. Davis HM, Hines HB, Edwards JR. Structural elucidation of a water-insoluble glucan produced by a cariogenic oral Streptococcus. Carbohydr Res 1986;156:69-77.

10. Dubreuil L, Bascones A Infecciones periodontales: papel de los anaerobios estrictos, importancia de las betalactamasas, elección de un antibiótico. (1994) Av Periodon 6:99-108

11. Echeverria R, Rozo J, Jaramillo C, Rodriguez C. Características epidemiológicas de la endocarditis infecciosa en la Fundación Clínica A. Shaio entre 1994-2001. Revista Colombiana de Cardiología. 2002. 10, Pág 59-63

12. Gauduchon V., Y. Benito, M. Célard, C. Mouren, V. Delorme, J. Philippe-Bert, J, F.Etienne Vandenesch, Molecular diagnosis of recurrent *Streptococcus mutans* endocarditis by PCR amplification and sequencing, Laboratorie de Microbiologie, EA 1965, Hospital Louis Prade. Accepted 16 octubre 2000

13. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, Antunes MDJ, Thilen U, Lekakis J, Lengyel M, Muller L, Naber C.K, Nihoyannopoulos P, Moritz A y Zamorano J.L. Guía de práctica Clínica para prevención, diagnóstico y tratamiento de la endocarditis infecciosa (nueva versión 2009). Rev Esp Cardiol. 2009;62(12):1465.e1-.e54

14. Hamada S, Slade HD Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans.* Microbiol Rev. 1980. 44:331–384.

15. Juan Mª, Rosell A, Rafecas F. Hemostasia y trastornos hemorrágicos. Servicio de Hematología y Hemoterapia .2000 Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia Dirección postal: C/ Brasil, 43-13ª. 46018-Valencia.

16. Kazuhiko N, Ryota N , Michiyo M,Takashi O. Roles of Oral Bacteria in Cardiovascular Diseases — From Molecular Mechanisms to Clinical Cases: Cell-Surface Structures of Novel Serotype *k Streptococcus mutans* Strains and Their Correlation to Virulence. Journal of Pharmacological Sciences Sci 2010. 113 , Págs 120 – 125.

17. Marín M, Gudiol F. Antibióticos Betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin; (2003). 21(1) Págs 42-55

18. Nagata E, Okayama H, Ito Ho, Inoue M, Oho T. Serotype-specific polysaccharide of *Streptococcus mutans* contributes to infectivity in endocarditis. Oral Microbiol Immunol (2006). 21: Págs 420-3

19. Nakano, K., Inaba, H., Nomura, R., Nemoto, H., Takeda, M., Yoshioka, H., Matsue, H., Takahashi, T., Taniguchi, K. & other authors. Detection of cariogenic Streptococcus mutans in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. J Clin Microbiol -.2006. 44, Págs 3313–3317.

20. Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapirattanakul J, Nemoto H, Grönroos L, et al .. Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans* .Journal of Medical Microbiology. 2009. 58, Págs 469–475.

21. Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapirattanakul J, Nemoto H, Grönroos L, et al Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans* .J Med Microbiol. 2009. 58: Págs 469–475.

22. Rainer Z, MD, Seiler C, MD Determinants of Long-Term Outcome Cardiovasc Rev Rep , 2003. 24(7): Págs 375-380

23. Rodríguez J, *La dextranasa a lo largo de la industria azucarera,* División Química-Física, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB, *Biotecnología Aplicada 2005;22:11-19.*

24. S D S. Manual para toma de muestras para el análisis microbiológicas. Editorial Linotipia Bolívar y Cía. S. en C. 2008: 51 pg.

25. Salinas MB, Costa RN, Aytés LB, gay C Susceptibilidad antibiótica de las bacterias causantes de infecciones odontogénicas.. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006.11:E70-5.

26. Shigeyuki H, Slade H. Biology, Inmunology, and Cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiological Reviews. 1980. 44, Págs 331-384.

27. Spicer, W. John , Microbiología clínica y enfermedades infecciosas texto y atlas en color. Ed. Elsevier Churchill Livingstone. 2a ed. 2009

28. Tanner A, Stillman N. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens and treatment. Clin Infect Dis 1993;16:304-9.

29. Tortora. G. J, Funke, B. R, Case C. Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana, 9 ed. 2007 Pág 675-678.

30. Vallés F, Anguita M, Escribano P, Peréz F, Pousibet H, Tornos P, Vilacosta M. Guías de práctica clínica de la sociedad Española de Cardiología en Endocarditis. Revista Española de Cardiologia. 2000. 53, Págs 1384-1396.

31. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart P, y col, Prevention of infective Endocarditis, Guidelines from the American Heart Association, Journal of American Heart Association. 2007. www:http// circ.ahajournals.org

32. Wilson WR, Karchmer AW, Dajani AS Tauber KA, Bayer A, Kaye D, Bisno AL, Ferrieri P, Shulman ST, Durack DT. 1995. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci, and HACEK microorganisms. JAMA 274 Págs 1706-1713.

33. World Health Organization. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, © World Health Organization 2001