

Eficacia in vitro de la moxifloxacin frente a *Candida albicans* en enfermedad periodontal¹

In vitro antifungal activity of moxifloxacin against *Candida* isolates from periodontal disease

ARDILA MEDINA CM*
ALZATE VEGA J**
GUZMÁN ZULUAGA IC***

Ardila Medina CM, Alzate Vega J, Guzmán Zuluaga IC. *Eficacia in vitro de la moxifloxacin frente a Candida albicans en enfermedad periodontal*. Av Periodon Implantol. 2014; 26, 1: 45-50.

RESUMEN

Introducción: La periodontitis crónica está asociada a una compleja y diversa flora microbiana que incluye posiblemente especies de *Candida*.

Objetivo: Evaluar la presencia de *Candida* y su susceptibilidad in vitro a la moxifloxacin en pacientes con periodontitis crónica.

Materiales y métodos: Se usó una técnica de diluciones seriales para evaluar la susceptibilidad de la *Candida* a la moxifloxacin. Se utilizó el porcentaje de individuos con al menos una bolsa infectada para describir la presencia de individuos positivos a especies de *Candida*.

Resultados y conclusiones: se detectaron especies de *Candida* en 13,2% de 76 pacientes con periodontitis crónica. La moxifloxacin inhibió significativamente el crecimiento de *Candida* (90%). La moxifloxacin puede ser una buena alternativa para el tratamiento de *Candida* debido a que en situaciones específicas la sobreinfección por este microorganismo puede responder inadecuadamente a tratamientos periodontales convencionales.

PALABRAS CLAVE: *Candida*, periodontitis crónica, moxifloxacin.

SUMMARY

Introduction: Chronic periodontitis is associated with a widely diverse and complex subgingival microbiota including possibly *Candida* species.

Objective: prevalence and in vitro antifungal sensitivity of isolates of *Candida* species were examined in chronic periodontitis patients.

Materials and Methods: Antifungal susceptibility testing of the isolates for moxifloxacin was performed by serial dilutions technique. The presence of *Candida* species-positive individuals were described as the percentage of individuals with at least one infected pocket.

Results and conclusions: *Candida* species were detected in 13.2% of 76 chronic periodontitis patients. Moxifloxacin significantly inhibited the growth of *Candida* (90%). Moxifloxacin may be a good alternative for the treatment of yeasts in periodontitis for the reason that under specific situations the superinfection by *Candida* can be refractory to conventional periodontal treatments.

KEY WORDS: *Candida*, periodontitis, moxifloxacin.

Fecha de recepción: 25 de abril de 2010.

Aceptado para publicación: 10 de junio de 2010.

¹ Investigación financiada por la Facultad Nacional de Salud Pública y el Grupo de Epidemiología de la Universidad de Antioquía.

* Profesor Asociado Facultad de Odontología. Universidad de Antioquía. Grupo de Epidemiología. Universidad de Antioquía.

** Odontóloga. Universidad de Antioquía.

*** Periodoncista. Universidad de Chile. Profesora Asistente Facultad de Odontología Universidad de Antioquía.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica está asociada a una diversa y compleja flora subgingival que incluye bacterias gram positivas y gram negativas, microorganismos anaerobios y facultativos, y posiblemente especies de *Candida*. Las especies de *Candida* son patógenos oportunistas que causan enfermedades en huéspedes comprometidos con procesos patológicos locales o sistémicos (1). La candidiasis es la infección micótica más común en el ser humano. En la cavidad oral, las levaduras colonizan frecuentemente la lengua, el paladar y la mucosa bucal (2) y puede observarse en placa subgingival de adultos con periodontitis (3-7). La *Candida albicans* es la especie de levaduras observada con mayor frecuencia (7,1-26,9%) en periodontitis crónica (3-7). Además, la proporción de levaduras en las bolsas periodontales es similar a la de algunos periodontopatógenos, sugiriendo un posible papel de las especies de *Candida* en la patogénesis de la enfermedad periodontal (3-9). Las especies de *Candida* pueden conducir a infecciones periodontales graves en pacientes inmuno comprometidos o en individuos bajo terapia antimicrobiana por largos periodos de tiempo (8, 9). Bajo situaciones específicas, como en el caso de pacientes inmuno suprimidos, la sobreinfección por *Candida* puede ser refractaria a tratamientos periodontales convencionales (7, 9, 10). Se sugirió también que *Candida albicans* puede contribuir al desarrollo de enfermedades periodontales necrotizantes en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (10). Como fue anotado por Slots y cols. (3, 9), las especies de *Candida* pueden contribuir al progreso de la periodontitis y ocasionalmente pueden causar complicaciones sistémicas.

La bolsa periodontal y el fluido crevicular son ambiente favorables para la germinación y el crecimiento de hifas de *Candida* (7). Este tipo de hifas tienen la habilidad de penetrar los tejidos del huésped y pueden adherirse a las superficies del huésped en una mayor extensión que las levaduras (7). La *Candida* se ha encontrado en las capas externas de la placa bacteriana y parece que actúa como barrera entre la inmunidad del huésped y las capas internas de la biopelícula (7). De esta manera, *Candida albicans* puede cumplir un papel en la evasión inmune de la placa en infecciones periodontales y en la inflamación destructiva de los tejidos subyacentes (7). La pobre respuesta observada a la terapia mecánica convencional en pacientes con periodontitis crónica que presentan *Candida* en placa subgingival, puede deberse a sus propiedades invasivas y a su distribución en los teji-

dos intraorales (11). Por estas razones, se recomienda la administración sistémica adjunta de antimicrobianos con el fin de suprimir la *Candida* presente en placa subgingival (9).

El desafío clínico en el tratamiento de las infecciones con levaduras se debe en parte a la acción fungistática de la mayoría de los medicamentos empleados, los cuales requieren un curso prolongado de la terapia, ocasionando efectos colaterales marcados (por ejemplo, anfotericina B) (12). Además, pruebas de susceptibilidad antifúngica, revelan alta resistencia de las especies de *Candida* a los azoles (13). Nuevos medicamentos antifúngicos y/o el aumento de la terapia actual pueden mejorar los resultados terapéuticos.

La moxifloxacina es una nueva 8-metoxi-quinolona oral con un amplio espectro de actividad. Es activa contra bacterias gram-positivas y gram-negativas multirresistentes, bacterias aerobias y anaerobias, y microorganismos atípicos (14, 15). La actividad bactericida de las fluoroquinolonas se basa principalmente en sus efectos inhibitorios sobre la ADN girasa bacteriana (topoisomerasa II) (15). Las fluoroquinolonas pueden tener un efecto similar en las topoisomerasas de las levaduras (16-19). Shen y Fostel (16) fueron los primeros en sugerir la topoisomerasa II como un blanco potencial para nuevos agentes antifúngicos. Otros informes indican potenciación por parte de las fluoroquinolonas en la actividad antifúngica de la anfotericina B y el fluconazol, tanto in vivo como in vitro (18, 19).

De esta manera, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de la moxifloxacina frente a especies de *Candida* presentes en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

En este estudio se invitaron a participar 76 sujetos sistémicamente sanos (45 mujeres y 31 hombres) que asistieron a las clínicas odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquía entre octubre de 2008 y marzo de 2009. Cada participante firmó un consentimiento informado. El Comité de Ética de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquía aprobó el diseño del estudio teniendo en cuenta la Declaración de Helsinki sobre experimentación que involucra seres humanos. Para participar en esta investigación, se consideraron

como candidatos, pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica. Los criterios de exclusión fueron embarazo, lactancia, presencia de diabetes o cualquier enfermedad sistémica que alterara el curso de la enfermedad periodontal, terapia periodontal en el último año, y utilización de antimicrobianos o antiinflamatorios no esteroides en los seis meses previos al examen clínico y a la toma de muestras microbiológicas.

Evaluación clínica

A cada paciente se le realizó una historia clínica, además de un examen clínico y radiográfico completo. Uno de los autores (CA) realizó todos los exámenes clínicos. La profundidad de sondaje (PS), el nivel de inserción clínica (NIC), y la presencia de sangrado, supuración y placa se midieron en seis sitios (mesio-bucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) usando una sonda periodontal calibrada (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL). El diagnóstico de periodontitis crónica se realizó según los criterios recomendados por la Academia Americana de Periodoncia (AAP) (20).

Muestreo microbiológico

Se tomaron muestras microbiológicas de los pacientes en sitios con una profundidad de sondaje ≥ 5 mm. Para el muestreo se seleccionaron las seis bolsas periodontales más profundas. Después de aislar la zona con algodón y remover la placa supragingival con cureta, se insertaron conos de papel estéril en cada bolsa periodontal durante 20 segundos. Las muestras de cada paciente se depositaron en 2 mL de medio de transporte (Viability Medium Göteborg Anaerobically III: VMGA III) (21) y se llevaron al laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquía para procesarlas dentro de las dos horas siguientes.

Cultivo de levaduras: Las muestras fueron inoculadas en agar dextrosa de Sabouraud (ADS) y fueron inoculadas también en Agar HiCrome diferencial (agar CHROM) (Hi Media Pvt. Ltd., Mumbai) para mejorar la identificación de las especies, teniendo presente la morfología de la colonia coloreada. Las placas de ADS y de agar CHROM se incubaron a 37° C durante 48 horas. Los aislamientos se caracterizaron por la realización de las siguientes pruebas: producción tubo germinal, formación de clamidosporas en agar harina

de maíz, perfil de la asimilación de azúcar y el crecimiento diferencial en ADS a 37° C y 42° C (22, 23). Para cada aislamiento se preparó un inóculo en una solución salina estéril y se ajustó a un patrón de turbidez 0,5 McFarland (10^8 ufc/ml) utilizando un espectrofotómetro.

Pruebas de sensibilidad antifúngica

Para la evaluación in vitro de la actividad antifúngica de la moxifloxacin se utilizaron los aislamientos de *Candida* recuperados de placa subgingival. Las pruebas de susceptibilidad antifúngica de los aislamientos se realizaron mediante la técnica de diluciones seriadas de acuerdo con el Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS) (24). Se preparó moxifloxacin sin diluir y también se prepararon diluciones en serie de la preparación comercial. Se obtuvieron tres diluciones de moxifloxacin al 0,5%, 0,25% y 0,125%. Se inocularon tres tubos, cada uno con 1 ml de 3 diluciones de moxifloxacin, con 50 μ l de 0,5 McFarland. Los tubos se incubaron a 35° C durante 24 horas. Las alícuotas se sembraron en agar Sabouraud y se incubaron a 35° C durante 24 horas. Las colonias se contaron y registraron a las 24 horas.

Análisis estadístico

Para describir las variables relacionadas con los sujetos y los dientes se realizó un análisis exploratorio sobre la distribución de los índices PS y NIC utilizando medidas de tendencia central y de dispersión. Se obtuvieron frecuencias y proporciones de las especies de *Candida*. Para las variables placa bacteriana, sangrado al sondaje, y supuración se calcularon frecuencias y proporciones. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para evaluar la diferencia entre presencia de sangrado frente a la presencia o ausencia de *Candida*. También se usó la prueba de Mann-Whitney para determinar las diferencias en la PS y el NIC en presencia o ausencia de *Candida*. Se usó un programa estadístico para todos los análisis (SPSS, versión 15, Chicago, IL).

RESULTADOS

Se estudiaron 31 hombres (41%) y 45 mujeres (59%) con periodontitis crónica (edad: $46 \pm 8,1$ años), de los cuales fumaban el 22%. Las tablas 1 y 2 presentan las características clínicas y demográficas de los pacien-

TABLA 1.- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES CON PRESENCIA DE *CANDIDA*

Parámetro	Presencia de <i>Candida</i>
n	10
%	13,2
Edad (años±DE)	39,6±5,9
Género	
• % mujeres	70%
• % hombres	30%
Hábito de fumar	
• % no-fumadores	70%
• % fumadores	30%

DE: desviación estándar.

TABLA 2.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES CON PRESENCIA DE *CANDIDA* EN PLACA SUBGINGIVAL

Parámetro	Presencia de <i>Candida</i>
Profundidad de sondaje (mm±DE)	3±1,2
Nivel de inserción clínica (mm±DE)	3,8±1,7
% sangrado al sondaje (%±DE)	69±21
% placa bacteriana (%±DE)	46±28
% supuración (%±DE)	14±3,1

mm: milímetro; DE: desviación estándar.

tes con presencia de *Candida*. Se observaron especies de *Candida* en 10 (13,2%, Tabla 1) de 76 pacientes con periodontitis crónica. Las mujeres (7/45; 15,8%) presentaron más *Candida* que los hombres (3/31; 9,8%, $p < 0,001$). Se observó *Candida albicans* en 8 pacientes y en dos sujetos se encontraron dos especies sin especificar. Las pruebas de microdilución de la moxifloxacina mostraron una inhibición significativa del crecimiento de *Candida* (90%) en todas las concentraciones no diluidas. No hubo crecimiento de los organismos en el control estéril.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se identificaron especies de *Candida* en placa subgingival en el 13,2% de 76 pacientes con periodontitis crónica. Slots y colaboradores (9) observaron frecuencias similares (13-14%) a las encontradas en esta investigación. En el estudio de Slots y colaboradores (9) todos los pacientes fueron sometidos a terapia mecánica convencional y la mayoría de ellos recibieron uno o más tratamientos con antibióticos a corto plazo. Es importante tener presente que en ese estudio todos los sitios de muestreo fueron definidos como no respondedores o refractarios a la terapia periodontal. Otro estudio realizado por Slots y colaboradores (3) también registró 16,8% de bolsas periodontales infectadas por levaduras en pacientes con pobre respuesta a la terapia periodontal. Al igual que en el presente estudio la levadura más frecuentemente fue *C. albicans*. El alto potencial patogénico de estos microorganismos (3) puede representar una causa de fracaso en la terapia periodontal (7, 9, 10). Se desconoce el papel de las especies de *Candida* en la patogénesis de la periodontitis, pero algunos investigadores sugieren que estos patógenos pueden tener gran impacto en el progreso y tratamiento de la enfermedad periodontal (3, 7, 9, 10). Como ha señalado Slots y cols. (25), las levaduras persisten después de terapia mecánica y quirúrgica. Se requieren estudios adicionales para evaluar los factores de riesgo, los mecanismos de virulencia, y el impacto del tratamiento en pacientes que presenten *Candida* en placa subgingival.

La susceptibilidad antimicrobiana obtenida en el presente estudio sugiere que la moxifloxacina tiene el potencial para erradicar especies de *Candida*. La moxifloxacina es una nueva fluoroquinolona de amplio espectro incluyendo anaerobios y microorganismos gram-positivos, especialmente aquellos multirresistentes (26). Presenta además excelente biodisponibilidad, a largo y mediano plazo, buena penetración tisular (27) y tolerancia (28).

En el presente estudio la prueba de microdilución reveló que la actividad antifúngica fue más evidente con concentraciones de moxifloxacina sin diluir: 0,5% (0,5 mg/ml), inhibiendo significativamente el crecimiento de casi todas las especies de *Candida*. Sin embargo, las actividades de los fármacos in vivo pueden ser diversas, lo que impide realizar cualquier conclusión sobre la eficacia clínica.

Son pocos los estudios previos que sugieren una actividad antifúngica de las fluoroquinolonas (16-19, 29).

Sin embargo, otros antibacterianos como la minociclina también presentaron actividad antifúngica en varios estudios (30-32).

Recientemente, la FDA aceptó la incorporación de 22 agentes patógenos a la eficacia in vitro de la moxifloxacin, incluyendo muchas micobacterias atípicas (29). Las fluoroquinolonas tienen actividad bactericida que se determina principalmente por su actividad contra el ADN girasa (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV, dos enzimas con funciones esenciales en la síntesis de ADN (16-17). Los principales hongos patógenos tienen altos niveles de topoisomerasa II, lo cual permite explicar la eficacia in vitro de la moxifloxacin frente a especies de *Candida* (18).

CONCLUSIONES

Su buena actividad contra las especies de *Candida* sugiere el uso potencial de la moxifloxacin como antibiótico adjunto al tratamiento de infecciones mixtas periodontales. La realización de estudios que incluyan una mayor cantidad de aislamientos, podría permitir el desarrollo de fluoroquinolonas antifúngicas dirigidas particularmente a las topoisomerasas de las levaduras. El buen resultado obtenido por la moxifloxacin puede ser un indicio para realizar pruebas de este antibiótico en ensayos clínicos controlados.

BIBLIOGRAFÍA

1. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996;25:136-44.
2. Hannula J, Dogan B, Slots J, Okte E, Asikainen S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16: 113-18.
3. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3:47-52.
4. Reynaud AH, Nygaard-Østby B, Bøygard G-K, Eribe ER, Olsen I, Gjerme P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2001;28: 860-4.
5. Urzúa B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, and others. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol* 2008; 46:783-93.
6. Papapanou PN. Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol* 2002;7:54-61.
7. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis* 2004;10:106-12.
8. Helovu H, Hakkarainen K, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:75-9.
9. Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:305-8.
10. Brawner DL, Cuttler JE. Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1989;27:1335-41.
11. Walker C, Karpinia K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2002; 73:1188-96.
12. Marangon FB, Miller D, Giaconi JA, Alfonso EC. In vitro investigation of voriconazole susceptibility for keratitis and endophthalmitis fungal pathogens. *Am J Ophthalmol* 2004;137:820-5.
13. Chunchanur SK, Nadgir SD, Halesh LH, Patil BS, Kausar Y, Chandrasekhar MR. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. *Indian J Pathol Microbiol* 2009;52:501-4.
14. Guentsch A, Jentsch H, Pfister W, Hoffmann T, Eick S. Moxifloxacin as an adjunctive antibiotic in the treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2008; 79:1894-3.
15. Eick S, Pfister W. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *J Periodontol* 2004; 75: 1327-34.
16. Shen L, Mitscher LA, Sharma PN, O'Donnell TJ, Chu DW, Cooper CS, and others. Mechanism of inhibition of DNA

- gyrase by quinolone antibacterials. A cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* 1989;28:2886-94.
17. Shen LL, Fostel JM. DNA topoisomerase inhibitors as antifungal agents. *Adv Pharmacol* 1994;29B: 227-44.
 18. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:343-8.
 19. Sugar AM, Liu XP, Chen RJ. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2518-21.
 20. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
 21. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies*. *Odontol Tidskr* 1966; 74:Suppl:1-380.
 22. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Al-Sweih N, Chandy R. Sunflower seed husk agar: a new medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Indian J Med Microbiol* 2005;23:182-5.
 23. Marot-Leblond A, Grimaud L, David S, Sullivan DJ, Coleman DC, Ponton J, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4956-60.
 24. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 25. Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol* 1991;62:543-7.
 26. Cachovan G, Nergiz I, Thuss U, Siefert HM, Sobottka I, Oral O, and others. Penetration of moxifloxacin into rat mandibular bone and soft tissue. *Acta Odontol Scand* 2009; 67:182-6.
 27. Krasemann C, Meyer J, Tillotson G. Evaluation of the clinical microbiology profile of moxifloxacin. *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 1:S51-63.
 28. Mosca A, Miragliotta L, Iodice MA, Abbinante A, Miragliotta G. Antimicrobial profiles of *Prevotella* spp. and *Fusobacterium nucleatum* isolated from periodontal infections in a selected area of southern Italy. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 521-4.
 29. Ozdek SC, Miller D, Flynn PM, Flynn HW. In vitro antifungal activity of the fourth generation fluoroquinolones against *Candida* isolates from human ocular infections. *Ocul Immunol Inflamm* 2006;14:347-51.
 30. Lew MA, Beckett KM, Levin MJ. Antifungal activity of four tetracycline analogues against *Candida albicans* in vitro: Potentiation by amphotericin B. *J Infect Dis* 1977;136:263-70.
 31. Schierholz JM, Pulverer G, Bach A, Wachol-Drebeck Z. In vitro activity of rifampin-minocyclin coating to *Candida albicans*. *Crit Care Med* 1999;27:1691-3.
 32. Wilson M, O'Connor B, Newman HN. Isolation and identification of bacteria from subgingival plaque, with low susceptibility to minocycline. *J Periodontol* 1991;28: 71-8.

CORRESPONDENCIA

Carlos M. Ardila Medina
Calle 64 N° 52-59
Medellín, Colombia
e-mail: martinardila@gmail.com. Fax: 057-4-2195332